Šis tekstas yra skirtas tik informacijai ir teisinės galios neturi. Europos Sąjungos institucijos nėra teisiškai atsakingos už jo turinį. Autentiškos atitinkamų teisės aktų, įskaitant jų preambules, versijos skelbiamos Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje ir pateikiamos svetainėje „EUR-Lex“. Oficialūs tekstai tiesiogiai prieinami naudojantis šiame dokumente pateikiamomis nuorodomis

►B ►C1 **KOMISIJOS REGLAMENTAS (EB) Nr. 440/2008**

2008 m. gegužės 30 d.

nustatantis bandymų metodus pagal Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH)

(Tekstas svarbus EEE) ◄

(OL L 142, 2008 5 31, p. 1)

iš dalies keičiamas:

		Oficialusis leidinys		
		Nr.	puslapis	data
►M1	2009 m. liepos 23 d. Komisijos Reglamentas (EB) Nr. 761/2009	L 220	1	2009 8 24
►M2	2010 m. gruodžio 8 d. Komisijos reglamentas (ES) Nr. 1152/2010	L 324	13	2010 12 9
►M3	2012 m. liepos 6 d. Komisijos reglamentas (ES) Nr. 640/2012	L 193	1	2012 7 20
►M4	2014 m. sausio 24 d. Komisijos reglamentas (ES) Nr. 260/2014	L 81	1	2014 3 19
►M5	2014 m. liepos 15 d. Komisijos reglamentas (ES) Nr. 900/2014	L 247	1	2014 8 21
►M6	2015 m. gruodžio 7 d. Komisijos reglamentas (ES) 2016/266	L 54	1	2016 3 1
►M7	2017 m. vasario 14 d. Komisijos reglamentas (ES) 2017/735	L 112	1	2017 4 28

pataisytas:

►C1	Klaidų ištaisymas, OL L 284, 2011 10 31, p. 3 (440/2008)

▼B
▼C1

KOMISIJOS REGLAMENTAS (EB) Nr. 440/2008

2008 m. gegužės 30 d.

nustatantis bandymų metodus pagal Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH)

(Tekstas svarbus EEE)

1 straipsnis

Įgyvendinant Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 taikomi bandymų metodai nustatyti šio reglamento priede.

2 straipsnis

Siekdama pakeisti, patobulinti bandymus su stuburiniais gyvūnais arba sumažinti jų skaičių, Komisija prireikus persvarsto šiame reglamente nurodytus bandymų metodus.

3 straipsnis

Nuorodos į Direktyvos 67/548/EEB V priedą laikomos nuorodomis į šį reglamentą.

4 straipsnis

Šis reglamentas įsigalioja kitą dieną po jo paskelbimo *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje*.

Jis taikomas nuo 2008 m. birželio 1 d.

▼C1

PRIEDAS

▼M6

Pastaba.

Prieš bet kurį iš toliau pateikiamų bandymo metodų naudojant bandymams su cheminėmis medžiagomis, sudarytomis iš kelių sudedamųjų dalių (MCS), su nežinomos ar kintamos sudėties medžiagomis, sudedamaisiais reakcijų produktais ar biologinėmis medžiagomis (UVCB) arba su mišiniais, jei atitinkamo metodo aprašyme nenurodyta, ar metodas tinkamas bandymams su MCS, UVCB ar mišiniais atlikti, reikia apsvarstyti, ar metodas tinkamas numatytam reguliavimo tikslui.

Jei bandymo metodas naudojamas bandymams su MCS, UVCB ar mišiniu atlikti, reikėtų, kiek įmanoma, gauti pakankamai informacijos apie jų sudėtį, pvz., nustatant jo sudedamųjų dalių cheminį tapatumą, jų kiekius ir svarbias tų cheminių medžiagų savybes.

▼C1

A DALIS. FIZIKINIŲ IR CHEMINIŲ SAVYBIŲ NUSTATYMO METODAI

TURINYS

A.1. LYDYMOSI/UŽŠALIMO TEMPERATŪRA

A.2. VIRIMO TEMPERATŪRA

A.3. SANTYKINIS TANKIS

A.4. GARŲ SLĖGIS

A.5. PAVIRŠIAUS ĮTEMPTIS

A.6. TIRPUMAS VANDENYJE

A.7. PASISKIRSTYMO KOEFICIENTAS

A.8. PLIŪPSNIO TEMPERATŪRA

A.9. DEGUMAS (KIETOSIOS MEDŽIAGOS)

A.10. DEGUMAS (DUJOS)

A.11. DEGUMAS (SĄLYTIS SU VANDENIU)

A.12. KIETŲJŲ IR SKYSTŲJŲ MEDŽIAGŲ PIROFORINĖS SAVYBĖS

A.13. SPROGUMAS

A.14. SKYSČIŲ IR DUJŲ SAVAIMINIO UŽSILIEPSNOJIMO TEMPERATŪRA

A.15. KIETŲJŲ MEDŽIAGŲ SANTYKINĖ SAVAIMINIO UŽSILIEPSNOJIMO TEMPERATŪRA

A.16. OKSIDACINĖS SAVYBĖS (KIETOSIOS MEDŽIAGOS)

A.17. POLIMERŲ SKAITINĖS VIDUTINĖS MOLEKULINĖS MASĖS IR MOLEKULINĖS MASĖS PASISKIRSTYMAS

A.18. MAŽOS MOLEKULINĖS MASĖS MEDŽIAGŲ KIEKIS POLIMERUOSE

A.19. POLIMERŲ TIRPUMAS VANDENYJE/EKSTRAHAVIMAS IŠ VANDENS

A.20. OKSIDACINĖS SAVYBĖS (SKYSČIAI)

A.22. PLAUŠELIŲ SKERSMENS ILGIO SVORINIS GEOMETRINIS VIDURKIS

A.23. PASISKIRSTYMO KOEFICIENTAS (1-OKTANOLIS / VANDUO). LĖTO MAIŠYMO METODAS

A.24. PASISKIRSTYMO (N-OKTANOLIO / VANDENS) KOEFICIENTAS. DIDELIO SLĖGIO SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJOS (HPLC) METODAS

A.25. DISOCIACIJOS VANDENYJE KONSTANTOS (TITRAVIMO METODAS. SPEKTROFOTOMETRINIS METODAS. KONDUKTOMETRINIS METODAS)

▼C1

A.1. LYDYMOSI/UŽŠALIMO TEMPERATŪRA

1. METODAS

Dauguma apibūdintų metodų yra pagrįsti OECD bandymų gairėmis (1). Pagrindiniai principai yra pateikti 2 ir 3 nuorodoje.

1.1. ĮVADAS

Apibūdintieji metodai ir prietaisai turi būti taikomi nustatant medžiagų lydymosi temperatūrą, netaikant jokių apribojimų jų grynumo laipsniui.

Metodo parinkimas priklauso nuo to, ar medžiaga gali būti lengvai susmulkinama, ar sunkiai smulkinama, ar jos susmulkinti neįmanoma. Todėl ribinis koeficientas priklausys nuo to, ar galima, ar negalima tą medžiagą lengvai ar sunkiai susmulkinti, ar visai neįmanoma.

Kai kurioms medžiagoms labiau tinka nustatyti užšalimo arba kietėjimo temperatūrą, jų nustatymo standartai taip pat yra įtraukti į šį metodą.

Jeigu dėl tam tikrų medžiagos savybių minėtų parametrų neįmanoma tinkamai išmatuoti, gali būti naudojama takumo temperatūra.

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Lydymosi temperatūra – tai temperatūra, kuriai esant fazinis virsmas iš kietosios būsenos į skystąją vyksta atmosferos slėgyje ir ši temperatūra sutampa su užšalimo temperatūra.

Kadangi daugumos medžiagų fazinis virsmas vyksta temperatūrų intervale, jis apibūdinamas kaip lydymosi temperatūrų intervalas.

Vienetų pakeitimas (iš K į °C)

$t = T - 273{,}15$

t: temperatūra pagal Celsijų (°C).

T: termodinaminė temperatūra, kelvinai (K).

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nebūtina naudoti etalonines medžiagas visais tais atvejais, kai tiriama nauja medžiaga. Pirmiausia jos turėtų būti naudojamos kartkartėmis tikrinant šio metodo veikimą ir siekiant palyginti gautus rezultatus su kitų metodų rezultatais.

Kai kurios kalibravimo medžiagos yra pateiktos nuorodose (4).

▼C1

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Nustatoma fazinio virsmo iš kietosios būsenos į skystąją arba iš skystosios būsenos į kietąją temperatūra (temperatūrų intervalas). Praktikoje šildant/aušinant bandomos medžiagos bandinį atmosferos slėgyje, yra nustatoma pradinė lydymosi/užšalimo temperatūra ir galutinės lydymosi/užšalimo stadijos temperatūra. Apibūdinami penki metodų tipai, būtent: kapiliarinis metodas, karštųjų stadijų metodai, užšalimo temperatūros nustatymas, terminės analizės metodai ir takumo temperatūros nustatymas (pvz., naftos produktams).

Tam tikrais atvejais vietoje lydymosi temperatūros yra patogu matuoti užšalimo temperatūrą.

1.4.1. **Kapiliarinis metodas**

1.4.1.1. *Lydymosi temperatūros matavimo prietaisai su skysčių vonia*

Nedidelis kiekis gerai susmulkintos medžiagos dedamas į kapiliarinį vamzdelį ir tvirtai užspaudžiamas. Kapiliarinis vamzdelis šildomas kartu su termometru, lydymosi metu temperatūros pakitimas nustatomas apie 1 K/min. Nustatoma pradinė ir galutinė lydymosi temperatūra.

1.4.1.2. *Lydymosi temperatūros matavimo prietaisai su metaliniu bloku*

Taip kaip apibūdinta 1.4.1.1 punkte, išskyrus tai, kad kapiliarinis vamzdelis ir termometras dedami į pašildytą metalinį bloką, ir jie stebimi per bloke esančias skylutes.

1.4.1.3. *Detekcija fotoelementu*

Kapiliariniame vamzdelyje esantis mėginys yra automatiškai šildomas metaliniame cilindre. Šviesos spindulys nukreipiamas pro medžiagą per cilindre esančią skylutę į tiksliai kalibruotą fotoelementą. Daugumos medžiagų, jas lydant, optinės savybės keičiasi nuo matinių iki skaidrių. Į fotoelementą patenkančios šviesos intensyvumas didėja ir siunčia sustabdymo signalą į skaitmeninį indikatorių, kuris rodo kaitinimo kameroje esančio platininio varžinio termometro temperatūrą. Šis metodas netinka kai kurioms ryškią spalvą turinčioms medžiagoms.

1.4.2. **Karštosios stadijos**

1.4.2.1. *Koflerio karštasis strypas*

Koflerio karštajame strype naudojami du metalo gabalai, turintys skirtingą terminį laidumą, šildomi elektra, kur strypas sukonstruojamas taip, kad temperatūros gradientas būtų beveik linijinis per visą jo ilgį. Karštojo strypo temperatūra gali svyruoti nuo 283 iki 573 K kartu su specialiu temperatūros prietaisu, kurį sudaro judantis velenėlis su rodykle ir kilpelė, skirta konkrečiam strypui. Kad būtų nustatyta lydymosi temperatūra, labai plonas medžiagos sluoksnis dedamas tiesiai ant karšto strypo paviršiaus. Po kelių sekundžių taip skystosios ir kietosios fazės pasirodo ryški skiriamoji linija. Temperatūra skiriamojoje linijoje yra užrašoma rodyklę nustatant taip, kad ji būtų ant linijos.

▼C1

1.4.2.2. *Lydymosi temperatūros mikroskopas*

Keletas mikroskopo karštųjų stadijų yra naudojamos nustatant lydymosi temperatūrą esant labai mažam medžiagos kiekiui. Daugumoje karštųjų stadijų temperatūra yra matuojama jautriu termoelementu, bet kartais naudojami ir gyvsidabrio termometrai. Tipiškame mikroskopiniame karštosios pakopos lydymosi temperatūros nustatymo aparate yra kaitinimo kamera, kurią sudaro metalinė plokštelė, virš kurios ant objektinio stiklelio yra dedamas bandinys. Metalinės plokštelės centre yra skylė, per kurią patenka šviesa nuo mikroskopo apšvietimo veidrodėlio. Naudojimo metu kamera uždengiama stiklo plokštele, kad į erdvę, kurioje yra bandinys, nepatektų oro.

Bandinio kaitinimą reguliuoja reostatas. Atliekant labai tikslius optinių anizotropinių medžiagų matavimus, gali būti naudojama poliarizuota šviesa.

1.4.2.3. *Menisko metodas*

Šis metodas taikomas tiriant poliamidus.

Temperatūra, kurioje pasislenka silikoninės alyvos meniskas, esantis taip karštosios pakopos ir uždengiančiojo stiklo, paremto poliamidiniu bandiniu, yra nustatoma vizualiai.

1.4.3. **Užšalimo temperatūros nustatymo metodas**

Bandinys dedamas į specialų mėgintuvėlį, kuris įdedamas į aparatą užšalimo temperatūrai nustatyti. Aušinimo metu bandinys atsargiai ir be perstojo maišomas, o jo temperatūra yra matuojama atitinkamais intervalais. Kai kelis kartus užrašius rodmenis temperatūra nusistovi, ši temperatūra (su pakoreguota termometro paklaida) yra užrašoma kaip užšalimo temperatūra.

Peršaldymo turi būti vengiama palaikant pusiausvyrą taip kietosios ir skystosios fazės.

1.4.4. **Terminė analizė**

1.4.4.1. *Diferencinė ir terminė analizė (DTA)*

Pagal šią metodiką medžiagos ir etaloninės medžiagos temperatūrų skirtumas yra užrašomas kaip temperatūros funkcija, kai tai medžiagai ir etaloninei medžiagai yra naudojama ta pati kontroliuojamos temperatūros programa. Jeigu bandinyje įvyksta virsmas, kurio metu pakinta entalpija, tokį pasikeitimą parodo endoterminis (lydymosi) arba egzoterminis (užšalimo) nukrypimas nuo užrašytos temperatūros pagrindinės linijos.

▼C1

1.4.4.2. *Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija (DSK)*

Pagal šią metodiką įvesties energijų skirtumas medžiagoje ir etaloninėje medžiagoje užrašomas kaip temperatūros funkcija, kai tai medžiagai ir etaloninei medžiagai yra naudojama ta pati kontroliuojamos temperatūros programa. Ši energija – tai energija, reikalinga nustatyti medžiagos ir etaloninės medžiagos nuliniam temperatūrų skirtumui. Jeigu bandinyje įvyksta virsmas, kurio metu pakinta entalpija, tokį pasikeitimą parodo endoterminis (lydymosi) arba egzoterminis (užšalimo) nukrypimas nuo užrašyto šilumos srauto pagrindinės linijos.

1.4.5. **Takumo temperatūra**

Šis metodas naudojamas tiriant naftos produktus, jis taip pat tinka alyvoms, kurių lydymosi temperatūra yra žema.

Iš anksto pašildytas mėginys atvėsinamas ypač greitai ir yra tikrinamas 3 K intervalais srauto charakteristikoms nustatyti. Žemiausia temperatūra, kuriai esant nustatytas medžiagos judėjimas, yra užrašoma kaip takumo temperatūra.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Įvairių metodų, naudojamų lydymosi temperatūrai/lydymosi temperatūros intervalui nustatyti, tinkamumas ir tikslumas yra pateikti šioje lentelėje:

LENTELĖ. METODŲ TINKAMUMAS

A. **Kapiliariniai metodai**

Matavimo metodas	Medžiagos, kurias galima susmulkinti	Medžiagos, kurių negalima susmulkinti	Temperatūrų intervalas	Apskaičiuotas tikslumas ([1])	Galiojantis standartas
Lydymosi temperatūros prietaisai su skysčių vonia	Taip	Tik kelios	273–573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Lydymosi temperatūros prietaisai su metaliniu bloku	Taip	Tik kelios	293– > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218(E)
Detekcija foto-elementu	Taip	Kelios, naudojant prietaisus	253–573 K	± 0,5 K	

([1]) Priklauso nuo prietaiso rūšies ir medžiagos grynumo.

▼C1

B. **Karštosios stadijos ir užšalimo metodai**

Matavimo metodas	Medžiagos, kurias galima susmulkinti	Medžiagos, kurių negalima lengvai susmulkinti	Temperatūrų intervalas	Apskaičiuotas tikslumas ([1])	Galiojantis standartas
Koflerio karštasis strypas	Taip	Ne	283–> 573 K	± 1 K	ANSI/ASTM D 3451–76
Lydymosi temperatūros mikroskopas	Taip	Tik kelios	273–> 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Menisko metodas	Ne	Ypač poliamidams	293–> 573 K	± 0,5 K	ISO 1218(E)
Užšalimo temperatūros nustatymo metodai	Taip	Taip	223–573 K	± 0,5 K	Pvz.. BS 4695

([1]) Priklauso nuo prietaiso rūšies ir medžiagos grynumo.

C. **Terminė analizė**

Matavimo metodas	Medžiagos, kurias galima susmulkinti	Medžiagos, kurių negalima lengvai susmulkinti	Temperatūrų intervalas	Apskaičiuotas tikslumas ([1])	Galiojantis standartas
Diferencinė terminė analizė	Taip	Taip	173–1 273 K	Iki 600 K ± 0,5 K iki 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537–76
Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija	Taip	Taip	173–1 273 K	Iki 600 K ± 0,5 K iki 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537–76

([1]) Priklauso nuo prietaiso rūšies ir medžiagos grynumo.

D. **Takumo temperatūra**

Matavimo metodas	Medžiagos, kurias galima susmulkinti	Medžiagos, kurių negalima lengvai susmulkinti	Temperatūrų intervalas	Apskaičiuotas tikslumas ([1])	Galiojantis standartas
Takumo temperatūra	Naftos produktams ir alyvoms	Naftos produktams ir alyvoms	223–323 K	± 3,0 K	ASTM D 97–66

([1]) Priklauso nuo prietaiso rūšies ir medžiagos grynumo.

1.6. METODŲ APIBŪDINIMAS

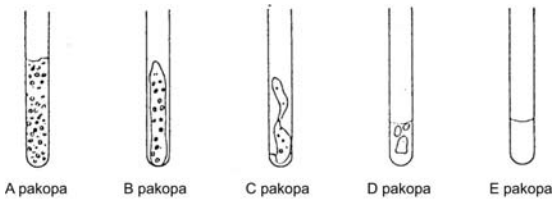
Beveik visų bandymo metodų darbo eiga yra aprašyta tarptautiniuose ir nacionaliniuose standartuose (žr. 1 priedėlį).

1.6.1. **Kapiliariniai metodai**

Jeigu smulkiai susmulkintų medžiagų temperatūra yra keliama pamažu, paprastai jos pereina lydymosi pakopas, kurios parodytos 1 pav.

▼C1

1 paveikslas



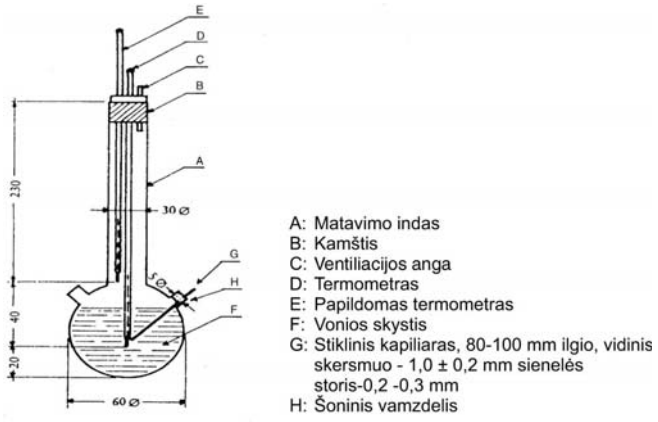
A pakopa	(lydymosi pradžia): smulkūs lašeliai vienodai prilimpa prie vidinės kapiliarinio vamzdelio sienelės
B pakopa	tarp mėginio ir vidinės sienelės atsiranda tarpas dėl lydinio suslūgimo.
C pakopa	suslūgęs mėginys pradeda smukti žemyn ir skystėti.
D pakopa	paviršiuje susidaro meniskas, bet likęs mėginys yra kietas
E pakopa	(baigiamoji lydymosi pakopa): kietųjų dalelių nebėra.

Lydymosi temperatūros nustatymo metu temperatūra yra užrašoma lydymosi pradžioje ir baigiamojoje lydymosi stadijoje.

1.6.1.1. *Lydymosi temperatūros nustatymo prietaisai su skysčių vonios aparatu*

2 pvz., parodytas standartizuotas stiklinis lydymosi temperatūros nustatymo aparatas (JIS K 0064); visos charakteristikos pateiktos milimetrais.

2 paveikslas



▼C1

Vonios skystis

Turi būti parenkamas atitinkamas skystis. Skysčio pasirinkimas priklauso nuo lydymosi temperatūros, kurią reikia nustatyti, pvz., skystas parafinas naudojamas nustatant lydymosi temperatūrą, kuri yra ne aukštesnė kaip 473 K, o silikoninė alyva naudojama nustatant lydymosi temperatūra, kuri yra ne aukštesnė kaip 573 K.

Jei lydymosi temperatūra yra aukštesnė kaip 523 K, gali būti naudojamas mišinys iš trijų dalių sieros rūgšties ir dviejų dalių kalio sulfato (pagal masių santykį). Jeigu naudojamas toks mišinys, reikia imtis atitinkamų atsargumo priemonių.

Termometras

Turi būti naudojami tik tokie termometrai, kurie atitinka šių arba lygiaverčių standartų reikalavimus:

ASTM E 1–71, DIN 12770, JIS K 8001.

Darbo eiga

Sausa medžiaga grūstuvėje sutrinama į smulkius miltelius ir dedama į kapiliarinį vamzdelį, kurio vienas galas užlydytas, kad jį užpildžius, medžiagos sluoksnis, stipriai ją suslėgus, būtų 3 mm storio. Norint gauti tolygiai suslėgtą mėginį, kapiliarinį vamzdelį iš apytikriai 700 mm aukščio reikėtų vertikalia kryptimi paleisti per stiklinį vamzdelį ant laikrodžio stiklo.

Užpildytas kapiliarinis vamzdelis dedamas į vonią taip, kad vidurinė gyvsidabrio termometro galiuko dalis liestų vamzdelį toje vietoje, kur yra bandinys. Paprastai kapiliarinis vamzdelis dedamas į aparatą, kurio temperatūra yra apie 10 K žemesnė negu lydymosi temperatūra.

Vonios skystis šildomas taip, kad temperatūra kiltų apie 3 K/min. Skystį reikia maišyti. Kai temperatūra yra 10 K žemesnė negu laukiama lydymosi temperatūra, temperatūros didėjimo greitis yra nustatomas toks, kad neviršytų 1 K/min.

Apskaičiavimas

Lydymosi temperatūra apskaičiuojama taip:

$$T = T_D + 0{,}00016\ (T_D - T_E)\ n$$

čia:

T = koreguota lydymosi temperatūra, K

T_D = D termometro rodmenys, K

T_E = E termometro rodmenys, K

n = D termometro gyvsidabrio stulpelio padalų skaičius ant iškilusios jo dalies.

1.6.1.2. *Lydymosi temperatūros nustatymo prietaisai su metaliniu bloku*

Aparatūra

Ją sudaro:

— cilindrinis metalinis blokas, kurio viršutinė dalis yra tuščia ir sudaro ertmę (žr. 3 pav.),

— metalinis kaištis su dviem ar keliomis skylutėmis, per kurias kapiliaras įstatomas į metalinį bloką,

▼C1

— metalinio bloko kaitinimo sistema, kuri, pavyzdžiui, yra tiekiama per bloke įtaisytą elektrinę varžą,

— reostatas energijos padavimui reguliuoti, jeigu kaitinimui naudojama elektra,

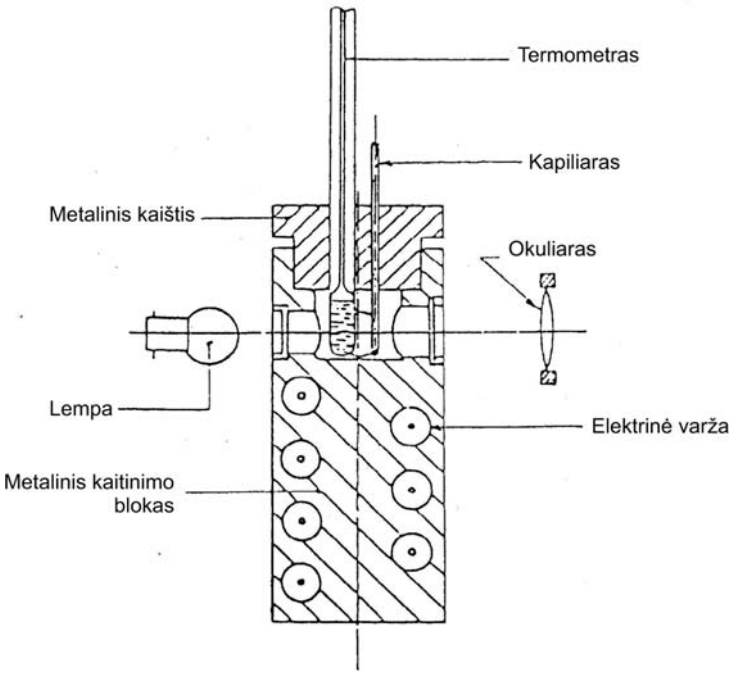
— keturi langeliai iš šilumai atsparaus stiklo išorinėse kameros sienose, esantys visiškai priešingose pusėse statmenai vienas kitam. Priešais vieną iš šių langelių yra mikroskopo okuliaras kapiliariniam vamzdeliui stebėti. Kiti trys langeliai naudojami aparato vidui apšviesti lempomis,

— kaitrai atsparaus stiklo kapiliarinis vamzdelis, viename gale užlydytas (žr. 1.6.1.1).

Termometras

Žiūrėti 1.6.1.1 punkte nurodytus standartus. Taip pat naudojami panašaus tikslumo termoelektriniai matavimo prietaisai.

3 paveikslas



1.6.1.3. *Detekcija fotoelementu*

Aparatūra ir darbo eiga

Aparatūrą sudaro metalinė kamera su automatizuota kaitinimo sistema. Trys kapiliarai užpildomi pagal 1.6.1.1 ir dedami į krosnį.

▼C1

Aparatui kalibruoti galima kelis kartus linijiniu būdu padidinti temperatūrą, o atitinkamai padidinta temperatūra yra elektriniu būdu suderinama pagal iš anksto pasirinktą konstantą ir tiesinį koeficientą. Savirašiai aparatai užrašo tikrąją krosnies temperatūrą bei kapiliaruose esančios medžiagos temperatūrą.

1.6.2. **Karštosios stadijos**

1.6.2.1. *Koflerio karštasis strypas*

Žr. priedėlį.

1.6.2.2. *Lydymosi temperatūros mikroskopas*

Žr. priedėlį.

1.6.2.3. *Menisko metodas (poliamidai)*

Žr. priedėlį.

Kaitinimo sparta lydymosi temperatūroje turėtų būti mažesnė kaip 1 K/min.

1.6.3. **Užšalimo temperatūros nustatymo metodai**

Žr. priedėlį.

1.6.4. **Terminė analizė**

1.6.4.1. *Diferencinė terminė analizė*

Žr. priedėlį.

1.6.4.2. *Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija*

Žr. priedėlį.

1.6.5. **Takumo temperatūros nustatymas**

Žr. priedėlį.

2. **DUOMENYS**

Kai kuriais atvejais reikalinga termometro korekcija.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

— naudotas metodas,

— tikslus medžiagos apibūdinimas (tapatumas ir priemaišos) ir preliminarios gryninimo, jeigu toks naudojamas, stadijos,

— tikslumo apskaičiavimas.

Ne mažiau kaip dviejų matavimų, patenkančių į apskaičiuotą tikslumo intervalą (žr. lenteles), vidurkis nurodomas kaip lydymosi temperatūra.

▼C1

Jei temperatūrų skirtumas tarp pradinės temperatūros ir temperatūros galutinėje lydymosi fazėje yra metodo tikslumo ribose, galutinės lydymosi fazės temperatūra yra laikoma lydymosi temperatūra; kitu atveju pateikiamos dvi temperatūros.

Jei medžiaga suyra ar sublimuojasi prieš pasiekiant lydymosi temperatūrą, pateikiama ta temperatūra, kuriai esant įvyko šis reiškinys.

Pateikiama visa informacija ir pastebėjimai, svarbūs duomenų aiškinimui, ypač apie medžiagoje esančias priemaišas ir jos fizikinę būseną.

4. **NUORODOS**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C (81) 30 (final).

2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II, p. 803–834.

3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.

4) IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, p. 505–515.

▼C1

Priedėlis

Papildomos techninės informacijos, pavyzdžiui, galima ieškoti toliau nurodytuose standartuose

1. **Kapiliariniai metodai**

1.1. Lydymosi temperatūros nustatymo prietaisai su skysčių vonia

ASM E 324–69	Organinių cheminių medžiagų lydymosi taško ir tirpimo pradžios ir pabaigos nustatymo standartinis metodas.
BS 46–34	Lydymosi taško ir (arba) tirpimo diapazono nustatymo metodas.
DIN 53181	Smalų lydymosi intervalo nustatymas kapiliarinio proceso metu.
JIS K 00–64	Cheminių produktų lydymosi taško nustatymo metodas.

1.2. Lydymosi temperatūros nustatymo prietaisai su metaliniu bloku

DIN 53736	Dalinių kristalinių plastmasių vizualinis lydymosi temperatūros nustatymas.
ISO 1218 (E)	Plastmasės – poliamidai – „lydymosi taško“ nustatymas.

2. **Karštosios stadijos**

2.1. Koflerio karštasis strypas

ANSI/ASTM D 3451–76	Polimerinių miltelinių dangų patikrinimo standartas.

2.2. Lydymosi temperatūros mikroskopas

DIN 53736	Dalinių kristalinių plastmasių lydymosi temperatūros vizualinis nustatymas.

2.3. Menisko metodas (poliamidai)

ISO 1218 (E)	Plastmasės – poliamidai – „lydymosi taško“ nustatymas.

▼C1

ANSI/ASTM D 2133–66	Standartinė specifikacija acetilintai dervai iš medžiagų formuoti ir štampuoti.
NF T 51–050	Poliamidų lydymosi taško nustatymas menisko metodu.

3. **Užšalimo temperatūros nustatymo metodai**

BS 4633	Kristalizacijos taško nustatymo metodas.
BS 4695	Naftos vaškų lydymosi taško nustatymo metodas. Lydymosi kreivė.
DIN 51421	Lakiųjų medžiagų, kuro ir benzolų užšalimo taško nustatymas.
ISO 2207	Naftos vaškai: lydymosi temperatūros nustatymas.
DIN 53175	Riebalų sutirštėjimo taško nustatymas.
NF T 60–114	Parafinų lydymosi taškas.
NF T 20–051	Kristalizacijos taško nustatymo metodas. Sukietėjimo taškas.
ISO 1392	Užšalimo taško nustatymo metodas.

4. **Terminė analizė**

4.1. Diferencinė terminė analizė

ASTM E 537–76	Standartinis metodas įvertinti chemikalų šiluminį stabilumą diferencijuota šilumine analize.
ASTM E 473–85	Standartinis šiluminės analizės laikotarpių nustatymas.

▼C1

ASTM E 472–86	Standartinis termoanalitinių duomenų pateikimas praktikoje.
DIN 51005	Terminė analizė, supratimas.

4.2. Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija

ASTM E 537–76	Standartinis metodas įvertinti chemikalų šiluminį stabilumą diferencijuotos šiluminės analizės metodais.
ASTM E 473–85	Šiluminės analizės standartinių laikotarpių nustatymas.
ASTM E 472–86	Standartinis termoanalitinių duomenų pateikimas praktikoje.
DIN 51005	Terminė analizė, supratimas.

5. **Takumo temperatūros nustatymas**

ASTM D 97–66	Atrinktų pavyzdžių ir naftos produktų analizė: drumstėjimo ribos nustatymas.
ASTM D 97–66	Naftos aliejų drumstimosi taško nustatymo metodas.
ISO 3016	Naftos produktai. Takumo temperatūros nustatymas.

▼C1

A.2. VIRIMO TEMPERATŪRA

1. METODAS

Dauguma apibūdintų metodų yra pagrįsti OECD Bandymų gairėmis (1). Pagrindiniai principai pateikti 2 ir 3 nuorodoje.

1.1. ĮVADAS

Čia apibūdinti metodai ir prietaisai gali būti naudojami skystoms ir lengvai besilydančioms medžiagoms, jei cheminių reakcijų, kuriose jos dalyvauja, temperatūra nėra žemesnė nei virimo temperatūra (pvz., autooksidacija, persigrupavimas, skilimas ir pan.). Šį metodą galima taikyti grynoms ir priemaišų turinčioms skystosioms medžiagoms.

Ypatingas dėmesys atkreiptinas į tuos metodus, kuriuose naudojama detekcija fotoelementu ir terminė analizė, kadangi šiais metodais galima nustatyti tiek lydymosi, tiek virimo temperatūrą. Be to, matavimus galima atlikti automatiškai.

Dinaminis metodas geras tuo, kad jį taip pat galima naudoti nustatant garų slėgį ir nebūtina virimo temperatūrą koreguoti iki normalaus slėgio (101,325 kPa), kadangi normalus slėgis matavimų metu gali būti nustatomas manostatu.

Pastabos

Priemaišų įtaka nustatant virimo temperatūrą labai priklauso nuo priemaišų pobūdžio. Jeigu mėginyje yra lakiųjų priemaišų, kurios galėtų turėti įtakos rezultatams, medžiagą reikia išgryninti.

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Normali virimo temperatūra yra apibūdinama kaip temperatūra, kurioje skysčių garų slėgis yra lygus 101,325 kPa.

Jeigu virimo temperatūra matuojama ne normaliame atmosferos slėgyje, temperatūros priklausomybė nuo garų slėgio gali būti apibūdinama Klauzijaus-Klapeirono lygtimi:

$$\log p = \left(\frac{(\Delta H_v)}{(2{,}3\ RT)} \right) + const\ .$$

čia:

p = medžiagos garų slėgis paskaliais

ΔH_v = garavimo šiluma, J mol^{-1}

R = universalioji molinė dujų konstanta = 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = termodinaminė temperatūra, K

Virimo temperatūra yra nustatoma atsižvelgiant į matavimo metu esantį aplinkos slėgį.

▼C1

Vienetų perskaičiavimas

Slėgis (vienetai: kPa)

100 kPa = 1 baras = 0,1 MPa

(„baras“ vis dar leistinas, bet nerekomenduojamas)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(neleistini vienetai „mm Hg“ ir „Torr“)

1 atm = standartinė atmosfera = 101 325 Pa

(neleistinas vienetas „atm“)

Temperatūra (vienetai: K)

$t = T - 273{,}15$

t: Celsijaus temperatūra, Celsijaus laipsniai (°C)

T: termodinaminė temperatūra, kelvinai (K)

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nebūtina naudoti etalonines medžiagas visais tais atvejais, jeigu tiriama nauja medžiaga. Pirmiausia jos turėtų būti naudojamos kartkartėmis tikrinant šio metodo veikimą ir gautų rezultatų lyginimui su kitų metodų rezultatais.

Kai kurias kalibravimo medžiagas galima rasti priede išvardytuose metoduose.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Penki virimo temperatūros (virimo intervalo) nustatymo metodai yra pagrįsti virimo temperatūros matavimu, kiti du pagrįsti termine analize.

1.4.1. **Nustatymas ebulioskopu**

Ebulioskopai buvo sukurti molekuliniam svoriui nustatyti keliant virimo temperatūrą, bet jie taip pat tinka tiksliems virimo temperatūros matavimams atlikti. Labai paprastas aparatas yra apibūdintas ASTM D 1120–72 (žr. priedėlį). Šiame aparate skystis šildomas pusiausvyros sąlygomis atmosferos slėgyje, kol užverda.

1.4.2. **Dinaminis metodas**

Šis metodas pagrįstas flegmos pakartotinio garų suskystinimo temperatūros matavimu atitinkamu termometru, jai verdant. Taikant šį metodą galima keisti slėgį.

1.4.3. **Distiliacijos metodas virimo temperatūrai nustatyti**

Šis metodas pagrįstas skysčio distiliavimu, garų pakartotinio suskystinimo temperatūros matavimu bei distiliato kiekio nustatymu.

▼C1

1.4.4. **„Siwoloboff'o“ metodas**

Bandinys šildomas mėgintuvėlyje, panardintame į kaitinimo vonioje esantį skystį. Užlydytas kapiliarinis vamzdelis, kurio apatinėje dalyje yra oro burbuliukas, panardinamas į tą patį mėgintuvėlį.

1.4.5. **Detekcija fotoelementu**

Pagal Siwoloboff'o metodą atliekamas automatinis fotoelektrinis matavimas, naudojant kylančius burbuliukus.

1.4.6. **Diferencinė terminė analizė**

Pagal šią metodiką yra užrašomi medžiagos ir etaloninės medžiagos temperatūrų skirtumai kaip temperatūros funkcija, kai medžiagai ir etaloninei medžiagai yra taikoma ta pati kontroliuojama temperatūrą programa. Jeigu bandinyje įvyksta virsmas, kurio metu pasikeičia entalpija, tą pokytį parodo endoterminis nuokrypis (virimas) nuo pagrindinės užrašytų temperatūrų linijos.

1.4.7. **Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija**

Pagal šią metodiką skirtumas tarp energijos įvesties į medžiagą ir į etaloninę medžiagą yra užrašomas kaip temperatūros funkcija, kai medžiagai ir etaloninei medžiagai yra taikoma ta pati kontroliuojama temperatūrų programa. Ši energija – tai energija, reikalinga nustatyti medžiagos ir etaloninės medžiagos nulinį temperatūrų skirtumą. Jeigu bandinyje įvyksta virsmas, kurio metu pasikeičia entalpija, tą pokytį parodo endoterminis nuokrypis (virimas) nuo pagrindinės užrašyto šilumos srauto linijos.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Skirtingų metodų, naudojamų virimo temperatūrai/virimo intervalui nustatyti, tinkamumas ir tikslumas yra pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė

Metodų palyginimas

Matavimo metodas	Apskaičiuotas tikslumas	Galiojantis standartas
Ebulioskopas	± 1,4 K (iki 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (iki 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120–72 (1)
Dinaminis metodas	± 0,5 K (iki 600 K) (2)	
Distiliavimo procesas (virimo intervalas)	± 0,5 K (iki 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Pagal Siwoloboff 'ą	± 0,2 K (iki 600 K) (2)	
Detekcija fotoelementu	± 0,3 K (373 K) (2)	
Diferencinė terminė kalorimetrija	± 0,5 K (iki 600 K) ± 0,2 K (iki 1 273 K)	ASTM E 537–76
Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija	± 0,5 K (iki 600 K) ± 0,2 K (iki 1 273 K)	ASTM E 537–76

(1) Šis tikslumas tinka tik labai paprastai priemonei, pavyzdžiui, aprašytai ASTM D 1120–72; ji gali būti patobulinta sudėtingesniais ebulioskopiniais prietaisais.

(2) Tinka tik grynoms medžiagoms. Naudojant kitokiomis sąlygomis, reikėtų pagrįsti.

▼C1

1.6. METODŲ APIBŪDINIMAS

Kai kurių mėginio metodų darbo eiga yra apibūdinta tarptautiniuose ir nacionaliniuose standartuose (žr. priedą).

1.6.1. **Ebulioskopas**

Žr. priedėlį

1.6.2. **Dinaminis metodas**

Žr. A.4 bandymo metodą. Garų slėgio nustatymas.

Užrašoma stebėta virimo temperatūra, kai slėgis 101,325 kPa.

1.6.3. **Distiliavimo procesas (virimo intervalas)**

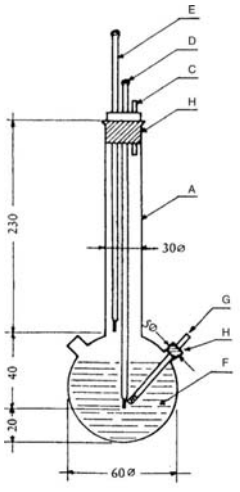
Žr. priedėlį.

1.6.4. **Siwoloboff'o metodas**

Bandinys kaitinamas mėgintuvėlyje, kurio skersmuo apie 5 mm, lydimosi temperatūros nustatymo aparate (1 pav.).

1 pvz., pavaizduotas standartizuotas lydymosi ir virimo temperatūros nustatymo aparatas (JIS K 0064) (pagamintas iš stiklo, visi duomenys nurodyti milimetrais).

1 paveikslas



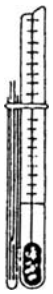
A: Matavimo indas
B: Kamštis
C: Ventiliacijos anga
D: Termometras
E: Papildomas termometras
F: Vonios skystis
G: Mėgintuvėlio vamzdelis, didžiausias išorinis skersmuo - 5 mm; kuriame yra apie 100 mm ilgio kapiliaras, vidinis skersmuo apie 1 mm, o sienelės storis - apie 0,2 - 0,3 mm
H: Šoninis vamzdelis

Kapiliarinis vamzdelis (virinimo kapiliarinis vamzdelis), kuris užlydytas 1 cm virš apatinio galo, dedamas į mėgintuvėlio vamzdelį. Bandinio yra dedama tiek, kad užlydytoji kapiliarinio vamzdelio dalis būtų žemiau skysčio paviršiaus. Mėgintuvėlio vamzdelis su virinimo kapiliariniu vamzdeliu yra pritaisomas arba prie termometro gumine juostele, arba pritvirtinamas laikikliu iš šono (žr. 2 pav.).

▼C1

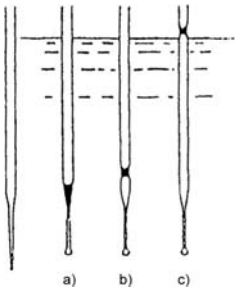
2 pav.

Pagal Siwoloboff'ą



3 pav.

Modifikuotas variantas



Vonios skystis parenkamas pagal virimo temperatūrą. Temperatūrų intervale iki 573 K, gali būti naudojama silikoninė alyva. Skystas parafinas gali būti naudojamas tik iki 473 K. Vonios skystis kaitinamas taip, kad temperatūra iš pradžių didėtų 3 K/min. Vonioje esantis skystis turi būti maišomas. Kai temperatūra siekia apie 10 K žemiau laukiamos virimo temperatūros, kaitinimas sumažinamas taip, kad temperatūros didėjimo greitis būtų 1 K/min. Artėjant prie virimo temperatūros, iš virinimo kapiliarinio vamzdelio greitai pradeda kilti burbuliukai.

Virimo temperatūra yra ta temperatūra, kai staiga atvėsinus burbuliukų nebelieka, o skystis staiga pradeda kilti kapiliariniu vamzdeliu. Termometras atitinkamai rodo medžiagos virimo temperatūrą.

Modifikuotame variante (3 pav.) virimo temperatūra nustatoma lydimosi temperatūros nustatymo kapiliariniame vamzdelyje. Jis yra išploninamas ištempiant apie 2 cm (a), išsiurbiamas nedidelis kiekis bandinio. Atvirasis plonojo kapiliaro galiukas yra užlydomas taip, kad jo gale liktų mažas oro burbuliukas. Kaitinant lydymosi temperatūros aparate (b), oro burbuliukas plečiasi. Virimo temperatūra atitinka temperatūrą, kurioje medžiagos gumulėlis pasiekia vonioje esančio skysčio paviršių (c).

1.6.5. **Detekcija fotoelementu**

Kapiliariniame vamzdelyje esantis bandinys šildomas įkaitintame metaliniame bloke.

Šviesos spindulys nukreipiamas pro bloke esančias tam tinkančias skylutes per medžiagą į tiksliai kalibruotą fotoelementą.

Didėjant mėginio temperatūrai virinimo kapiliariniame vamzdelyje atsiranda pavienių oro burbuliukų. Pasiekus virimo temperatūrą, burbuliukų labai padaugėja. Dėl to pasikeičia šviesos intensyvumas, kurį užregistruoja fotoelementas, ir paduodamas sustabdymo signalas į indikatorių, parodantį bloke esančio platininio varžinio termometro rodmenis.

Šis metodas yra ypač naudingas, kadangi leidžia atlikti nustatymus mažesnėje negu kambario temperatūroje (iki 253,15 K (-20 °C)) nedarant jokių pakeitimų aparate. Prietaisas paprasčiausiai turi būti dedamas į aušinimo vonią.

▼C1

1.6.6. **Terminė analizė**

1.6.6.1. *Diferencinė terminė analizė*

Žr. priedėlį.

1.6.6.2. *Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija*

Žr. priedėlį.

2. **DUOMENYS**

Esant nedideliems nukrypimams nuo normalaus slėgio (daugiausiai ± 5 kPa), virimo temperatūra normalizuojama iki T_n naudojantis tokiomis Sidney Young skaitmeninių verčių lygtimis:

$T_n = T + (f_T \times \Delta p)$

čia:

$\Delta p = (101{,}325 - p)$ [pastaba]

P = slėgio matavimas, kPa

f_T = virimo temperatūros pokyčio greitis, slėgis K/kPa

T = išmatuota virimo temperatūra, K

T_n = virimo temperatūra, koreguota iki normalaus slėgio, K

Daugelio medžiagų temperatūros korekcijos koeficientai f_T ir jų aproksimacijos lygtys yra įtrauktos į anksčiau minėtus tarptautinius ir nacionalinius standartus.

Pavyzdžiui, DIN 53171 metodas nurodo tokias apytikres korekcijas dažuose esantiems tirpikliams:

2 lentelė

Temperatūra. Korekcijos koeficientai f_T

Temperatūra T (K)	Korekcijos koeficientas f_T (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

▼C1

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

Į bandymo ataskaitą, jeigu įmanoma, įtraukiama tokia informacija:

— naudotas metodas,

— tikslus medžiagos apibūdinimas(tapatumas ir priemaišos) ir preliminarios gryninimo, jeigu toks naudojamas, stadijos,

— tikslumo apskaičiavimas.

Ne mažiau kaip dviejų matavimų, patenkančių į apskaičiuotą tikslumo intervalą (žr. 1 lentelę), vidutinė temperatūra nurodoma kaip virimo temperatūra.

Nurodomos išmatuotos virimo temperatūros ir jų vidurkiai, o slėgis (iai), kuriame buvo atlikti šie matavimai, nurodomas kPa. Pageidautina, kad slėgis būtų artimas normaliam atmosferos slėgiui.

Pateikiama visa informacija ir pastebėjimai, svarbūs duomenų aiškinimui, ypač apie medžiagoje esančias priemaišas ir jos fizikinę būseną.

4. **NUORODOS**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C (81) 30 final.

2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, editions. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, volume II.

3) R. Weissberger edition: Technique of organic chemistry, Physical methods of organic chemistry, Third Edition, Interscience Publications, New York, 1959, volume I, Part I, Chapter VIII.

▼C1

Priedėlis

Papildomos techninės informacijos, pavyzdžiui, galima ieškoti toliau nurodytuose standartuose

1. **Ebulioskopas**

1.1. Lydymosi temparatūros nustatymo prietaisai su skysčių vonia

ASTM D 1120–72	Standartinis automobilių antifrizo virimo taško tyrimo metodas.

2. **Distiliavimo procesas (virimo intervalas)**

ISO/R 918	Distiliacijos tyrimo metodas. Distiliacijos eiga ir diapozonas.
BS 4349/68	Distiliacijos naftos produktuose nustatymo metodas.
BS 4591/71	Distiliacijos charakteristikų nustatymo metodas.
DIN 53171	Pagrindiniai rodikliai. Virimo nustatymas.
NF T 20–608	Distiliacija: distiliacijos intervalo nustatymas.

3. **Diferencinė terminė analizė ir diferencinė skenuojamoji kalorimetrija**

ASTM E 537–76	Standartinis metodas chemikalų įvertinimo metodas diferencijuotos šiluminės analizės metodais.
ASTM E 473–85	Standartinis šiluminės analizės nustatymas.
ASTM E 472–86	Šiluminės analizės duomenų panaudojimo standartas.
DIN 51005	Šiluminė analizė: sąvokos.

▼C1

A.3. SANTYKINIS TANKIS

1. METODAS

Apibūdintieji metodai yra pagrįsti OECD bandymų gairėmis (1). Pagrindiniai principai yra pateikti 2 nuorodoje.

1.1. ĮVADAS

Santykinio tankio nustatymo metodai taikomi tiriant skystąsias ir kietąsias medžiagas nepriklausomai nuo jų grynumo.. Naudotini metodai pateikti 1 lentelėje.

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Skystųjų ir kietųjų medžiagų santykinis tankisD_4^{20} yra tam tikro tiriamosios medžiagos tūrio masės, esant 20 °C, ir tokio paties tūrio vandens masės, esant 4 °C temperatūrai, santykis. Santykinis tankis yra bedimensis dydis.

Medžiagos tankis ρ yra jos masės m ir tūrio v dalmuo.

Tankis, ρ, SI vienetais nurodomas – kg/m^3.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS (1) (3)

Nebūtina etalonines medžiagas naudoti visais atvejais, kai tiriama nauja medžiaga. Pagrindinis etaloninių medžiagų naudojimo tikslas yra periodiškai patikrinti metodo kokybę ir užtikrinti gautų rezultatų palyginamumą su kitais metodais gautų bandymų duomenimis.

1.4. METODO PRINCIPAS

Naudojamos keturios bandymų metodų klasės.

1.4.1. **Plūdrumo metodai**

1.4.1.1. *Hidrometras* (skystosioms medžiagoms)

Tankis gali būti pakankamai tiksliai ir greitai nustatomas plūdriaisiais hidrometrais, kurie leidžia nustatyti skysčio tankį pagal imersijos gylį remiantis graduotos skalės parodymais.

1.4.1.2. *Hidrostatinis balansas* (skystosioms ir kietosioms medžiagoms)

Mėginio, pasverto ore ir atitinkamame skystyje (pvz., vandenyje) svorių skirtumas gali būti naudojamas tankiui nustatyti.

Kietiesiems kūnams nustatytas kietųjų medžiagų tankis taikytinas tik tirtam bandiniui. Nustatant skysčių tankį, žinomo tūrio v kūnas yra sveriamas iš pradžių ore, po to – skystyje.

1.4.1.3. *Panardintų kūnų metodas* (skystosioms medžiagoms) (4)

Pagal šį metodą skysčio tankis yra nustatomas pagal duomenų, gautų sveriant skystį prieš žinomo tūrio kūno panardinimą į jį, panardinus į jį ir ištraukus iš jo, skirtumą.

▼C1

1.4.2. **Piknometrijos metodai**

Kietiesiems kūnams ir skysčiams gali būti naudojami įvairių formų ir žinomo tūrio piknometrai. Tankis apskaičiuojamas paėmus pilno ir tuščio piknometro svorio ir jo žinomo tūrio skirtumą.

1.4.3. **Oro palyginamasis piknometras** (kietiesiems kūnams)

Bet kokios formos kietojo kūno tankį galima išmatuoti kambario temperatūroje su dujų palyginamuoju piknometru. Medžiagos tūris matuojamas įvairaus tūrio graduotais cilindrais ore arba inertinėse dujose. Užbaigus tūrio matavimą, tankio apskaičiavimams vieną kartą matuojama masė.

1.4.4. **Osciliacinis densitometras** (5) (6) (7)

Skysčio tankis gali būti matuojamas osciliaciniu densitometru. U formos vamzdelio mechaninis osciliatorius vibruojamas osciliatoriaus rezonanso dažniu, kuris priklauso nuo jo masės. Įdėjus tiriamosios medžiagos, pakinta osciliatoriaus rezonansinis dažnis. Aparatas turi būti kalibruojamas pagal dvi žinomo tankio skystąsias medžiagas. Geriau šias medžiagas parinkti taip, kad jų tankiai apimtų matuotiną intervalą.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Skirtingų metodų, naudojamų santykiniam tankiui nustatyti, pritaikymo galimybė pateikta lentelėje.

1.6. METODO APIBŪDINIMAS

Standartai, kuriuose, pavyzdžiui, reikėtų ieškoti informacijos apie papildomus techninius ypatumus, yra pateikti priede.

Tyrimai turi vykti 20 °C temperatūroje, atliekant ne mažiau kaip du matavimus.

2. **DUOMENYS**

Žr. standartus.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

Ataskaitoje apie tyrimą, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

— naudotas metodas,

— tikslus medžiagos apibūdinimas(tapatumas ir priemaišos) bei preliminarios gryninimo, jeigu toks naudojamas, stadijos.

Santykinis tankis D_4^{20} pateikiamas kaip apibrėžta 1.2 punkte, kartu pateikiant duomenis apie matuotos medžiagos fizinę būseną.

Pateikiama visa informacija ir pastebėjimai, svarbūs duomenų aiškinimui, ypač apie medžiagoje esančias priemaišas ir jos fizikinę būseną.

▼C1

Lentelė

Metodų tinkamumas

Matavimo metodas	Tankis		Didžiausia galima dinaminė klampa	Galiojantys standartai
	Kietieji kūnai	Skysčiai		
1.4.1.1. Hidrometras		Taip	5 Pa s	ISO 387 ISO 649–2 NF T 20–050
1.4.1.2. Hidrostatinis balansas				
a) kietieji kūnai	Taip			ISO 1183 (A)
b) skysčiai		Taip	5 Pa s	ISO 901 ir 758
1.4.1.3. Panardintų kūnų metodas		Taip	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Piknometrija				ISO 3507
a) kietieji kūnai	Taip			ISO 1183(B) NF T 20–053
b) skysčiai		Taip	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Oro palyginamasis piknometras	Taip			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4. Osciliacinis densitometras		Taip	5 Pa s	

4. **NUORODOS**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, Decision of the Council C(81) 30 final.

2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part 1.

3) IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, p. 508.

4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol.ll, p. 427–430.

5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, p. 297–302.

6) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen –Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, p. 717–726.

7) Riemann, J., Der Einsatz der digital en Dichtemessung im Braureilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, p. 253–255.

▼C1

Priedėlis

Papildomos techninės informacijos, pavyzdžiui, galima ieškoti toliau nurodytuose standartuose

1. **Plūdrumo metodai**

1.1. Hidrometras

DIN 12790, ISO 387	Hidrometras. Bendrosios instrukcijos.
DIN 12791	I d. Tankio hidrometrai. Konstrukcija, pritaikymas ir naudojimas. I d. Tankio hidrometrai. Standartiniai dydžiai, ženklinimas. III d. Naudojimas ir patikra.
ISO 649–2	Laboratoriniai stikliniai indai. Bendros paskirties tankio hidrometrai
NF T 20–050	Cheminiai produktai pramoniniam naudojimui. Skysčių tankio Nustatymas. Areometrinis metodas
DIN 12793	Laboratoriniai indai. Bendrosios paskirties tankio hidrometrai. Hidrometrai intervalams nustatyti.

1.2. Hidrostatinis balansas

Kietosioms medžiagoms

ISO 1183	A metodas. Plastikų tankio ir santykinio tankio nustatymo metodai, išskyrus akytųjų plastikų
NF T 20–049	Cheminiai produktai pramoniniam naudojimui. Kietųjų kūnų, išskyrus miltelių ir akytųjų medžiagų, tankio nustatymas. Hidrostatinio balanso metodas
ASTM-D-792	Plastmasių specifinio sunkio ir tankio nustatymas išstūmimu
DIN 53479	Plastmasių ir elastinių medžiagų tyrimas; tankio nustatymas

Skystosioms medžiagoms

ISO 901	ISO 758

▼C1

DIN 51757	Mineralinių alyvų ir susijusių medžiagų tyrimas; tankio nustatymas

ASTM D 941–55, ASTM D 1296–67 ir ASTM D 1481–62

ASTM D 1298	Žalios naftos ir skystųjų naftos produktų tankio, specifinio ar API tankio nustatymas hidrometrijos metodu.
BS 4714	Žalios naftos ir skystųjų naftos produktų tankio, specifinio ar API tankio nustatymas hidrometrijos metodu.

1.3. Panardintų kūnų metodas

DIN 53217	Dažų, lakų ir panašių dengiančiųjų medžiagų tyrimas; tankio nustatymas; panardintų kūnų metodas

2. **Piknometrijos metodai**

2.1. Skystosioms medžiagoms

ISO 3507	Piknometrai
ISO 758	Skystieji cheminiai produktai; tankio nustatymas 20 °C temperatūroje
DIN 12797	*Gay-Lussac* piknometras (nelakiems ir mažai klampiems skysčiams skysčiams,)
DIN 12798	*Lipkin* piknometras (skysčiams, kurių kinematinė klampa mažesnė kaip $100 \times 10\text{-}6\ m^2\ s^{-1}$ 15 °C temperatūroje)
DIN 12800	*Sprengel* piknometras (skysčiams pagal DIN 12798)
DIN 12801	*Reischauer* piknometras (skysčiams, kurių kinematinė klampa mažesnė kaip $100 \times 10\text{-}6\ m^2\ s^{-1}$ 20 °C temperatūroje, taip pat taikoma angliavandeniams ir vandens tirpalams su aukštesniu garų slėgiu, apytiksliai 1 baras 90 °C temperatūroje)

▼C1

DIN 12806	*Hubbard* piknometras (visų rūšių klampiems skysčiams, kurių slėgis nėra per aukštas, ypač dažams, lakui ir bitumui)
DIN 12807	*Bingham* piknometras (skysčiams, pagal DIN 12801)
DIN 12808	*Jaulmes* piknometras (ypač etanolio - vandens mišiniams)
DIN 12809	Piknometras su pagrindiniu termometru ir kapiliariniu vamzdeliu (skysčiams, kurie nėra per klampūs)
DIN 53217	Dažų, lakų ir panašių produktų tyrimas; tankio nustatymas piknometru
DIN 51757	7 punktas. Mineralinių alyvų ir susijusių medžiagų tyrimas; tankio nustatymas
ASTM D 297	15 skirsnis. Gumos produktai – cheminė analizė
ASTM D 2111	C metodas. Halogeninti organiniai junginiai
BS 4699	Naftos produktų specifinio sunkio ir tankio nustatymo metodas (graduoto dviejų kapiliarų piknometro metodas).
BS 5903	Naftos produktų santykinio tankio ir tankio nustatymo metodas kapiliariniu – užkimštu piknometru
NF T 20–053	Cheminiai produktai pramoniniam naudojimui. Milteliuose ir skysčiuose esančių kietųjų dalelių tankio nustatymas. Piknometrijos metodas.

▼C1

2.2.	Kietosioms medžiagoms	
	ISO 1183	B metodas. Plastikų, išskyrus akytųjų, tankio ir santykinio tankio nustatymo metodai
	NF T 20–053	Cheminiai produktai pramoniniam naudojimui. Milteliuose ir skysčiuose esančių kietųjų dalelių tankio nustatymas. Piknometrijos metodas
	DIN 19683	Dirvožemių tankio nustatymas
3.	**Oro palyginamasis piknometras**	
	DIN 55990	3 dalis: Dažų ir kitų dangų tyrimas. Lako milteliai. Tankio nustatymas.
	DIN 53243	Dažančios medžiagos. Chlorinti polimerai. Nustatymas.

▼M1

A.4. GARŲ SLĖGIS

1. METODAS

Šis metodas atitinka OECD TG 104 (2004).

1.1. ĮVADAS

Į pataisytąją A.4 metodo (1) versiją įtrauktas vienas papildomas metodas, t.y., efuzijos metodas: izoterminė termogravimetrija, skirtas cheminėms medžiagoms, kurių garų slėgis yra labai mažas (iki 10^{-10} Pa). Atsižvelgiant į metodikų poreikį, ypač tokių, kurios tiktų žemo garų slėgio medžiagoms, kitos šio metodo metodikos yra pakartotinai įvertintos dėl jų tinkamumo kitiems slėgio intervalams.

Termodinaminės pusiausvyros sąlygomis grynosios medžiagos garų slėgis yra tik temperatūros funkcija. Pagrindiniai metodo principai aprašyti kitur (2)(3).

Jokia viena matavimo metodika netinka garų slėgiui matuoti intervale nuo mažiau kaip 10^{-10} iki 10^5 Pa. Šį metodą sudaro aštuoni garų slėgio matavimo metodai, kurie gali būti taikomi skirtingiems garų slėgio intervalams. Įvairių metodų taikymo atvejai ir matavimo intervalai pateikti 1 lentelėje. Metodai gali būti taikomi tik bandymo sąlygomis patvariems junginiams. Jei bandymo metodai negali būti taikomi dėl techninių priežasčių, garų slėgį irgi galima įvertinti, o rekomenduojamas įvertinimo metodas aprašytas priedėlyje.

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Medžiagos garų slėgis apibrėžiamas kaip sočiųjų garų slėgis virš kietosios arba skystosios medžiagos.

Reikėtų naudoti SI slėgio vienetą – Paskalį (Pa). Čia pateikiami istoriškai naudoti vienetai ir faktoriai jiems perskaičiuoti:

1 toras	=	1 mm Hg	=	$1{,}333 \times 10^2$ Pa
1 atmosfera	=	$1{,}013 \times 10^5$ Pa		
1 baras	=	10^5 Pa		

SI temperatūros vienetas – kelvinas (K). Temperatūrai Celsijaus laipsniais perskaičiuoti į Kelvino laipsnius taikoma formulė:

$$T = t + 273{,}15$$

čia, T – Kelvino arba termodinaminė temperatūra ir t – Celsijaus temperatūra.

▼**M1**

1 lentelė

Matavimo metodas	Medžiagos		Pakartojamumo įvertis	Atkuriamumo įvertis	Rekomenduojamas intervalas
	kietosios	skystosios			
Dinaminis metodas	Žema lyd. temp.	Taip	iki 25 % 1–5 %	iki 25 % 1–5 %	10^3 Pa – 2×10^3 Pa 2×10^3 Pa – 10^5 Pa
Statinis metodas	Taip	Taip	5–10 %	5–10 %	10 Pa – 10^5 Pa 10^{-2} Pa – 10^5 Pa (1)
Izoteniskopo metodas	Taip	Taip	5–10 %	5–10 %	10^2 Pa – 10^5 Pa
Efuzijos metodas: garų slėgio pusiausvyra	Taip	Taip	5–20 %	iki 50 %	10^{-3} – 1 Pa
Efuzijos metodas: *Knudseno* kamera	Taip	Taip	10–30 %	—	10^{-10} – 1 P
Efuzijos metodas: izoterminė termogravimetrija	Taip	Taip	5–30 %	iki 50 %	10^{-10} – 1 Pa
Dujų soties metodas	Taip	Taip	10–30 %	iki 50 %	10^{-10} – 10^3 Pa
Sukamojo rotoriaus metodas	Taip	Taip	10–20 %	—	10^{-4}-0,5 Pa

(1) Naudojant talpinį slėgmatį.

1.3. BANDYMO ESMĖ

Apskritai, garų slėgis nustatomas įvairioje temperatūroje. Ribotame temperatūros intervale grynos medžiagos garų slėgio logaritmas yra tiesinė atvirkštinės termodinaminės temperatūros funkcija pagal supaprastintą Klapeirono-Klauzijaus lygtį:

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

čia:

p = garų slėgis Paskaliais

ΔHv = garavimo šiluma J mol^{-1}

R = universalioji dujų konstanta, 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = temperatūra K.

▼M1

1.4. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Etaloninių medžiagų naudoti nebūtina. Visų pirma, jos skirtos kartkarčiais patikrinti metodo taikomąsias savybes ir lyginti skirtingais metodais gautus rezultatus.

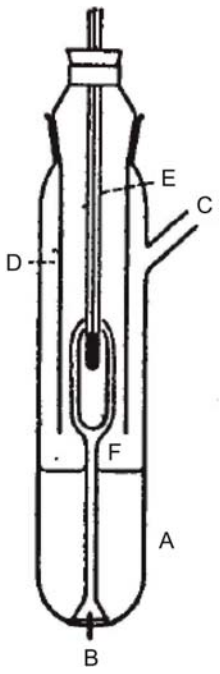
1.5. METODŲ APRAŠYMAS

1.5.1. **Dinaminis metodas (Cottrell'o metodas)**

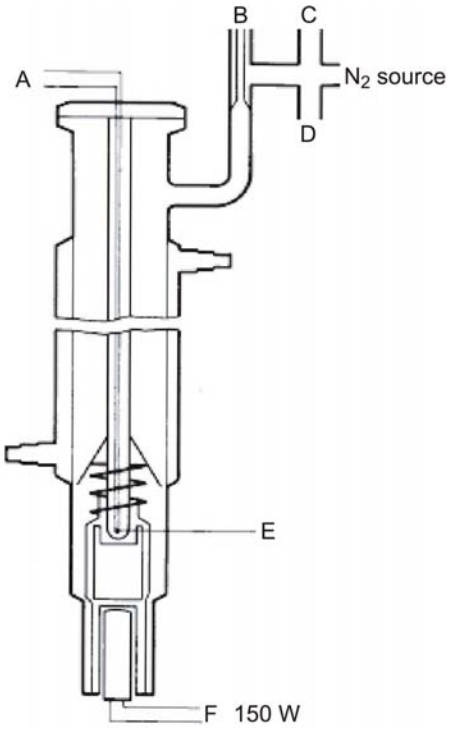
1.5.1.1. *Metodo esmė*

Garų slėgis nustatomas matuojant medžiagos virimo temperatūrą esant įvairiems apibrėžtiems slėgiams nuo maždaug 10^3 iki 10^5 Pa. Be to, šis metodas rekomenduojamas virimo temperatūrai nustatyti. Šiuo atveju jis tinka iki 600 K. Dėl skysčių stulpelio hidrostatinio slėgio jų virimo temperatūra 3–4 cm gylyje yra maždaug 0,1 °C aukštesnė nei paviršiuje. Taikant *Cottrell'o* metodą (4), termometras laikomas garuose virš skysčio paviršiaus, o verdantis skystis visą laiką siurbiamas virš termometro burbuliuko. Burbuliuką dengia skysčio, esančio pusiausvyroje su garais atmosferos slėgyje, sluoksnis. Taigi termometras rodo tikrąją virimo temperatūrą, kai nėra paklaidos dėl perkaitinimo arba hidrostatinio slėgio. Siurblys, kurį pirmą kartą panaudojo *Cottrell'as*, pavaizduotas 1 paveiksle. Verdantis skystis yra A mėgintuvėlyje. Į jo dugną įlydyta platinos viela B užtikrina tolygų virimą. Šoninis vamzdelis C sujungtas su kondensatoriumi, o apvalkalas D apsaugo termometrą E nuo šalto kondensato. Kai skystis A mėgintuvėlyje verda, piltuvu sugauti burbuliukai ir skystis pilami nuo dviejų siurblio F atšakų ant termometro burbuliuko.

1 paveikslas



2 paveikslas



▼**M1**

Cottrell'o siurblys (4)

A: Termopora

B: Vakuumo buferinis tūris

C: Slėgmatis

D: Vakuumas

E: Matavimo taškas

F: Kaitinimo elementas *c.a.* 150 W

1.5.1.2. *Aparatūra*

Labai tikslus aparatas, taikantis *Cottrell'o* principą, pavaizduotas 2 paveiksle. Jį sudaro vamzdis su virintuvo skyriumi apatinėje dalyje, aušintuvu vidurinėje dalyje ir išleidžiamąja anga bei junge viršutinėje dalyje. *Cottrell'o* siurblys įstatomas į virintuvo dalį, kaitinamą elektriniu kaitintuvu. Temperatūra matuojama dengtąja termopora arba varžiniu termometru, įstatomu per jungę viršuje. Išleidžiamoji anga jungiama su slėgio reguliavimo sistema. Pastarąją sudaro vakuuminis siurblys, buferinis tūris, slėgio stabilizatorius azotui, kuriuo reguliuojamas slėgis, įleisti ir slėgmatis.

1.5.1.3. *Darbo eiga*

Medžiaga dedama į virintuvo skyrių. Gali kilti problemų, jei kietosios medžiagos ne milteliai, bet jas kartais galima išspręsti šildant aušinimo gaubtą. Jungės vietoje aparatūra sandariai uždaroma ir medžiaga nudujinama. Taikant šį metodą, negalima matuoti putojančių medžiagų garų slėgio.

Nustatomas mažiausias reikiamas slėgis ir įjungiamas kaitinimas. Tuo pat metu prie savirašio prijungiamas temperatūros jutiklis.

Pusiausvyra pasiekiama, kai pastoviame slėgyje užrašoma pastovi virimo temperatūra. Ypač reikia stengtis išvengti verdančio skysčio šuolių. Be to, ant aušintuvo turi įvykti visiška kondensacija. Nustatant žemos lydymosi temperatūros kietųjų medžiagų garų slėgį, reikėtų žiūrėti, kad neužsikimštų kondensatorius.

Užrašius šią pusiausvyrinę temperatūrą, nustatomas didesnis slėgis. Procesas tęsiamas tuo pačiu būdu tol, kol pasiekiamas 10^5 Pa slėgis (viso maždaug nuo 5 iki 10 matavimo taškų). Siekiant patikrinti, pusiausvyrinės temperatūros vertės turi būti nustatytos mažinant slėgį.

1.5.2. **Statinis metodas**

1.5.2.1. *Metodo esmė*

Taikant statinį metodą (5), tam tikroje temperatūroje nustatomas termodinaminę pusiausvyrą atitinkantis garų slėgis. Šis metodas tinka medžiagoms ir daugiakomponenčiams skysčiams bei kietosioms medžiagoms intervale nuo 10^{-1} iki 10^5 Pa, be to, jei būtų imtasi atsargumo priemonių, intervale nuo 1 iki 10 Pa.

▼M1

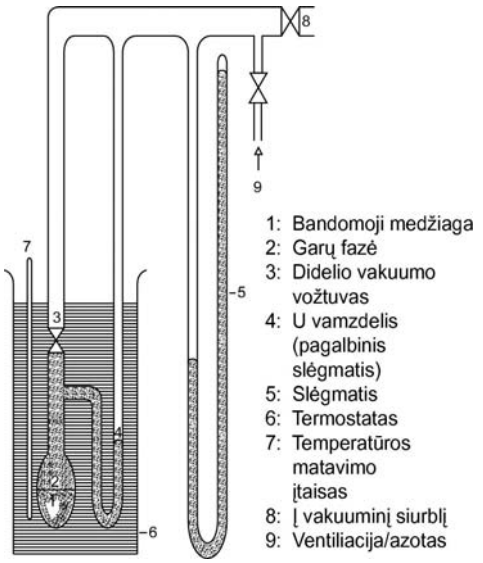
1.5.2.2. *Aparatūra*

Įrangą sudaro pastovios temperatūros vonia (preciziškumas ±0,2 K), indas medžiagai, prijungtas prie vakuumo, slėgmatis ir sistema slėgiui reguliuoti. Ėminio kamera (3a paveikslas) prijungiama prie vakuumo per vožtuvą ir diferencinį slėgmatį (U vamzdelį, pripildytą atitinkamo slėgmačio skysčio), kuris naudojamas kaip nulio rodytuvas. Diferenciniam slėgmačiui pildyti tinka gyvsidabris, polisiloksanai ir ftalatai, atsižvelgiant į slėgio intervalą ir bandomosios medžiagos chemines savybes. Tačiau, jei įmanoma, dėl aplinkos problemų reikėtų vengti naudoti gyvsidabrį. Bandomoji medžiaga neturi pastebimai tirpti U vamzdelio skystyje arba su juo reaguoti. Vietoj U vamzdelio galima naudoti slėgmatį (3b paveikslas). Slėgmačiui pildyti tinka gyvsidabris slėgio intervale nuo normalaus iki 10^2 Pa slėgio, o polisiloksaniniai skysčiai ir ftalatai – nuo mažesnio kaip 10^2 Pa iki 10 Pa slėgio. Yra kiti slėgmačiai mažesniam kaip 10^2 Pa slėgiui matuoti ir kaitinamos membranos talpiniai manometrai tinka matuoti net mažesnį kaip 10^{-1} Pa slėgį. Matuojama indo su ėminiu išorinės sienelės temperatūra arba temperatūra pačiame inde.

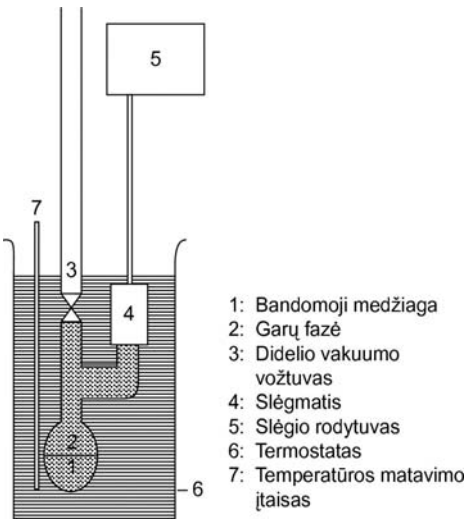
1.5.2.3. *Darbo eiga*

Naudodami 3a paveiksle pavaizduotą aparatą, pripildykite U vamzdelį pasirinktu skysčiu, kuris turi būti nudujintas aukštesnėje temperatūroje prieš užrašant rodmenis. Bandomoji medžiaga dedama į aparatą ir nudujinama žemesnėje temperatūroje. Jei ėminys daugiakomponentis, temperatūra turėtų būti pakankamai žema, kad negalėtų pakisti medžiagos sudėtis. Pusiausvyra greičiau pasiekiama maišant. Ėminį galima atšaldyti skystu azotu arba sausu ledu, tačiau reikėtų imtis priemonių išvengti oro drėgmės arba siurblio skysčio kondensacijos. Atidarius ėminio indo vožtuvą, kelias minutes siurbiama orui pašalinti. Prireikus nudujinimas kartojamas kelis kartus.

3a paveikslas



3b paveikslas



▼M1

Kai uždarius vožtuvą ėminys kaitinamas, garų slėgis didėja. Tai keičia skysčio U vamzdelyje pusiausvyrą. Jai atstatyti į aparatą leidžiamas azotas arba oras tol, kol slėgio skirtumo rodytuvas vėl rodo nulį. Pusiausvyrai pasiekti būtinas slėgis gali būti matuojamas slėgmačiu arba didesnio preciziškumo prietaisu. Šis slėgis atitinka medžiagos garų slėgį matuojamoje temperatūroje. Naudojant 3 b paveiksle pavaizduotą aparatą, garų slėgis rodomas tiesiogiai.

Garų slėgis nustatomas atitinkamai mažiems temperatūros intervalams (viso maždaug nuo 5 iki 10 matavimo taškų) iki reikiamos aukščiausios temperatūros.

Kaip tikrinimo priemonė, turi būti pakartotinai gauti rodmenys mažinant temperatūrą. Jei kartotinių matavimų rodmenys neatitinka didėjančios temperatūros kreivei gautų rodmenų, to priežastimi gali būti šios aplinkybės:

i) ėminyje vis dar yra oro (pvz., labai klampių medžiagų atveju) arba žemos virimo temperatūros medžiagų, kuri arba kurios išsiskiria kaitinant;

ii) vyksta medžiagos cheminė reakcija tiriamame temperatūros intervale (pvz., skilimas, polimerizacija).

1.5.3. **Izoteniskopo metodas**

1.5.3.1. *Metodo esmė*

Izoteniskopas (6) pagrįstas statinio metodo principu. Taikant metodą, ėminys dedamas į pastovios temperatūros kolbutę, jungiamą su slėgmačiu ir vakuuminiu siurbliu. Lakesnės nei medžiaga priemaišos šalinamos nudujinant sumažintame slėgyje. Ėminio garų slėgis pasirinktoje temperatūroje pusiausvirinamas matuojamu inertiniu dujų slėgiu. Izoteniskopas buvo sukurtas tam tikrų skystųjų angliavandenilių garų slėgiui matuoti, bet jis tinka ir kietosioms medžiagoms tirti. Metodas paprastai netinka daugiakomponentėms sistemoms. Rezultatų paklaidos yra mažos tik tokiu atveju, jei ėminiai turi nelakių priemaišų. Rekomenduojamas intervalas nuo 10^2 iki 10^5 Pa.

1.5.3.2. *Aparatūra*

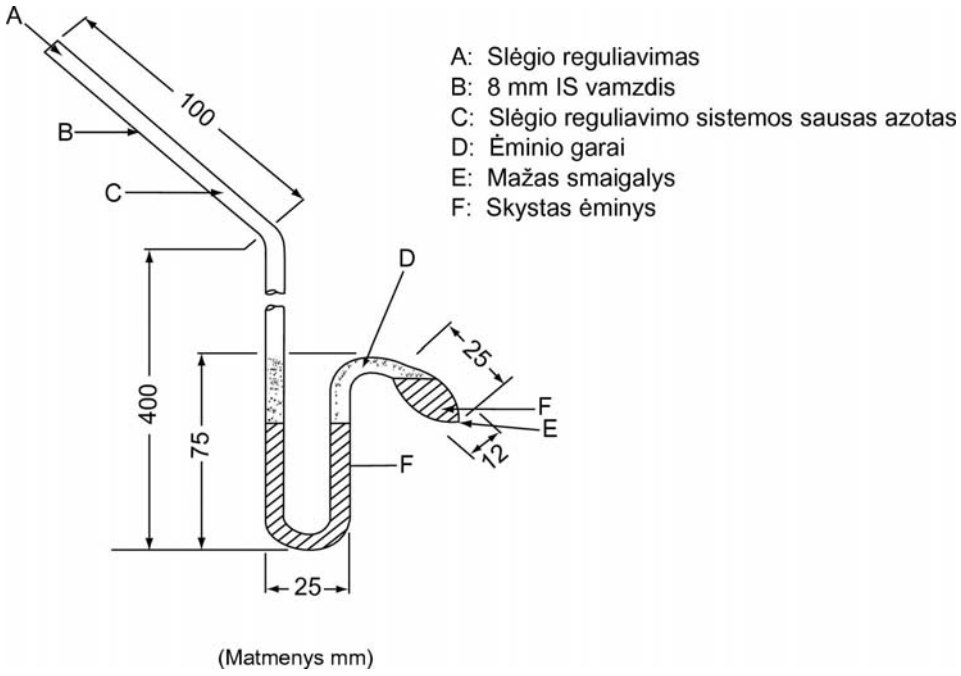
Matavimo įtaiso pavyzdys pavaizduotas 4 paveiksle. Visą aprašymą galima rasti ASTM D 2879–86 (6).

▼M1

1.5.3.3. *Darbo eiga*

Skysčių atveju pati medžiaga naudojama kaip diferencinio slėgmačio skystis. Į izoteniskopą įpilama skysčio, kurio kiekio pakanka kolbutei ir trumpajai slėgmačio atšakai pripildyti. Izoteniskopas jungiamas prie vakuumavimo sistemos ir išsiurbus orą pripildomas azoto. Sistemos išsiurbimas ir prapūtimas kartojamas du kartus deguonies likučiui pašalinti. Pripildytas izoteniskopas dedamas į horizontalią padėtį, taigi ėminys plonu sluoksniu pasklinda ėminio kolbutėje ir slėgmatyje. Sistemos slėgis sumažinamas iki 133 Pa ir ėminys iš lėto kaitinamas tol, kol pradeda virti (šalinamos ištirpusios dujos). Izoteniskopas statomas taip, kad ėminys vėl subėgtų į kolbutę ir užpildytų trumpąją slėgmačio atšaką. 133 Pa slėgis nekeičiamas. Ištemptas kolbutės smaigalys kaitinamas silpna liepsna tol, kol susidarę ėminio garai išsiplečia tiek, kad dalis ėminio išstumiama iš viršutinės kolbutės dalies ir slėgmačio atšakos į slėgmatį, sudarydami garais užpildytą ir azoto neturinčią erdvę. Izoteniskopas dedamas į pastovios temperatūros vonią ir azoto slėgis sulyginamas su ėminio slėgiu. Esant pusiausvyrai, azoto slėgis atitinka medžiagos garų slėgį.

4 paveikslas



Kietųjų medžiagų atveju naudojami slėgmačio skysčiai, pvz., polisiloksaniniai skysčiai arba ftalatai, atsižvelgiant į taikomus slėgio ir temperatūros intervalus. Nudujintas slėgmačio skystis supilamas į izoteniskopo ilgosios atšakos pastorintą vietą. Tiriama kietoji medžiaga dedama į ėminio kolbutę ir nudujinama padidintoje temperatūroje. Izoteniskopas palenkiamas, kad slėgmačio skystis galėtų tekėti į U vamzdelį.

▼M1

1.5.4. **Efuzijos metodas: garų slėgio pusiausvyra** (7)

1.5.4.1. *Metodo esmė*

Bandomosios medžiagos ėminys kaitinamas mažoje krosnyje ir dedamas po gaubtu, iš kurio išsiurbiamas oras. Krosnis uždengiama dangčiu, kuriame yra mažos žinomo skersmens skylutės. Per vieną iš skylučių išeinantys medžiagos garai nukreipiami į svarstyklių, kurios irgi yra po išsiurbtu gaubtu, lėkštę. Pagal kai kurias schemas svarstyklių lėkštė yra apgaubta šaldymo kamera, kuri sklaido šilumą į išorę tik šiluminio laidumo dėka, ir aušinama tik spinduliavimu, taigi išeinantys garai kondensuojasi ant lėkštės. Garų srauto kinetinė energija veikia lėkštę kaip jėga. Garų slėgis gali būti gautas dviem būdais: tiesiogiai pagal svarstyklių lėkštę veikiančią jėgą ir dar pagal garavimo spartą, taikant *Hertzo-Knudseno* lygtį (2):

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

čia:

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

M = molinė masė (g mol^{-1})

T = temperatūra (K)

R = universalioji dujų konstanta (J mol^{-1} K^{-1})

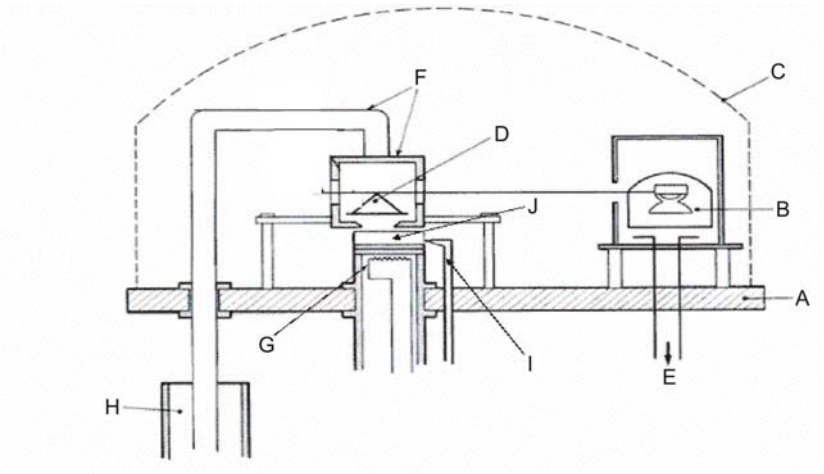
P = garų slėgis (Pa)

Rekomenduojamas intervalas yra nuo 10^{-3} iki 1 Pa.

1.5.4.2. *Aparatūra*

Bendroji aparatūros schema pavaizduota 5 paveiksle.

5 paveikslas



A: Pagrindo plokštė

B: Judamosios ritės prietaisas

C: Gaubtas

D: Svarstyklės ir jų lėkštė

E: Vakuumetras

F: Šaldymo kamera ir šaldymo strypas

G: Garinimo krosnis

H: Diuaro indas su skystu azotu

I: Ėminio temperatūros matuoklis

J: Bandomoji medžiaga

▼M1

1.5.5. **Efuzijos metodas: Knudseno kamera**

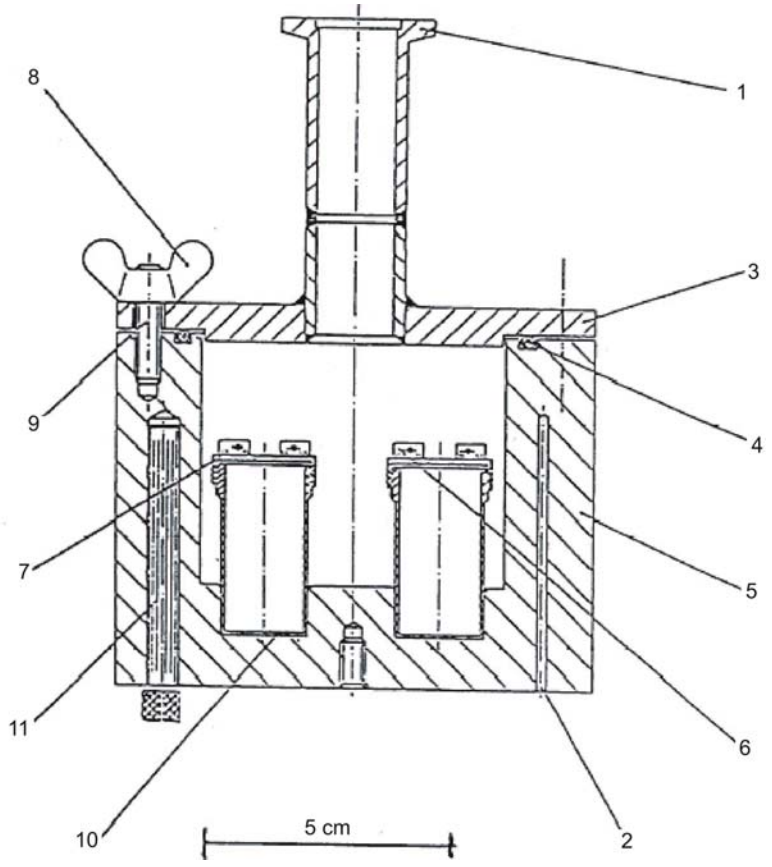
1.5.5.1. *Metodo esmė*

Taikant metodą, įvertinama bandomosios medžiagos masė, per laiko vienetą ištekanti garų pavidalu iš *Knudseno* kameros (8) per mažą angą ypač didelio vakuumo sąlygomis. Ištekančių garų masę galima nustatyti pagal kameros masės mažėjimą arba kondensuojant garus žemoje temperatūroje ir išgaravusios medžiagos kiekį nustatant chromatografijos metodu. Garų slėgis apskaičiuojamas, taikant *Hertz-Knudsen* lygtį (žr. 1.5.4.1 skirsnį) ir pataisos faktorius, susietus su aparatūros parametrais (9). Rekomenduojamas intervalas yra nuo 10^{-10} iki 1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2. *Aparatūra*

Bendroji aparatūros schema pavaizduota 6 paveiksle.

6 paveikslas



1: Vakuumo jungtis

2: Lizdai platinos varžiniam termometrui arba temperatūrai matuoti ir reguliuoti

3: Vakuuminio indo dangtis

4: Žiedinis tarpiklis

5: Vakuuminis indas iš aliuminio

6: Įtaisas efuzijos kameroms įdėti ir išimti

7: Užsukamas dangtelis

8: Sparnuotosios veržlės

9: Varžtai

10: Efuzijos kameros iš nerūdijančiojo plieno

11: Kaitinimo elementas

▼M1

1.5.6. **Efuzijos metodas: izoterminė termogravimetrija**

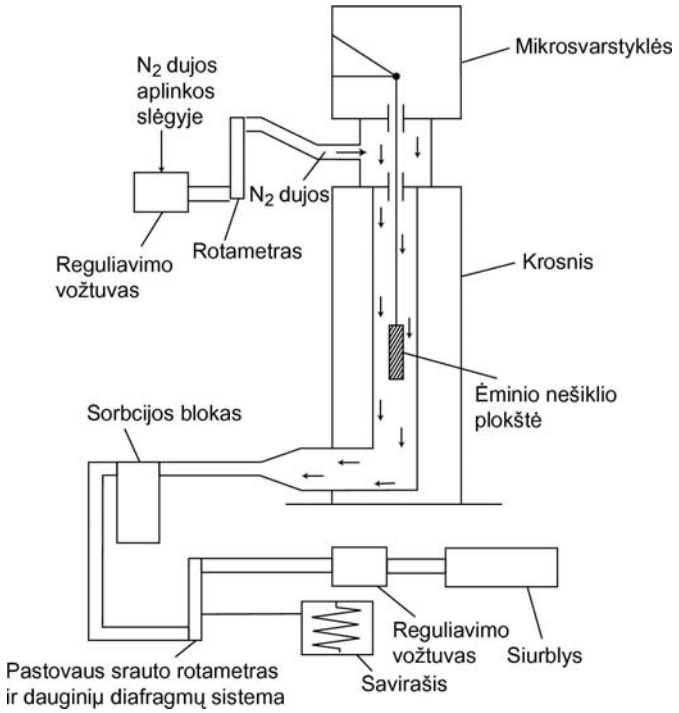
1.5.6.1. *Metodo esmė*

Metodas pagrįstas bandomosios medžiagos pagreitinto garavimo aukštesnėje temperatūroje ir aplinkos slėgyje spartos nustatymu, taikant termogravimetriją (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). Garavimo spartos vertės v_T gaunamos pasirinktą junginį veikiant iš lėto tekančių inertinių dujų atmosfera ir nustatant masės mažėjimą per atitinkamą laikotarpį, esant apibrėžtai pastoviai absoliučiajai temperatūrai T. Garų slėgio vertės p_T apskaičiuojamos pagal v_T vertes, taikant tiesinę garų slėgio logaritmo ir garavimo spartos logaritmo funkciją. Prireikus galima ekstrapoliuoti 20 ir 25 °C temperatūros vertėms, atliekant regresinę log p_T kaip 1/T funkcijos analizę. Šis metodas tinka medžiagoms, kurių garų slėgio vertės yra 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) ir grynumas kiek įmanoma arčiau 100 %, kad būtų išvengta išmatuoto masės sumažėjimo neteisingo aiškinimo.

1.5.6.2. *Aparatūra*

Bandymo įrangos bendroji schema pavaizduota 7 paveiksle.

7 paveikslas



Ėminio laikiklio plokštė, pakabinta ant mikrosvarstyklių reguliuojamos temperatūros kameroje, nupučiama sauso azoto srove, kuri išneša bandomąją medžiagą. Iš kameros išėjęs dujų srautas valomas sorbcijos bloke.

1.5.6.3. *Darbo eiga*

Šiurkštinto paviršiaus stiklo plokštė padengiama vienalyčiu bandomosios medžiagos sluoksniu. Jei tiriamos kietosios medžiagos, plokštė tolygiai suvilgoma medžiagos tirpalu atitinkamame tirpiklyje ir džiovinama inertinių dujų atmosferoje. Matavimui atlikti dengtoji plokštė kabinama į termogravimetrinį analizatorių ir nepertraukiamai matuojamas jos masės mažėjimas kaip laiko funkcija.

▼M1

Garavimo sparta v_T tam tikroje temperatūroje apskaičiuojama pagal ėminio masės sumažėjimą Δm taikant lygtį:

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

čia F – plotas, padengtas bandomąja medžiaga, paprastai ėminio plokštės paviršiaus plotas, ir t – laikas, per kurį masė sumažėja Δm.

Garų slėgis p_T apskaičiuojamas kaip garavimo spartos v_T funkcija:

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

čia C ir D yra konstantos, būdingos naudojamai bandymo įrangai, susijusios su matavimo kameros skersmeniu ir dujų srautu. Šios konstantos turi būti nustatytos vieną kartą matuojant žinomo garų slėgio junginių rinkinį ir atliekant log p_T kaip log v_T funkcijos regresiją (11)(21)(22).

Santykis tarp garų slėgio p_T ir absoliučiosios temperatūros T aprašomas lygtimi:

$$\log p_T = A + B\ 1/T$$

čia A ir B yra konstantos, gautos atliekant log p_T pagal 1/T regresiją. Pagal šią lygtį garų slėgis gali būti apskaičiuotas ekstrapoliavimo būdu bet kuriai kitai temperatūrai.

1.5.7. **Dujų soties metodas** (23)

1.5.7.1. *Metodo esmė*

Žinomo tūrio kambario temperatūros inertinių dujų srautas teka per bandomosios medžiagos ėminį arba virš jo tokiu greičiu, kuris užtikrintų dujų prisotinimą. Labai svarbu pasiekti dujų fazės sotį. Pernešta medžiaga sulaikoma, dažniausiai sorbentu, ir nustatomas jos kiekis. Vietoj garų sulaikymo ir vėlesnės analizės kiekybiniam perneštos medžiagos kiekio nustatymui galima taikyti nuosekliai atliekamos analizės metodus, pvz., dujų chromatografiją. Garų slėgis apskaičiuojamas darant prielaidą, kad dujoms tinka idealiųjų dujų dėsnis ir visas dujų mišinio slėgis yra lygus mišinį sudarančių komponentų slėgių sumai. Bandomosios medžiagos dalinis slėgis, t. y. garų slėgis, apskaičiuojamas pagal išmatuotą visą dujų tūrį ir perneštos medžiagos masę.

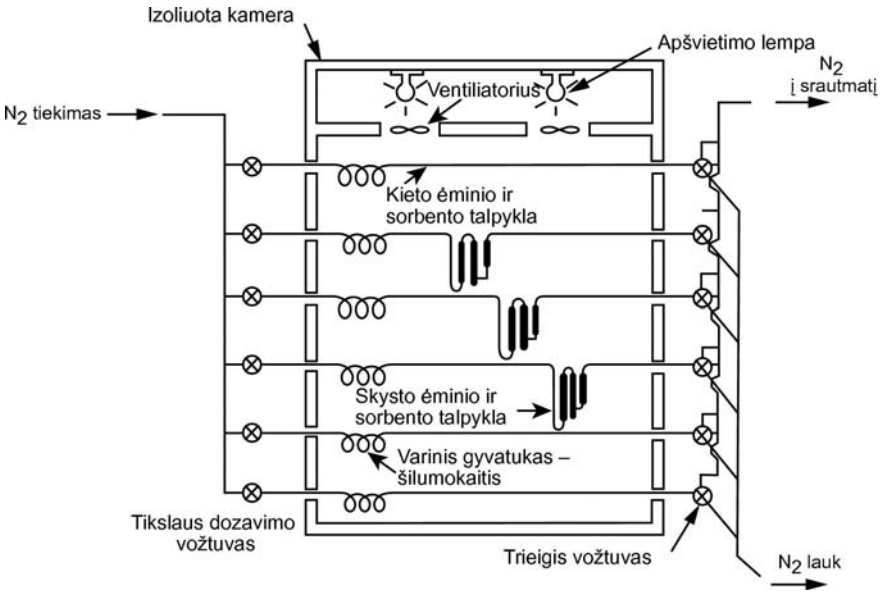
Dujų soties metodas tinka kietosioms arba skystosioms cheminėms medžiagoms. Jis gali būti taikomas garų slėgiui iki 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). Metodo patikimumas didžiausias, kai garų slėgis yra mažesnis kaip 10^3 Pa. Kai jis yra didesnis kaip 10^3 Pa, paprastai gaunamos padidintos garų slėgio vertės, galbūt dėl aerozolių susidarymo. Kadangi garų slėgio matavimai atliekami kambario temperatūroje, nėra būtina ekstrapoliuoti aukštesnės temperatūros vertėms gautus duomenis, taigi išvengiama aukštai temperatūrai gautų duomenų ekstrapoliacijos, kuri dažnai gali būti didelių paklaidų priežastimi.

1.5.7.2. *Aparatūra*

Taikant šį metodą būtina naudoti pastovios temperatūros kamerą. 8 paveiksle pateiktame kameros eskize pavaizduota kamera, turinti po tris kietųjų ir skystųjų ėminių talpyklas, todėl įmanoma kietojo arba skystojo ėminio analizę kartoti tris kartus. Temperatūra reguliuojama ±0,5 °C arba geresniu tikslumu.

▼**M1**

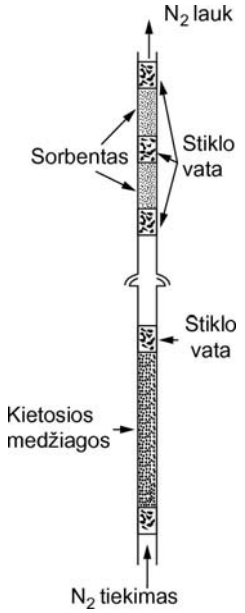
8 paveikslas



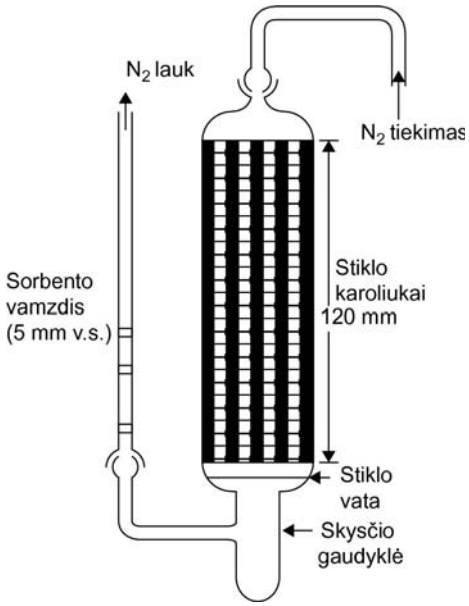
Dažniausiai kaip inertinis nešiklis naudojamos azoto dujos, bet kartais gali tekti naudoti kitas dujas (24). Nešiklio dujos turi būti sausos. Dujų srautas dalijamas į 6 srautus, reguliuojamus adatiniais vožtuvais (anga maždaug 0,79 mm), ir teka į kamerą per 3,8 mm v. s. varinius vamzdžius. Pasiekus temperatūros pusiausvyrą, dujos teka per ėminį, gaudyklę su sorbentu ir išleidžiamos iš kameros.

Kietėji ėminiai dedami į 5 mm v. s. stiklo vamzdžius tarp stiklo vatos kamščių (žr. 9 paveikslą). 10 paveiksle pavaizduota skystojo ėminio talpykla ir sorbento sistema. Geriausi atkuriamumo rezultatai gaunami taikant skysčių garų slėgio matavimo metodą, kai stiklo arba inertinio sorbento, pvz., kvarco, karoliukai padengiami skysčiu ir šiais karoliukais pripildoma talpyklą. Pagal kitą būdą nešiklio dujos gali būti leidžiamos per didelio akytumo sukepintą stiklą ir barbotuojamos per skystos bandomosios medžiagos kolonėlę.

9 paveikslas



10 paveikslas



▼M1

Sorbento sistemą sudaro priekinis ir atsarginis sorbento skyriai. Kai garų slėgis yra labai mažas, sorbentu sulaikomas tik labai mažas kiekis ir rimta problema gali būti adsorbcija ant stiklo vatos bei stiklinių vamzdžių.

Kietu CO_2 aušinamos gaudyklės yra kitas efektyvus būdas medžiagos garams surinkti. Jos nesudaro jokio priešslėgio prisotinimo kolonėlėje, be to, labai lengva pašalinti sulaikytą medžiagą.

1.5.7.3. *Darbo eiga*

Ištekančių nešiklio dujų srautas matuojamas kambario temperatūroje. Bandymo metu srautas dažnai tikrinamas, siekiant užtikrinti tikslų visą nešiklio dujų tūrį. Geriau būtų visą laiką jį matuoti masės srautmačiu. Dujų fazei prisotinti gali būti reikalinga gana didelė sąlyčio trukmė, taigi visiškai mažos dujų srauto vertės (25).

Po bandymo priekinis ir atsarginis sorbento skyriai analizuojami atskirai. Kiekviename skyriuje esantis junginys desorbuojamas tirpikliu. Atliekama gautų tirpalų kiekybinė analizė iš kiekvieno skyriaus desorbuotai masei nustatyti. Analizės metodo (ir sorbento bei desorbcijai naudojamo tirpiklio) pasirinkimą lemia bandomosios medžiagos prigimtis. Desorbcijos efektyvumui nustatyti žinomas ėminio kiekis švirkščiamas ant sorbento, desorbuojamas ir atgautas kiekis analizuojamas. Svarbu patikrinti desorbcijos efektyvumą esant koncentracijai, kuri būtų lygi arba beveik lygi ėminio koncentracijai bandymo sąlygomis.

Norint įsitikinti, ar nešiklio dujos yra prisotintos bandomąja medžiaga, naudojami trys skirtingi dujų srautai. Jei apskaičiuota garų slėgio vertė nesikeičia dėl srauto pokyčio, daroma prielaida, kad dujos yra prisotintos.

Garų slėgis apskaičiuojamas pagal lygtį:

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

čia:

p = garų slėgis (Pa)

W = išgaravusios bandomosios medžiagos masė (g)

V = sočiųjų garų tūris (m^3)

R = universalioji dujų konstanta 8,314 (J mol^{-1} K^{-1})

T = temperatūra (K)

M = bandomosios medžiagos molinė masė (g mol^{-1})

Turi būti daroma matuojamų tūrių pataisa dėl srautmačio ir prisotinimo kolonėlės slėgio ir temperatūros skirtumo.

▼M1

1.5.8. **Sukamasis rotorius**

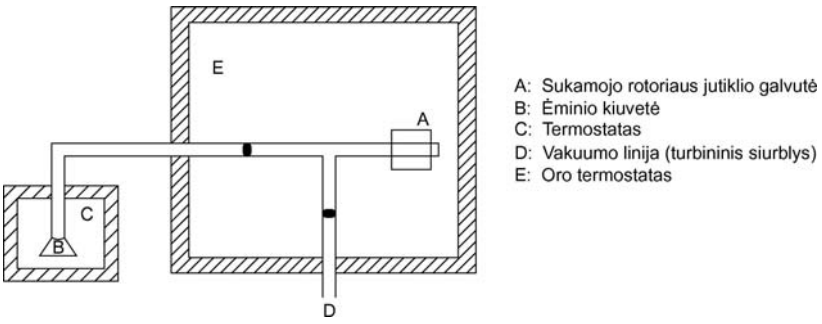
1.5.8.1. *Metodo esmė*

Taikant šį metodą, naudojamas sukamojo rotoriaus klampos matuoklis, kurio matavimo elementas yra magnetiniame lauke pakabintas mažas plieninis rutuliukas, sukamųjų laukų verčiamas suktis (26)(27)(28). Apsisukimų dažnis gali būti išmatuotas matavimo ritėmis. Kai rutuliukas pasiekia nustatytą apsisukimų dažnį, paprastai apie 400 apsisukimų per sekundę, žadinimas nutraukiamas ir dažnis pradeda mažėti dėl dujų trinties. Apsisukimo dažnio mažėjimas matuojamas kaip laiko funkcija. Garų slėgis nustatomas pagal plieninio rutuliuko lėtėjimą, kuris yra slėgio funkcija. Rekomenduojamas intervalas yra nuo 10^{-4} iki 0,5 Pa.

1.5.8.2. *Aparatūra*

Bandymo įrenginio schema pavaizduota 11 paveiksle. Matavimo galvutė įdedama į gaubtą, kurio pastovi temperatūra reguliuojama 0,1 °C tikslumu. Ėminio indas dedamas į atskirą gaubtą, kurio temperatūra irgi reguliuojama 0,1 °C tikslumu. Visų kitos įrenginio dalių temperatūra yra aukštesnė, siekiant išvengti kondensacijos. Visas aparatas yra prijungtas prie vakuumo sistemos.

11 paveikslas



2. **DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS**

2.1. DUOMENYS

Garų slėgis, gautas taikant bet kurį iš pirmiau pateiktų metodų, turėtų būti nustatytas bent dviem temperatūros vertėms. Siekiant patikrinti garų slėgio kreivės tiesiškumą, pageidautina slėgį nustatyti trims arba daugiau verčių intervale nuo 0 iki 50 °C. Vietoje temperatūros intervalo nuo 0 iki 50 °C efuzijos metodo (*Knudseno* kamera ir izoterminė termogravimetrija) ir dujų soties metodo atveju rekomenduojamas matavimo temperatūros intervalas nuo 120 iki 150 °C.

2.2. BANDYMŲ ATASKAITA

Bandymų ataskaitą turi sudaryti ši informacija:

— taikytas metodas,

▼M1

— tiksli medžiagos specifikacija (identifikavimo duomenys ir priemaišos) ir pradinio gryninimo pakopa, jei taikoma,

— bent dvi būtinos garų slėgio ir temperatūros vertės, geriau trys arba daugiau, intervale nuo 0 iki 50 °C (arba nuo 120 iki 150 °C),

— bent viena iš temperatūros verčių turėtų būti lygi 25 °C arba žemesnė, jei techniškai įmanoma pagal pasirinktą metodą,

— visi pradiniai duomenys,

— log p kaip 1/T funkcijos kreivė,

— garų slėgio 20 arba 25 °C įvertis.

Jei stebimas virsmas (būsenos pokytis, skilimas), turėtų nūti pažymėta ši informacija:

— virsmo pobūdis,

— virsmo temperatūra atmosferos slėgyje,

— garų slėgis 10 ir 20 °C žemiau virsmo temperatūros bei 10 ir 20 °C aukščiau šios temperatūros (išskyrus virsmą iš kietosios į dujinę būseną).

Ataskaitoje turi būti pateikta visa rezultatams interpretuoti būtina informacija ir pastabos, ypač apie priemaišas ir medžiagos fizikinę būseną.

3. **LITERATŪRA**

(1) Official Journal of the European Communities L 383 A, 26–47 (1992).

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

(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 (September 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.

▼M1

(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, Twelfth Edition (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). pp 148–153, Office of the Federal Register, Washington DC

▼**M1**

(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.

▼M1

Priedėlis

Apytikrio įvertinimo metodas

ĮVADAS

Apytikriai apskaičiuotos vertės gali būti taikomos:

— nuspręsti, kuris iš bandymo metodų tinka;

— gauti įverčiui arba ribinei vertei tais atvejais, kai bandymo metodas negali būti taikomas dėl techninių priežasčių.

APYTIKRIO ĮVERTINIMO METODAS

Skysčių ir kietųjų medžiagų garų slėgis gali būti apytikriai įvertintas, taikant modifikuotą *Watson* koreliaciją (a). Vieninteliai reikalingi bandymų duomenys – virimo temperatūra normaliajame slėgyje. Metodas tinka slėgio intervalui nuo 10^5 Pa iki 10^{-5} Pa.

Detali informacija apie metodą yra pateikta „*Handbook of Chemical Property Estimation Methods*“ (b). Be to, žr. *OECD Environmental Monograph* No.67 (c).

APSKAIČIAVIMO METODIKA

Garų slėgis apskaičiuojamas taip:

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

čia:

T = matavimo temperatūra,

T_b = virimo temperatūra normaliajame slėgyje,

P_{VP} = garų slėgis temperatūroje T,

ΔH_{Vb} = garavimo šiluma,

ΔZ_b = spūdumo faktorius (įvertintas 0,97),

m = empirinis faktorius, susietas su fizikine būsena matavimo temperatūroje.

Toliau,

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

čia, K_F – empirinis faktorius, skirtas atsižvelgti į medžiagos poliškumą. Kelių tipų junginių K_F faktoriai yra pateikti (b) nuorodoje.

▼**M1**

Duomenys labai dažnai pateikiami, nurodant virimo temperatūra sumažintame slėgyje. Tokiu atveju garų slėgis apskaičiuojamas taip:

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

čia, T_1 – virimo temperatūra sumažintame slėgyje P_1.

ATASKAITA

Taikant įvertinimo metodą, į ataskaitą turi būti įtraukti išsamūs apskaičiavimo dokumentai.

LITERATŪRA

(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).

▼C1

A.5. PAVIRŠIAUS ĮTEMPTIS

1. METODAS

Apibūdintieji metodai yra pagrįsti OECD Bandymų gairėmis (1). Pagrindiniai principai pateikti 2 nuorodoje.

1.1. ĮVADAS

Apibūdintieji metodai turi būti taikomi vandeninių tirpalų paviršiaus įtempties matavimuose.

Prieš atliekant šiuos bandymus naudinga iš anksto turėti informaciją apie medžiagos micelių tirpumą vandenyje, struktūrą, hidrolizines savybes ir kritines koncentracijas.

Toliau išvardyti metodai yra taikytini daugumai cheminių medžiagų, netaikant jokių apribojimų jų grynumo laipsniui.

Paviršiaus įtempties matavimuose žiediniu tenzometru apsiribojama vandeniniais tirpalais, kurių dinaminis klampumas mažesnis negu apytikriai 200 mPa s.

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Gibso paviršiaus energija vienam paviršiaus vienetui vadinama paviršiaus įtemptimi.

Paviršiaus įtemptis nurodoma:

N/m (SI vienetais) arba

mN/m (SI pogrupiais)

$1\ N/m = 10^3$ dinų/cm

1 mN/m = 1 dina/cm nebevartojamoje cgs sistemoje

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Etaloninių medžiagų nereikia naudoti visais tais atvejais, kai tiriama nauja medžiaga. Jos pirmiausia turėtų būti naudojamos kartkartėmis tikrinant metodų veikimą ir lyginant rezultatus su kitais metodais gautais rezultatais.

Etaloninės medžiagos, kurios apima platų spektrą paviršiaus įtempčių, pateiktos 1 ir 3 nuorodose.

1.4. METODŲ PRINCIPAS

Šie metodai yra pagrįsti matavimais didžiausios jėgos, reikalingos vertikaliai įtempti ant ąselės arba žiedo, esančio sąlytyje su matavimo stiklinėje esančio tiriamojo skysčio paviršiumi, norint skystį atskirti nuo to paviršiaus arba plokštelės, kurios kraštas liečiasi su tuo paviršiumi, kad būtų pritraukta susidariusi plėvelė.

Vandenyje tirpios medžiagos, kai jų koncentracija ne mažesnė kaip 1 mg/l, yra tiriamos vandeniniuose tirpaluose esant vienai koncentracijai.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Šie metodai yra žymiai tikslesni, negu tai gali būti reikalinga aplinkai įvertinti.

▼C1

1.6. METODŲ APIBŪDINIMAS

Medžiagos tirpalas paruošiamas distiliuotame vandenyje. Šio tirpalo koncentracija turėtų sudaryti 90 % medžiagos soties tirpumo vandenyje; jeigu ši koncentracija viršija 1 g/l, tyrimui naudojama 1 g/l koncentracija. Medžiagų, kurių tirpumas vandenyje mažesnis kaip 1 mg/l, nereikia tirti.

1.6.1. **Plokštelės metodas**

Žr. ISO 304 ir NF T 73–060 (Paviršinio aktyvumo reagentai – paviršiaus įtempties nustatymas tempiant skysčio plėveles).

1.6.2. **Ąselės metodas**

Žr. ISO 304 ir NF T 73–060 (Paviršinio aktyvumo reagentai – paviršiaus įtempties nustatymas tempiant skysčio plėveles).

1.6.3. **Žiedo metodas**

Žr. ISO 304 ir NF T 73–060 (Paviršinio aktyvumo reagentai – paviršiaus įtempties nustatymas tempiant skysčio plėveles).

1.6.4. **OECD suderintas cirkuliarinis metodas**

1.6.4.1. *Aparatūra*

Komerciškai prieinami tenzometrai tinka šiems matavimams. Juos sudaro šie elementai:

— kilnojamasis mėginio stalelis,

— matavimo sistema,

— matavimo žiedas,

— matavimo indas.

1.6.4.1.1. Kilnojamasis mėginio stalelis

Kilnojamasis mėginio stalelis naudojamas kaip kontroliuojamos temperatūros matavimo indo, kuriame yra tiriamasis skystis, atrama. Kartu su jėgos matavimo sistema jis dedamas ant stovo.

1.6.4.1.2. Jėgos matavimo sistema

Jėgos matavimo sistema (žr. paveikslą) yra virš bandinio stalelio. Jėgos matavimo paklaida neturi viršyti ± 10^{-6} N, atitinkančią paklaidos ribą ± 0,1 mg matuojant masę. Daugeliu atvejų parduodamų tenzometrų matavimo skalė yra kalibruota mN/m taip, kad paviršiaus įtemptis gali būti tiesiogiai parodoma mN/m, 0,1 mN/m tikslumu.

▼C1

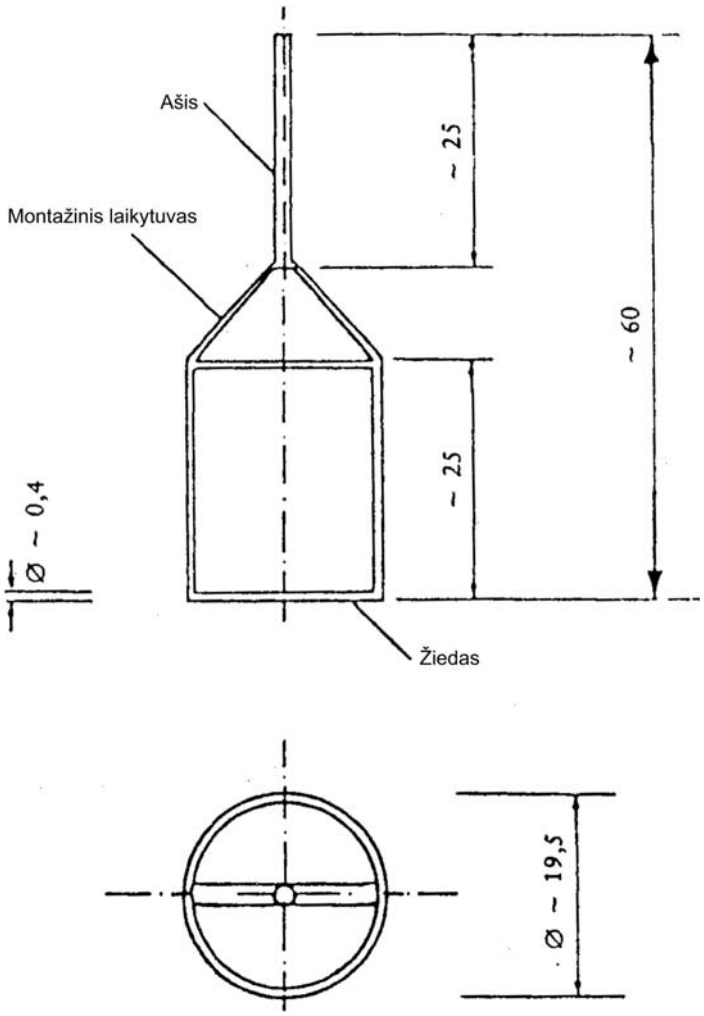
1.6.4.1.3. Matavimo kūnas (žiedas)

Paprastai žiedas yra padarytas iš platinos ir iridžio vielos, kurios storis 0,4 mm, o perimetras 60 mm. Vielos žiedas pakabinamas horizontaliai ant metalinės ašies ir montažinio laikytuvo, kad būtų galima sujungti su jėgos matavimo sistema (žr. paveikslą).

Paveikslas

Matavimo kūnas

(Visi matmenys nurodyti milimetrais)



1.6.4.1.4. Matavimo indas

Matavimo indas su tiriamu tirpalu, kuris turi būti išmatuotas – tai stiklinis indas su kontroliuojama temperatūra. Jo konstrukcija turi būti tokia, kad matavimo metu tiriamo tirpalo skysčio temperatūra ir dujų fazė virš jo paviršiaus išliktų pastovios ir kad bandinys negaruotų. Tinka cilindriniai stikliniai indai, kurių vidinis skersmuo ne mažesnis kaip 45 mm.

▼C1

1.6.4.2. *Aparatūros paruošimas*

1.6.4.2.1. Valymas

Stikliniai indai turi būti kruopščiai išvalomi. Jeigu reikia, jie išplaunami karšta chromo-sieros rūgštimi, o po to sirupo tirštumo fosforo rūgštimi (83–98 % H_3PO_4 svorio) kruopščiai nuskalaujami vandeniu iš čiaupo ir galiausiai perskalaujami du kartus distiliuotu vandeniu, kol bus pasiekta neutrali reakcija, po to išdžiovinama arba nuskalaujama dalimi bandinio tirpalo, kurį reikia išmatuoti.

Žiedas pirma turi būti gerai nuskalaujamas vandeniu, kad būtų pašalintos bet kokios vandenyje tirpios medžiagos, trumpam pamerkiamas į chromo-sieros rūgštį, praskalaujamas du kartus distiliuotu vandeniu, kol bus pasiekta neutrali reakcija, ir galiausiai lengvai pašildomas virš metanolio liepsnos.

Pastaba

Tarša medžiagomis, kurios neištirpsta arba nesuyra veikiamos chromo-sieros rūgštimi arba fosforo rūgštimi, pavyzdžiui, silikonai, yra pašalinama atitinkamais organiniais tirpikliais.

1.6.4.2.2. Aparato kalibravimas

Aparatas patvirtinamas patikrinant nulinį tašką ir suderinant taip, kad prietaiso parodymai leistų patikimai nustatyti mN/m.

Montavimas

Aparatas išlyginamas, pavyzdžiui, pagal tenzometro pagrindo spirito lygį, suderinant pagrinde esančius koreguojančius varžtus.

Nulinio taško derinimas

Įtaisius žiedą ant aparato ir prieš pamerkiant jį į skystį, tenzometro parodymai suderinami taip, kad rodytų nulį, ir patikrinama, kad žiedas kabėtų lygiagrečiai skysčio paviršiui. Tam tikslui skysčio paviršius gali būti naudojamas kaip veidrodis.

Kalibravimas

Tikrasis bandymo kalibravimas gali būti atliekamas dviem būdais:

a) naudojant masę: naudojant žinomos masės, 0,1–1,0 g svarelius, uždedamus ant žiedo. Kalibravimo koeficientas Φ_a, iš kurio turi būti padauginamas kiekvienas prietaiso parodymas, nustatomas pagal šią lygtį (1):

$$\Phi_a = \frac{(\sigma_r)}{(\sigma_a)},$$

čia:

$$\sigma_r = \left(\frac{(mg)}{(2b)}\right) \text{ (mN/m)}$$

m = svarelio masė (g)

g = laisvojo kritimo pagreitis (981 cm s^{-2} jūros lygyje)

b = vidutinis žiedo perimetras (cm)

σ_a = tenzometro parodymai po to, kai ant žiedo uždedami svareliai (mN/m).

▼C1

b) naudojant vandenį: procedūra naudojant gryną vandenį, kurio paviršiaus įtemptis, kai temperatūra, pavyzdžiui, lygi 23 °C, yra 72,3 mN/m. Ši procedūra greitesnė negu svorio kalibravimas, bet visuomet yra pavojus, kad vandens paviršiaus įtemptį iškreips taršos paviršinio aktyvumo medžiagomis pėdsakai.

Kalibravimo koeficientas Φ_b, iš kurio padauginami visi prietaiso parodymai, yra nustatomas pagal lygtį (2):

$$\Phi_b = \frac{(\sigma_o)}{(\sigma_g)},$$

čia:

σ_o = vandens paviršiaus įtempties vertė, nurodyta literatūroje (mN/m)

σ_g = išmatuota vandens paviršiaus įtempties vertė (mN/m), abi vienodoje temperatūroje

1.6.4.3. *Bandinių paruošimas*

Vandeniniai tirpalai paruošiami iš tiriamųjų medžiagų, naudojant reikalingas koncentracijas vandenyje, juose neturi būti jokių neištirpusių medžiagų.

Tirpalas turi būti laikomas pastovioje temperatūroje (± 0,5 °C). Kadangi tirpalo, esančio matavimo inde, paviršiaus įtemptis kinta laike, atliekami keli matavimai skirtingu laiku ir brėžiama kreivė, parodanti paviršiaus įtemptį kaip laiko funkciją. Jeigu niekas toliau nesikeičia, tai pusiausvyros būsena pasiekta.

Tarša kitų medžiagų dulkėmis ir dujomis trukdo matavimams. Todėl darbas turi būti atliekamas po apsauginiu gaubtu.

1.6.5. **Bandymo sąlygos**

Matavimai atliekami apytikriai 20 °C temperatūroje ir kontroliuojami ± 0,5 °C ribose.

1.6.6. **Darbo eiga**

Matuojami tirpalai perpilami į kruopščiai išvalytą matavimo indą, stengiantis, kad nesusidarytų putų, po to matavimo indas dedamas ant bandymo aparato stalelio. Stalelio viršus su matavimo indu keliamas aukštyn, kol žiedas panyra žemiau matuojamo tirpalo paviršiaus. Po to stalelio viršus pamažu ir tolydžiai nuleidžiamas (apie 0,5 cm/min. greičiu), atskiriant žiedą nuo paviršiaus, kol bus pasiekta maksimali jėga. Skysčio sluoksnis, besiliečiantis su žiedu, neturi atsiskirti nuo žiedo. Užbaigus matavimus, žiedas vėl iškeliamas į paviršių, matavimai kartojami tol, kol bus gauta pastovi paviršiaus įtempties vertė. Kiekvienam nustatymui užrašomas tirpalo perpylimo į matavimo indą laikas. Matavimai užrašomi esant maksimaliai jėgai, reikalingai atskirti žiedą nuo skysčio paviršiaus.

▼C1

2. **DUOMENYS**

Norint apskaičiuoti paviršiaus įtemptį, aparato parodyta vertė mN/m pirma dauginama iš kalibracijos koeficiento Φ_a arba Φ_b (priklausomai nuo naudoto kalibravimo būdo). Taip bus gaunama vertė, kuri taikoma tik apytikriai ir todėl ją reikia koreguoti.

Harkins ir Jordan (4) empiriškai nustatė paviršiaus įtempties verčių, matuotų žiedo metodu, korekcijos koeficientus, kurie priklauso nuo žiedo matmenų, skysčio tankio ir jo paviršiaus įtempties.

Kadangi korekcijos koeficiento nustatymas kiekvienam atskiram matavimui pagal Harkins ir Jordan lenteles yra daug pastangų reikalaujantis darbas, vandeninių tirpalų paviršiaus įtempčiai apskaičiuoti gali būti naudojama supaprastinta koreguotų paviršiaus įtempties verčių skaitymo tvarka tiesiogiai iš šios lentelės. (Interpoliacija turi būti naudojama parodymams, svyruojantiems tarp lentelėje pateiktų verčių).

Lentelė

Matuotos paviršiaus įtempties korekcija

Tik vandeniniams tirpalams, $\rho \equiv 1\ g/cm^3$

r	= 9,55 mm (vidutinis žiedo spindulys)
r	= 0,185 mm (žiedo vielos spindulys)

Eksperimentinė vertė (mN/m)	Koreguotoji vertė (mN/m)	
	Kalibravimas pagal svorį (žr. 1.6.4.2.2 (a))	Kalibravimas pagal vandenį (žr. 1.6.4.2.2 (b))
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9

▼C1

Eksperimentinė vertė (mN/m)	Koreguotoji vertė (mN/m)	
	Kalibravimas pagal svorį (žr. 1.6.4.2.2 (a))	Kalibravimas pagal vandenį (žr. 1.6.4.2.2 (b))
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Ši lentelė buvo sudaryta remiantis Harkins-Jordan korekcijomis. Ji panaši į vandens ir vandeninių tirpalų (tankis p = 1 g/cm) DIN standartą (DIN 53914) ir taikoma pardavinėjamam žiedui, kurio dimensijos R = 9,55 mm (vidutinis žiedo spindulys) ir r = 0,185 mm (žiedo vielos spindulys). Lentelėje yra pateiktos koreguotos paviršiaus įtempties matavimų vertės, paimtos po kalibravimo su svareliais arba kalibravimo su vandeniu.

Kitaip, be išankstinio kalibravimo, paviršiaus įtemptis gali būti apskaičiuojama pagal šią formulę:

$$\sigma = \frac{(f \times F)}{(4\pi R)},$$

čia:

F = jėga, išmatuota dinamometru plėvelės nutrūkimo taške

R = žiedo spindulys

f = korekcijos koeficientas (1)

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti pateikiama tokia informacija:

— naudotas metodas,

— naudoto vandens arba tirpalo rūšis,

— tikslus ir išsamus medžiagos apibūdinimas (tapatumas ir priemaišos),

— matavimo rezultatai: paviršiaus įtemptis (parodymai), nurodant tiek atskirus parodymus ir jų aritmetinį vidurkį, tiek koreguotą vidurkį (atsižvelgiant į įrangą ir korekcijos lentelę),

▼C1

— tirpalo koncentracija,

— bandymo temperatūra,

— kiek laiko buvo laikomas naudotas tirpalas; ypač laikas nuo paruošimo iki tirpalo matavimo,

— paviršiaus įtempties priklausomybės nuo laiko, perpylus tirpalą į matavimo indą apibūdinimas,

— turi būti nurodoma visa informacija ir pastabos, svarbios rezultatų aiškinimui, ypač atsižvelgiant į priemaišas ir medžiagos fizikinę būseną.

3.2. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Laikant, kad 20 °C temperatūroje distiliuoto vandens paviršiaus įtemptis lygi 72,75 mN/m, medžiagos, kurių paviršiaus įtemptis mažesnė kaip 60 mN/m, pagal šio bandymo sąlygas, turėtų būti laikomos paviršinio aktyvumo medžiagomis.

4. **NUORODOS**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.

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

3) Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, p. 511.

4) Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, vol. 52, p. 1751.

▼M4

A.6. **TIRPUMAS VANDENYJE**

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka OECD „Test Guideline“ (TG) 105 (OECD bandymo gairės Nr. 105) (1995). Šis bandymo metodas yra atnaujinta 1981 m. patvirtinto originalaus bandymo metodo Nr. 105 redakcija. Dabartinė redakcija iš esmės nesiskiria nuo 1981 m. redakcijos. Daugiausia buvo keičiamas formatas. Atnaujinant remtasi ES bandymo metodu „Tirpumas vandenyje“ ([1]).

PIRMINIAI ASPEKTAI

2. Cheminės medžiagos tirpumą vandenyje gali stipriai paveikti joje esančios priemaišos. Šis bandymo metodas skirtas nustatyti iš esmės grynų cheminių medžiagų, kurios yra stabilios vandenyje ir nelakios, tirpumą vandenyje. Prieš nustatant tirpumą vandenyje, naudinga gauti išankstinės informacijos apie bandomąją cheminę medžiagą, pvz., informacijos apie jos struktūrinę formulę, garų slėgį, disociacijos konstantą ir hidrolizę kaip pH funkciją.

3. Dėstant šį bandymo metodą aprašomi du metodai – kolonėlės eliuavimo metodas ir kolbos metodas, atitinkamai taikomi, kai tirpumas yra mažesnis kaip 10–2 g/l ir kai tirpumas yra didesnis kaip 10–2 g/l. Taip pat aprašomas paprastas išankstinis bandymas. Šiuo bandymu galima nustatyti apytikrį ėminio kiekį, naudotiną per galutinį bandymą, ir laiką, reikalingą sočiai užtikrinti.

APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

4. Cheminės medžiagos tirpumas vandenyje yra medžiagos soties masės koncentracija vandenyje esant tam tikrai temperatūrai.

5. Tirpumas vandenyje išreiškiamas tirpinio mase tirpalo tūryje. SI sistemos vienetas – kg/m^3, bet gali būti naudojama ir g/l.

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

6. Tiriant bandomąją cheminę medžiagą, etaloninių cheminių medžiagų naudoti nereikia.

METODŲ APRAŠYMAS

Bandymo sąlygos

7. Bandymą geriausia atlikti 20 ± 0,5 °C temperatūroje. Pasirinktoji temperatūra turėtų būti išlaikoma pastovi visose svarbiose įrangos dalyse.

Išankstinis bandymas

8. Į apytikriai 0,1 g ėminio (kietosios bandomosios cheminės medžiagos turi būti pulverizuotos), esančio stikliniu kaiščiu užkimštame 10 ml talpos matavimo cilindre, kambario temperatūroje nuosekliai pilami vis didesni vandens kiekiai. Kiekvieną kartą įpylus tam tikrą vandens kiekį, mišinys kratomas 10 minučių ir vizualiai tikrinama, ar nėra neištirpusių ėminio dalelių. Jeigu supylus 10 ml vandens ėminys arba jo dalys neištirpsta, bandymas tęsiamas 100 ml talpos matavimo cilindre. Toliau pateiktoje 1 lentelėje nurodytas apytikris tirpumas esant tokiam vandens tūriui, kuriame ėminys visiškai

▼M4

ištirpsta. Kai tirpumas mažas, bandomajai cheminei medžiagai ištirpinti gali reikėti daug laiko; tam turėtų būti skiriamos ne mažiau kaip 24 valandos. Jeigu per 24 valandas bandomoji cheminė medžiaga vis tiek neištirpsta, turėtų būti skiriama daugiau laiko (bet ne daugiau kaip 96 val.), arba turėtų būti mėginama dar labiau skiesti, siekiant išsiaiškinti, ar turėtų būti taikomas kolonėlės eliuavimo arba kolbos metodas.

1 lentelė

Vandens tūris (ml), reikalingas ištirpinti 0,1 g tirpinio	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Apytikris tirpumas (g/l)	> 1 000	200–1 000	100–200	50–100	10–50	1–10	< 1

Kolonėlės eliuavimo metodas

Principas

9. Šis metodas pagrįstas bandomosios cheminės medžiagos eliuavimu vandeniu iš mikrokolonėlės, į kurią įdėta inertinės pagalbinės medžiagos, pirmiau padengtos perteklinių bandomosios medžiagos kiekiu (2). Tirpumas vandenyje nustatomas pagal eliuato masės koncentraciją, susidariusią pasiekus laiko funkcijos kreivės plokščiąją dalį.

Aparatūra

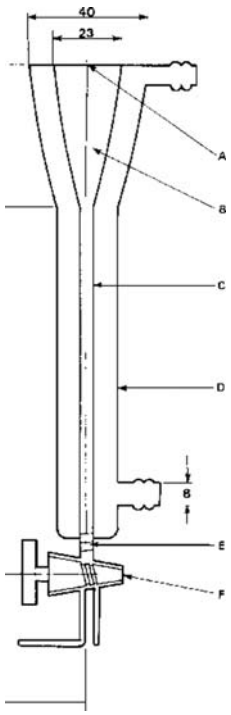
10. Vienas iš prietaisų – mikrokolonėlė (1 paveikslas), kurioje išlaikoma pastovi temperatūra. Ji prijungiama prie recirkuliacinio siurblio (2 paveikslas) arba išlyginamojo indo (3 paveikslas). Į mikrokolonėlę įdedama inertinės pagalbinės medžiagos, laikomos vietoje mažu stiklo vatos kamščiu, kuris kartu atlieka dalelių filtravimo funkciją. Kaip pagalbinės medžiagos gali būti naudojami stiklo rutuliukai, diatomitas arba kitos inertinės medžiagos.

11. 1 paveiksle parodyta mikrokolonėlė yra tinkama prijungti prie recirkuliacinio siurblio. Kolonėlės viršutinėje dalyje yra tiek erdvės, kad joje tilptų penki sluoksniai (pradedant bandymą jie išpilami) ir penki ėminiai (atliekant bandymą jie paimami analizei). Arba šį dydį galima sumažinti, jeigu atliekant bandymą į sistemą galima įpilti vandens, kuriuo būtų pakeisti pradiniai penki su priemaišomis pašalinami sluoksniai. Kolonėlė prijungiama prie recirkuliacinio siurblio iš inertinės medžiagos pagamintais vamzdeliais, kuriais galima užtikrinti apie 25 ml/h pralaidumą. Pvz., recirkuliacinis siurblys gali būti peristaltinis arba membraninis siurblys. Reikia imtis atsargumo priemonių, kad vamzdelis neužsiterštų ir (arba) kad nevyktų adsorbcija į vamzdelio medžiagą.

12. 3 paveiksle pateikta montavimo naudojant išlyginamąjį indą schema. Pagal šią montavimo schemą mikrokolonėlėje įrengiamas vienšakis čiaupas. Išlyginamasis indas prijungiamas naudojant matinio stiklo jungtį ir vamzdelius, pagamintus iš inertinės medžiagos. Srauto, tekančio iš išlyginamoji indo, greitis turėtų būti apie 25 ml/h.

▼**M4**

1 paveikslas



Matmenys, mm

A. Matinio stiklo jungties prijungimas

B. Viršerdvė

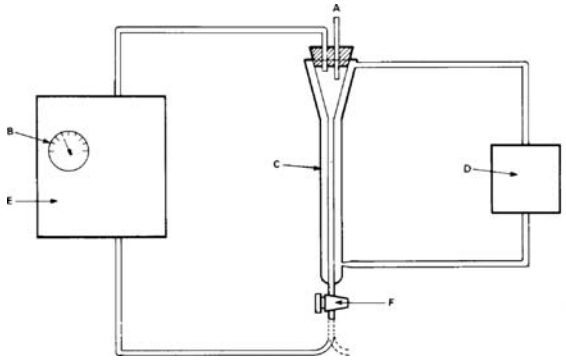
C. Vidinė dalis – 5

D. Išorinė dalis – 19

E. Stiklinės vatos kamštis

F. Uždaromasis čiaupas

2 paveikslas



A. Atmosferinis pusiausvirinimas

B. Srautmatis

C. Mikrokolonėlė

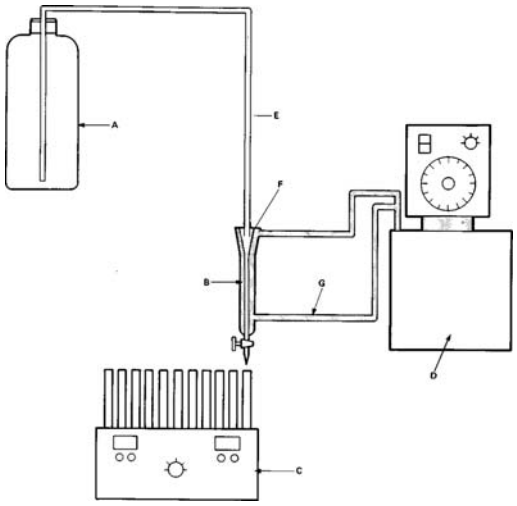
D. Termostatu kontroliuojamas cirkuliacinis siurblys

E. Recirkuliacinis siurblys

F. Dvišakis ėminių ėmimo vožtuvas

▼M4

3 paveikslas



A. Išlyginamasis indas (pvz., 2,5 l cheminė kolba)

B. Kolonėlė

C. Frakcijos rinktuvas

D. Termostatas

E. Tefloninis vamzdelis

F. Matinio stiklo jungtis

G. Vamzdelis vandeniui (tarp termostato ir kolonėlės, vidinis skersmuo – apie 8 mm)

13. Apie 600 mg pagalbinės medžiagos perpilama į 50 ml apvaliadugnę kolbą. Tinkamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis ištirpinamas lakiame analizinio reagento kokybės tirpiklyje, ir reikiamas šio tirpalo kiekis užpilamas ant pagalbinės medžiagos. Tirpiklis visiškai išgarinamas, pavyzdžiui, sukamajame garintuve, nes kitaip eliuavimo etapu dėl paviršinio skaidymosi pagalbinė medžiaga nebus įsotinta vandeniu. Įkrauta pagalbinė medžiaga dvi valandas mirkoma apytikriai 5 mililitruose vandens, po to suspensija supilama į mikrokolonėlę. Arba dedama sausa pagalbinė medžiaga gali būti supilama į vandens pripildytą mikrokolonėlę ir dvi valandas paliekama nusistovėti pusiausvyrai.

14. Dėl pagalbinės medžiagos įkrovimo gali kilti sunkumų ir dėl to gali būti gauti klaidingi rezultatai, pvz., kai bandomoji cheminė medžiaga nusėda kaip alyva. Šios problemos turėtų būti išnagrinėtos ir apie jas turėtų būti pateikta išsami informacija ataskaitoje.

Procedūra, taikoma naudojant recirkuliacinį siurblį

15. Srautas pradedamas leisti per kolonėlę. Rekomenduojamas srauto greitis – apie 25 ml/val.; aprašytos kolonėlės atveju tai atitinka 10 sluoksnių per valandą. Ne mažiau kaip penki pirmieji sluoksniai išpilami, kad būtų pašalintos vandenyje tirpios priemaišos. Tada recirkuliacinis siurblys paliekamas veikti tol, kol nusistovi pusiausvyra, kuri laikoma pasiekta tada, kai penkių paeiliui paimtų ėminių koncentracijos atsitiktine tvarka skiriasi ne daugiau kaip ± 30 %. Šie ėminiai turėtų būti imami laiko intervalais, per kuriuos pasikeičia ne mažiau kaip dešimt eliuato sluoksnių. Atsižvelgiant į taikomą analizės metodą, gali būti naudinga nubrėžti koncentracijos ir laiko tarpusavio priklausomybės kreivę, rodančią, ar jau pasiekta pusiausvyra.

▼M4

Procedūra, taikoma naudojant išlyginamąjį indą

16. Ištisinės sekos eliuato frakcijos turėtų būti surenkamos ir analizuojamos pasirinktu metodu. Intervalo vidurio eliuato frakcijos, kurių koncentracijos yra pastovios (± 30 %) ne mažiau kaip penkiose paeiliui paimtose frakcijose, yra naudojamos nustatyti tirpumą vandenyje.

17. Tinkamiausias eliuatas – du kartus distiliuotas vanduo. Taip pat gali būti naudojamas dejonizuotas vanduo, kurio savitoji varža didesnė kaip 10 MΩ/cm, o bendras organinės anglies kiekis mažesnis kaip 0,01 %.

18. Pagal abi procedūras atliekamas antrasis matavimas, taikant perpus mažesnį srauto greitį nei pirmąjį kartą. Jeigu abiejų matavimų rezultatai sutampa, bandymas yra patenkinamas. Jeigu esant mažesniam srauto greičiui nustatomas didesnis tirpumas, srauto greitis turi būti toliau mažinamas perpus tol, kol dviem vienas po kito einančiais matavimais bus gautas toks pat tirpumas.

19. Taikant abi procedūras turėtų būti patikrinama, ar frakcijose nėra koloidinių medžiagų, tiriant, ar nepasireiškia Tindalio efektas. Jeigu tokių dalelių yra, bandymo rezultatai negalioja, ir bandymas turėtų būti pakartojamas, prieš tai pagerinus kolonėlės filtruojamąsias savybes.

20. Turėtų būti išmatuojamas kiekvieno ėminio pH, geriausia – naudojant specialias indikacines juosteles.

Kolbos metodas

Principas

21. Bandomoji cheminė medžiaga (kietosios medžiagos turi būti pulverizuojamos) ištirpinama vandenyje, kurio temperatūra šiek tiek aukštesnė už bandymo temperatūrą. Pasiekus sotį, mišinys ataušinamas ir laikomas bandymo temperatūroje. Matavimas gali būti atliekamas ir esant tiksliai bandymo temperatūrai, jeigu atitinkama ėminių imtimi užtikrinama, kad bus pasiekta soties pusiausvyra. Tada bandomosios cheminės medžiagos masės koncentracija vandeniniame tirpale, kuriame turi nebūti neištirpusių dalelių, yra nustatoma atitinkamu analizės metodu (3).

Aparatūra

22. Reikalingos tokios medžiagos:

— įprasti laboratoriniai stikliniai indai ir prietaisai,

— prietaisas, tinkamas tirpalams suplakti kontroliuojamoje pastovioje temperatūroje,

— centrifuga (pageidautina, su reguliuojama temperatūra), jeigu ji būtina emulsijoms parengti, ir

— analizės įranga.

Procedūra

23. Išankstiniu bandymu apskaičiuojamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis, reikalingas pageidaujamam vandens tūriui įsotinti. Apytikriai penkis kartus didesnis kiekis įdedamas į kiekvieną iš trijų stiklinių indų su stikliniais kaiščiais (pvz., centrifugos vamzdžius, kolbas). Į kiekvieną indą įpilamas vandens kiekis, parinktas atsižvelgiant į analizės metodą ir tirpumo intervalą. Indai tvirtai uždaromi ir kratomi 30 °C temperatūroje. Turėtų būti naudojamas kratytuvas arba maišytuvas, galintis dirbti pastovioje temperatūroje, pvz., gali būti taikomas magnetinis maišymas termostatu kontroliuojamoje vandens vonelėje. Po paros vienas indas išimamas ir 24 valandoms paliekamas bandymo temperatūroje, kad nusistovėtų pusiausvyra, retsykiais pakratant.

▼M4

Tada indo turinys centrifuguojamas bandymo temperatūroje ir atitinkamu analizės metodu nustatoma bandomosios cheminės medžiagos koncentracija skaidrioje vandeninėje fazėje. Su kitomis dviem kolbomis daroma taip pat, prieš tai atitinkamai per dvi ir tris paras užtikrinus pradinę pusiausvyrą 30 °C temperatūroje. Jeigu bent paskutiniuosiuose dviejuose induose išmatuota koncentracija nesiskiria daugiau kaip 15 %, bandymas yra patenkinamas. Jeigu 1, 2 ir 3 indų rezultatai krypsta į didesnes vertes, visas bandymas turėtų būti pakartojamas taikant ilgesnius pusiausvirinimo laikotarpius.

24. Bandymas gali būti atliekamas ir be išankstinio laikymo 30 °C temperatūroje. Kad būtų galima apskaičiuoti soties pusiausvirinimo greitį, ėminiai imami tol, kol maišymo laikas nebeturi įtakos išmatuotai koncentracijai.

25. Turėtų būti išmatuojamas kiekvieno ėminio pH, geriausia – naudojant specialias indikacines juosteles.

Analitiniai tyrimai

26. Turėtų būti taikomas konkrečiai cheminei medžiagai pritaikytas metodas, kadangi nedideli priemaišų medžiagų kiekiai gali būti didelių matuojamo tirpumo paklaidų priežastis. Tokių metodų pavyzdžiai: dujų arba skysčių chromatografija, titravimo metodai, fotometriniai metodai, voltamperometriniai metodai.

DUOMENYS IR ATASKAITOS

Duomenys

Kolonėlės eliuavimo metodas

27. Per kiekvieną matavimą turėtų būti apskaičiuotos ne mažiau kaip penkių iš soties kreivės plokščiosios dalies paeiliui paimtų ėminių vidutinės vertės ir standartiniai nuokrypiai. Vidutinės vertės, gautos per du bandymus taikant skirtingus srautus, turėtų skirtis ne daugiau kaip 30 %.

Kolbos metodas

28. Apskaičiuojamas kiekvienoje iš trijų kolbų gautų atskirų rezultatų, kurie turėtų skirtis ne daugiau kaip 15 %, vidurkis.

Bandymo ataskaita

Kolonėlės eliuavimo metodas

29. Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta tokia informacija:

— išankstinio bandymo rezultatai,

— cheminis tapatumas ir priemaišos (išankstinio gryninimo etapas, jeigu toks buvo taikomas),

— kiekvieno ėminio koncentracija, srauto greitis ir pH,

— ne mažiau kaip penkių ėminių, paimtų iš kiekvieno matavimo soties kreivės plokščiosios dalies, vidutinės vertės ir standartiniai nuokrypiai,

— dviejų vienas po kito atliktų matavimų vidurkis,

— vandens temperatūra įsotinimo metu,

— analizės metodas,

— pagalbinės medžiagos pobūdis,

— pagalbinės medžiagos dėjimas,

— naudotas tirpiklis,

— cheminės medžiagos cheminio nestabilumo per bandymą įrodymai,

— visa informacija, svarbi rezultatų aiškinimui, ypač apie priemaišas ir bandomosios cheminės medžiagos fizinę būseną.

▼**M4**

Kolbos metodas

30. Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta tokia informacija:

— išankstinio bandymo rezultatai,

— cheminis tapatumas ir priemaišos (išankstinio gryninimo etapas, jeigu toks buvo taikomas),

— atskiri analitiniai tyrimai ir vidurkis, jeigu kiekvienai kolbai buvo nustatoma daugiau nei viena vertė,

— kiekvieno ėminio pH,

— skirtingų kolbų, kurių duomenys sutampa, verčių vidurkis,

— bandymo temperatūra,

— analizės metodas,

— cheminės medžiagos cheminio nestabilumo per bandymą įrodymai,

— visa informacija, svarbi rezultatų aiškinimui, ypač apie priemaišas ir bandomosios cheminės medžiagos fizinę būseną.

LITERATŪRA

1. 1992 m. liepos 31 d. Komisijos direktyva 92/69/EEB, septynioliktąjį kartą su technikos pažangos derinanti Tarybos direktyvą 67/548/EEB dėl įstatymų ir kitų teisės aktų, reglamentuojančių pavojingų medžiagų klasifikavimą, pakavimą ir ženklinimą etiketėmis, suderinimo (OL L 383, 1992 12 29, p. 113).

2. NF T 20–045 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility — Column elution method.

3. NF T 20–046 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility — Flask method.

▼C1

A.7. PASISKIRSTYMO KOEFICIENTAS

1. METODAS

Apibūdintasis „kratomos kolbos“ metodas yra pagrįstas OECD Bandymų gairėmis (1).

1.1. ĮVADAS

Šiam bandymui naudinga turėti išankstinę informaciją apie medžiagos struktūrinę formulę, disociacijos konstantą, tirpumą vandenyje, hidrolizę, tirpumą n-oktanolyje ir paviršiaus įtemptį.

Matavimai turėtų būti atliekami su jonizuojamomis medžiagomis, esančiomis tik nejonizuotoje formoje (laisvoji rūgštis arba bazė) ir gaunamomis naudojant atitinkamą buferinį tirpalą, kurio pH ne mažiau kaip vienu vienetu mažesnis (laisvoji rūgštis) arba didesnis (laisvoji bazė) nei pK.

Šį bandymo metodą sudaro du atskiri metodai: kratomos kolbos metodas ir efektyvioji skysčių chromatografija (HPLC). Pirmasis yra taikomas, kai log P_{ow} vertė (žr. toliau esančius apibrėžimus) yra 2–4 ribose, o antrasis – 0–6 ribose. Prieš atliekant bet kurį iš šių eksperimentų, pirma turėtų būti iš anksto apskaičiuojamas galimas pasiskirstymo koeficientas.

Kratomos kolbos metodas taikomas tik visiškai grynoms, vandenyje ir n-oktanolyje tirpioms medžiagoms. Jis netaikomas paviršinio aktyvumo medžiagoms (kurioms turėtų būti pateikiama apskaičiuota vertė arba apskaičiavimai, pagrįsti individualiu tirpumu n-oktanolyje ir vandenyje).

HPLC metodas neturi būti taikomas stiprioms rūgštims ir bazėms, metalų kompleksiniams junginiams, paviršinio aktyvumo medžiagoms arba medžiagoms, reaguojančioms su eliuatu. Šioms medžiagoms turėtų būti pateikiama apskaičiuotoji vertė arba apskaičiavimas, pagrįstas individualiuoju tirpumu n-oktanolyje arba vandenyje.

HPLC metodas yra mažiau jautrus priemaišoms, esančioms bandomajame junginyje, negu kratomos kolbos metodas. Nepaisant to, dėl priemaišų buvimo kai kuriais atvejais rezultatų aiškinimas tampa sudėtingas, kadangi tampa sunku priskirti smailes. Mišiniams, kurių juostos neišskaidytos, turėtų būti nustatomos viršutinė ir apatinė log P ribos.

1.2. APIBRĖŽTIS IR VIENETAI

Pasiskirstymo koeficientas (P) yra apibrėžiamas kaip medžiagos, ištirpintos dviejų fazių sistemoje, sudarytoje iš dviejų nesimaišančių tirpiklių, pusiausvyros koncentracijų (c_i) santykis. Jeigu tai n-oktanolis ir vanduo:

$$p_{ow} = \frac{(c_{n-oktanolis})}{(c_{vanduo})}$$

Todėl pasiskirstymo koeficientas (P) yra dviejų koncentracijų dalmuo ir paprastai pateikiamas kaip jo dešimtainis logaritmas (log P).

▼C1

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Kratomos kolbos metodas

Etaloninių medžiagų nereikia naudoti visais tais atvejais, kai tiriama nauja medžiaga. Pirmiausiai jos turėtų būti naudojamos kartkartėmis tikrinant metodo veikimą ir palyginant gautus rezultatus su kitais metodais gautais rezultatais.

HPLC metodas

Norint išmatuotus HPLC duomenis apie junginį susieti su jo P verte, turi būti brėžiamas kalibravimo log P palyginimo su chromatografiniais duomenimis kreivė, panaudojant ne mažiau kaip 6 pamatinius taškus. Vartotojas sprendžia, kokias tinkamas etalonines medžiagas naudoti. Jeigu įmanoma, ne mažiau kaip vieno etaloninio junginio P_{ow} turėtų būti didesnis negu bandomosios medžiagos, o kitas P turėtų būti mažesnis negu bandomosios medžiagos. Jeigu log P_{ow} vertės yra mažesnės nei 4, kalibravimas gali būti pagrindžiamas duomenimis, gautais kratomos kolbos metodu. Kai log P vertės didesnės nei 4, kalibravimas gali būti pagrindžiamas literatūroje patvirtintomis vertėmis, jeigu jos atitinka apskaičiuotąsias vertes. Norint gauti tikslesnes vertes, geriau pasirinkti tuos etaloninius junginius, kurie struktūros požiūriu yra panašūs į bandomąja medžiaga.

Išsamų daugumos cheminių medžiagų log P_{ow} verčių sąrašą galima rasti 2 ir 3 nuorodose. Jeigu duomenų apie struktūriškai susijusių junginių pasiskirstymo koeficientus neįmanoma gauti, tada gali būti naudojamas bendresnio pobūdžio kalibravimas, nustatytas su kitais etaloniniais junginiais.

Rekomenduojamų etaloninių medžiagų ir jų P_{ow} verčių sąrašas pateiktas 2 priedėlyje.

1.4. METODO PRINCIPAS

1.4.1. **Kratomos kolbos metodas**

Pasiskirstymo koeficientui nustatyti turi būti pasiekiama pusiausvyra tarp visų sąveikaujančių sistemos sudedamųjų dalių ir turi būti nustatytos koncentracijos medžiagų, ištirpintų abiejose fazėse. Šiam klausimui skirtos literatūros nagrinėjimas rodo, kad problemai spręsti gali būti naudojamos kelios metodikos, pvz., kruopštus dviejų fazių sumaišymas ir po to vykstantis jų atskyrimas, norint nustatyti tyrinėjamos medžiagos pusiausvyros koncentraciją.

1.4.2. **HPLC metodas**

HPLC yra atliekama su analizinėmis kolonėlėmis, įkrautomis prekyboje esančiomis kietosiomis fazėmis su ilgomis angliavandenių grandinėmis (pvz., C_8, C_{18}), chemiškai sujungtomis su kvarcu. Chemikalai, įšvirkšti į tokią kolonėlę, juda išilgai jos skirtingais greičiais, kadangi pasiskirstymas tarp judančiosios būsenos ir angliavandenio statinės būsenos yra skirtingo laipsnio. Chemikalų mišiniai dėl jų hidrofobiškumo yra pirma eliuojami vandenyje tirpiais chemikalais, po to alyvoje tirpiais chemikalais proporcingai jų angliavandenio ir vandens pasiskirstymo koeficientui. Tai leidžia nustatyti santykį tarp sulaikymo trukmės tokioje kolonėlėje (atvirkštinė fazė) ir n-oktanolio/vandens pasiskirstymo koeficientą. Pasiskirstymo koeficientas yra nustatomas iš *talpos faktoriaus k*, gaunamo iš lygties:

▼C1

$$k = \left(\frac{(t_r - t_o)}{(t_o)}\right)$$

kai t_R – bandomosios medžiagos sulaikymo trukmė, o t_o – vidutinis laikas, reikalingas tirpiklio molekulei pereiti per kolonėlę (pradinis laikas).

Kiekybiniai analizės metodai nereikalingi, reikia tik nustatyti eliuavimo laiką.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

1.5.1. **Pakartojamumas**

Kratomos kolbos metodas

Norint užtikrinti pasiskirstymo koeficiento tikslumą, bandymas turi būti atliekamas du kartus, esant trims skirtingoms bandymo sąlygoms, kuriomis apibrėžtas medžiagos kiekis, taip pat tirpiklio tūriai gali būti keičiami Nustatytos pasiskirstymo koeficiento vertės, išreikštos bendruoju logaritmu, turėtų patekti į ± 0,3 log vienetų intervalą.

HPLC metodas

Norint padidinti pasikliovimą matavimais, turi būti atliekami kartotiniai bandymai. Log P vertės, gautos iš pavienių matavimų, turėtų patekti į ± 0,1 log vienetų intervalą.

1.5.2. **Jautrumas**

Kratomos kolbos metodas

Metode naudojamas matavimų intervalas yra nustatomas pagal analizės procedūros aptikimo ribą. Tai turėtų leisti įvertinti log P_{ow} vertes intervale nuo 2 iki 4 (kartais, kai to reikalauja tam tikros sąlygos, šis intervalas log P_{ow} gali būti išplečiamas iki 5), jeigu tirpinio koncentracija bet kokioje būsenoje nėra didesnė negu 0,01 molio viename litre.

HPLC metodas

HPLC metodas leidžia įvertinti log P_{ow} pasiskirstymo koeficientus intervale nuo 0 iki 6.

Paprastai junginio pasiskirstymo koeficientas gali būti įvertinamas per ± 0,1 log vienetų nuo kratomos kolbos vertės. Tipiška koreliacija gali būti randama 4, 5, 6, 7, 8 literatūros nuorodose. Didesnį tikslumą galima pasiekti, jeigu koreliacijos grafikai yra pagrindžiami struktūriškai susijusiais etaloniniais junginiais (9).

▼C1

1.5.3. **Specifiškumas**

Kratomos kolbos metodas

Nernsto pasiskirstymo dėsnis praskiestiems tirpalams taikomas tik esant pastoviai temperatūrai, slėgiui ir pH. Jis taikomas tiktai grynai medžiagai, ištirpintai dviejuose grynuose tirpikliuose. Jeigu tuo pačiu metu keli skirtingi tirpiniai yra vienoje arba abiejose būsenose, tai gali turėti įtakos rezultatams.

Dėl ištirpusių molekulių disociacijos arba asociacijos yra gaunami nukrypimai nuo Nersto pasiskirstymo dėsnio. Tokius nukrypimus rodo tai, kad pasiskirstymo koeficientas tampa priklausomu nuo tirpalo koncentracijos.

Dėl daugkartinės pusiausvyros nusistovėjimo poreikio šis bandymo metodas neturėtų būti naudojamas jonizuojamiems junginiams, jeigu nenaudojama korekcija. Tokiems junginiams reikėtų apsvarstyti galimybę vietoje vandens naudoti buferinius tirpalus; buferinio tirpalo pH turėtų būti ne mažesnis kaip vienas medžiagos pKa vienetas, ir reikėtų atsižvelgti į šio pH tinkamumą bandymo sąlygoms.

1.6. METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Išankstinis pasiskirstymo koeficiento įvertinimas**

Pasiskirstymo koeficientą geriau vertinti naudojant apskaičiavimo metodą (žr. 1 priedėlį) arba atitinkamais atvejais pagal bandomosios medžiagos tirpumo koeficientą grynuose tirpikliuose (10).

1.6.2. **Kratomos kolbos metodas**

1.6.2.1. *Pasiruošimas*

n-oktanolis: pasiskirstymo koeficiento nustatymas turėtų būti atliekamas su didelio grynumo analiziniais reagentais.

Vanduo: turėtų būti naudojamas distiliuotas arba du kartus distiliuotas vanduo, naudojant stiklinį arba kvarcinį aparatą. Jonizuojamiems junginiams, jeigu tai pagrįsta, vietoje vandens turėtų būti naudojami buferiniai tirpalai.

Pastaba

Vanduo, paimtas tiesiogiai iš jonitinio filtro, neturėtų būti naudojamas.

1.6.2.1.1. Išankstinis tirpiklių sotinimas

Prieš nustatant pasiskirstymo koeficientą, tirpiklio sistemos fazės yra abipusiai sotinamos purtant eksperimento temperatūroje. Kad tai būtų atlikta, pakanka ant mechaninės purtyklės 24 valandas purtyti du didelius standartinius butelius, kuriuose yra didelio grynumo analizinis n-oktanolis arba vanduo su pakankamu kiekiu kito tirpiklio, po to leidžiama pakankamai ilgai nusistovėti, kad atsiskirtų fazės ir būtų pasiekta sotis.

▼C1

1.6.2.1.2. Pasiruošimas bandymui

Visas dviejų fazių sistemos tūris turėtų beveik užpildyti bandymo indą. Taip bus išvengta medžiagos nuostolių dėl lakumo. Naudotini tūrio santykiai ir medžiagos kiekiai pasirenkami taip:

— išankstinis pasiskirstymo koeficiento apskaičiavimas (žr. ankstesnį punktą),

— mažiausias bandomos medžiagos kiekis, reikalingas analizei atlikti, ir

— didžiausios koncentracijos apribojimas bet kurioje fazėje 0,01 molio viename litre.

Atliekami trys bandymai. Pirmajame naudojamas apskaičiuotas n-oktanolio ir vandens tūrio santykis; antrajame – šis santykis dalinamas iš dviejų; o trečiajame – šis santykis dauginamas iš dviejų (pvz., 1:1; 1:2; 2:1).

1.6.2.1.3. Bandomoji medžiaga

Pagrindinis tirpalas paruošiamas iš anksto vandeniu įsotintame n-oktanolyje. Šio pagrindinio tirpalo koncentracija turėtų būti tiksliai nustatoma prieš jį naudojant pasiskirstymo koeficiento nustatymui. Šis tirpalas turėtų būti laikomas jo stabilumą užtikrinančiomis sąlygomis.

1.6.2.2. *Bandymo sąlygos*

Turėtų būti išlaikoma pastovi bandymo temperatūra (± 1 °C), o temperatūros intervalas – 20–25 °C.

1.6.2.3. *Matavimo eiga*

1.6.2.3.1. Pasiskirstymo pusiausvyros nustatymas

Kiekvienai bandymo sąlygai turėtų būti paruošiami dvigubi bandymo indai su reikalingu tiksliai pamatuotu dviejų tirpiklių kiekiu ir su būtinu pagrindinio tirpalo kiekiu.

n-oktanolio fazės turėtų būti matuojamos pagal tūrį. Bandymo indai turėtų būti dedami arba į tinkamą purtyklę arba kratomi ranka. Jeigu naudojamas centrifugos vamzdelis, rekomenduojama greitai sukti vamzdelį 180° apie jo skersinę ašį taip, kad bet koks pagautas oro kiekis iškiltų per tas dvi fazes. Patirtis parodė, kad pasiskirstymo pusiausvyrai nusistovėti paprastai pakanka 50 tokių apsukų. Kad nekiltų abejonių, rekomenduojama 100 apsukų per penkias minutes.

1.6.2.3.2. Fazių atskyrimas

Jeigu reikia, kad fazės atsiskirtų, mišinys centrifuguojamas. Tai turėtų būti atliekama laboratorine centrifuga kambario temperatūroje arba, jeigu naudojama centrifuga su nekontroliuojama temperatūra, centrifugos vamzdeliai, siekiant nustatyti pusiausvyrą, turėtų būti laikomi bandymo temperatūroje ne trumpiau kaip vieną valandą iki analizės.

▼C1

1.6.2.4. *Analizė*

Nustatant pasiskirstymo koeficientą yra būtina nustatyti bandomos medžiagos koncentracijas abiejose fazėse. Tą galima atlikti iš kiekvieno vamzdelio imant kiekvienos iš dviejų fazių alikvotinę dalį kiekvienai bandymo sąlygai ir jas analizuoti pagal pasirinktą darbo eigą. Visas medžiagos, esančios abiejose fazėse, kiekis turėtų būti apskaičiuojamas ir palyginamas su iš įdėtos medžiagos kiekiu.

Vandens fazės mėginiai turėtų būti imami tokia tvarka, kad būtų kaip galima labiau sumažinamas pavojus įtraukti n-oktanolio pėdsakus: vandens fazės mėginiui paimti gali būti naudojamas stiklinis švirkštas su nuimama adata. Iš pradžių švirkštas turėtų būti iš dalies pripildytas oro. Oras turėtų būti švelniai išstumiamas tuo pačiu metu įterpiant adatą per n-oktanolio sluoksnį. Į švirkštą įtraukiamas pakankamas tūris vandens fazės. Švirkštas greitai ištraukiamas iš tirpalo ir nuimama adata. Švirkšto turinys gali būti naudojamas kaip vandeninis bandinys. Dviejų atskirtų fazių koncentraciją geriau nustatyti tai medžiagai tinkamu metodu. Analizės metodų, kurie gali būti tinkami, pavyzdžiai:

— fotometrinis metodas,

— dujų chromatografija,

— efektyvioji skysčių chromatografija.

1.6.3. **HPLC metodas**

1.6.3.1. *Pasiruošimas*

Aparatūra

Reikalingas skysčių chromatografas su įtaisytu impulsų nesukeliančiu siurbliu ir atitinkamu detektoriumi. Rekomenduojama naudoti injekcinį vožtuvą su injekcinėmis kilpomis. Tai, kad statinėje fazėje yra polinės grupės, gali smarkiai pakenkti HPLC kolonėlės darbui. Todėl statinėse fazėse turėtų būti mažiausias procentas polinių grupių (11). Gali būti naudojamos parduodamos mikrodalelių atvirkštinių fazių įkrovos arba jau įkrautos kolonėlės. Apsaugos kolonėlė gali būti dedama tarp įšvirkštimo sistemos ir analizinės kolonėlės.

Judančioji fazė

HPLC tinkantis metanolis ir HPLC tinkantis vanduo naudojami eliuentiniam tirpikliui paruošti, kuris prieš naudojimą degazuojamas. Turėtų būti naudojamas izokratinis eliuavimas. Turėtų būti naudojami metanolio/vandens santykiai su mažiausiu 25 % vandens kiekiu. Paprastai pakanka 3:1 (v/v) metanolio-vandens mišinio log P 6 junginiams eliuuoti per vieną valandą, kai debitas 1 ml/min. Jeigu junginių log P didelis, gali reikėti sutrumpinti eliuavimo laiką (taip pat ir etaloninių junginių), sumažinant judančiosios fazės poliškumą arba kolonėlės ilgį.

Medžiagos, kurių tirpumas n-oktanolyje yra mažas, turi polinkį mažoms log P_{ow} vertėms, kai naudojamas HPLC metodas; tokių junginių smailės kartais atsiranda įvykus tirpiklio frontui. Tai tikriausiai vyksta dėl to, kad pasiskirstymo procesas yra per lėtas pusiausvyrai pasiekti per normalų HPLC atskyrimo laiką. Tada debito mažinimas ir (arba) metanolio/vandens santykio mažinimas gali būti veiksminga priemonė patikimai vertei gauti.

▼C1

Bandomieji ir etaloniniai junginiai turėtų būti tirpūs judančiojoje fazėje ir pakankamos koncentracijos, kad juos būtų galima aptikti. Tik išimtiniais atvejais gali būti naudojami priedai su metanolio ir vandens mišiniu, kadangi priedai pakeičia kolonėlės savybes. Chromatogramose su priedais yra privaloma naudoti tokios pat rūšies atskirą kolonėlę. Jeigu metanolio ir vandens mišinys netinka, gali būti naudojami kiti organiniai vandenyje tirpūs mišiniai, pvz., etanolis ir vanduo arba acetonitrilas ir vanduo.

Eliuato pH yra ypač svarbus jonizuojamiems junginiams. Jis turėtų būti kolonėlės eksploatacijos pH intervalo ribose, kuris paprastai yra 2–8. Priderinant rekomenduojama naudoti buferinius tirpalus. Reikia stengtis išvengti druskų nuosėdų ir kolonėlės gedimų, kurie pasireiškia dėl tam tikrų organinės fazės/buferinių mišinių. Nepatartina matuoti HPLC kvarcinėmis stacionariomis fazėmis, kai pH didesnis negu 8, kadangi dėl naudojamos šarminės judančiosios fazės gali greitai pablogėti kolonėlės veikimas.

Tirpiniai

Etaloniniai junginiai turėtų būti kiek įmanoma grynesni. Junginiai, kurie turi būti naudojami bandyme arba kalibravimui, jeigu įmanoma, ištirpinami judančiojoje fazėje.

Bandymo sąlygos

Matavimų metu temperatūra neturėtų svyruoti daugiau negu ± 2 K.

1.6.3.2. **Matavimas**

Nulinio laiko t_o apskaičiavimas

Nulinį laiką t_o galima nustatyti naudojant homologinę eilę (pvz., n-alkilmetilketonus) arba nepasiskirsčiusius organinius junginius (pvz., tiokarbamidas arba formamidas). Apskaičiuojant nulinį laiką t_o naudojant homologinę eilę, įšvirkščiami ne mažiau kaip septyni homologinės eilės nariai ir nustatomos atitinkamos sulaikymo trukmės. Neapdorotos sulaikymo trukmės $t_{r(nc + 1)}$

brėžiamos kaip $t_{r(nc + 1)}$ funkcija, o a ir b regresijos lygties atidėjimas ir pasvirimas::

$$t_r\ (_{nc + 1}) = a + b\ t_r\ (_{nc})$$

čia (n_c – anglies atomų skaičius). Po to nulinis laikas t_o apskaičiuojamas pagal: $t_0 = a / (1 - b)$

▼C1

Kalibravimo grafikas

Po to sudaromas log k verčių ir log P santykio koreliacijos grafikas atitinkamiems etaloniniams junginiams. Praktiškai vienu metu įšvirkščiama nuo 5 iki 10 standartinių etaloninių junginių, kurių log P maždaug atitinka tikėtiną intervalą, ir nustatomos sulaikymo trukmės, geriau ant įrašančiojo integratoriaus, sujungto su aptikimo sistema. Apskaičiuojami atitinkami talpos koeficiento logaritmai log k ir brėžiamas log P, nustatyto kratomos kolbos metodu, funkcijos grafikas. Kalibruojama reguliariais intervalais, ne rečiau kaip kartą per dieną, kad būtų galima atlikti galimus pakitimus kolonėlės darbe.

Bandinio talpos koeficiento nustatymas

Įšvirkščiamas kiek įmanoma mažesnis bandinio judančiosios fazės kiekis. Nustatoma tokia sulaikymo trukmė (dvigubas matavimas), kad būtų galima apskaičiuoti talpos koeficientą k. Iš etaloninių junginių koreliacijos grafiko galima interpoliuoti bandinio pasiskirstymo koeficientą. Jeigu pasiskirstymo koeficientas labai mažas arba labai didelis, būtina ekstrapoliacija. Tokiais atvejais ypač reikia atsižvelgti į regresijos tiesės pasikliovimo ribas.

2. **DUOMENYS**

Kratomos kolbos metodas

Nustatytų P verčių patikimumas gali būti patikrinamas palyginant dviejų bandymų vidurkius su suminiu vidurkiu.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

— tikslus medžiagos apibūdinimas(tapatumas ir priemaišos),

— jeigu metodų neįmanoma panaudoti (pvz., paviršinio aktyvumo medžiaga), turėtų būti pateikiama apskaičiuotoji vertė arba duomenys, pagrįsti individualiu tirpumu n-oktanolyje ir vandenyje,

— visa informacija ir pastabos, svarbios duomenų aiškinimui, ypač atsižvelgiant į medžiagoje esančias priemaišas ir jos fizinę būseną.

Kratomos kolbos metodui:

— išankstinio įvertinimo, jei toks buvo, rezultatai,

— bandymo temperatūra,

— duomenys apie analizės procedūras, naudotas nustatant koncentracijas,

— centrifugavimo, jei jis buvo naudotas, laikas ir greitis,

▼C1

— kiekvienam nustatymui matuotos koncentracijos abiejose fazėse (tai reiškia, kad ataskaitoje bus pateikta iš viso 12 koncentracijų),

— bandinio svoris, kiekvienos naudotos fazės tūris kiekviename mėgintuvėlyje ir visas apskaičiuotas mėginio kiekvienoje fazėje kiekis nusistovėjus pusiausvyrai,

— apskaičiuotos pasiskirstymo koeficiento (P) vertės ir vidutinė vertė turėtų būti pateikiamos ataskaitoje kiekvienai bandymo sąlygų grupei, kaip ir visų nustatymų vidutinės vertės. Jeigu galima prielaida, kad koncentracija priklauso nuo pasiskirstymo koeficiento, tai turėtų būti nurodoma ataskaitoje,

— turėtų būti pateikiami standartiniai individualiųjų P verčių nuokrypiai nuo vidutinės vertės,

— visų nustatymų vidurkis P turėtų būti išreiškiamas logaritmu (dešimtainis logaritmas),

— teoriškai apskaičiuotas P_{ow}, jei ši vertė buvo nustatyta arba jeigu išmatuotoji vertė > 10^4,

— naudoto vandens ir vandens fazės pH eksperimento metu,

— jeigu naudojami buferiniai tirpalai, buferių naudojimo vietoje vandens pagrindimas, buferinių tirpalų sudėtis, koncentracija ir pH, vandens fazės pH prieš eksperimentą ir po jo.

HPLC metodui:

— išankstinių vertinimų, jeigu tokie buvo, rezultatai,

— mėginiai ir etaloninės medžiagos, jų grynumas,

— nustatymo temperatūros intervalas,

— pH dydis, kuriam esant buvo atliekamas nustatymas,

— išsami informacija apie analizės ir apsauginę kolonėlę, judančiąją fazę ir nustatymo vidurkius,

— duomenys apie kalibravimui naudotų etaloninių junginių sulaikymo trukmes ir literatūroje randamas log P vertes

— išsami informacija apie regresijos kreivės sudarymą (log k santykis su log P),

— vidutiniai bandomo junginio duomenys apie sulaikymo trukmes ir interpoliuotą log P vertę,

— įrangos ir darbo sąlygų apibūdinimas,

— eliuavimo profiliai,

— į kolonėlę pakrautų mėginių ir etaloninių medžiagų kiekiai,

— nulinis laikas ir kaip jis buvo išmatuotas.

▼C1

4. **NUORODOS**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.

2) C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman, A.J. Leo, dir.) – Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.

4) L. Renberg, G. SundstrËm and K. Sundh-Nygärd, Chemosphere, 1980, vol. 80, p. 683.

5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, p. 219.

6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, p. 73.

7) W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, p. 1.

8) J.E. Haky and A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, p. 675

9) S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, p. 787

10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumpraxis (edited by E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, p. 223–339.

11) R.F. Rekker and H.M. de Kort, euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, p. 479

12) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, vol. 71, p. 525.

13) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.

14) NF T 20–043 AFNOR (1985). Chemical prqducts for industrial use – Determination of partition coefficient – Flask shaking method.

15) C.V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, p. 1459

16) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, p. 525

17) C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani and E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, p. 1207.

18) W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, p. 1113.

19) D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, p. 382

20) J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York 1979.

▼C1

21) R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam 1984,

22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Base11978.

23) N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, p. 615.

▼C1

1 priedėlis

APSKAIČIAVIMO / VERTINIMO METODAI

ĮVADAS

Apskaičiavimo metodų, duomenų ir pavyzdžių bendrasis įvadas pateiktas „Handbook of Chemical Property Estimation Methods“ (a).

Apskaičiuotosios P_{ow} vertės gali būti naudojamos:

— spręsti apie eksperimentinių metodų tinkamumą (kratomos kolbos metodo intervalas: log P_{ow} vertės nuo 2 iki 4, HPLC intervalas: log P_{ow}: nuo 0 iki 6),

— bandymo tinkamoms sąlygoms parinkti (pvz., etalonines medžiagas HPLC metodikose, n-oktanolio ir vandens tūrių santykį kratomos kolbos metode),

— kaip galimų eksperimentinių paklaidų laboratorijos vidinės kontrolės priemonė,

— P_{ow} gauti tais atvejais, kai eksperimentiniai metodai negali būti taikomi dėl techninių priežasčių.

VERTINIMO METODAS

Išankstinis pasiskirstymo koeficiento įvertis

Pasiskirstymo koeficientas gali būti įvertintas, naudojant bandomosios medžiagos tirpumo grynuose tirpikliuose vertes:

Taigi:

$$P_{įvertis} = \frac{\text{soties } C_{n-\text{oktanolis}}}{\text{soties } C_{\text{vanduo}}}$$

APSKAIČIAVIMO METODAI

Apskaičiavimo metodų esmė

Visi apskaičiavimo metodai remiasi formaliuoju molekulės dalinimu į atitinkamas mažesnes struktūras, kurių log P_{ow} tikrieji pokyčiai yra žinomi. Tuomet visos molekulės log P_{ow} apskaičiuojamas kaip atitinkamų dalių verčių suma pridedant pataisos dėl sąveikų molekulės viduje dėmenų sumą.

Dalių konstantų ir pataisos dėmenų sąrašus galima rasti (b), (c), (d), (e). Kai kurie sąrašai yra nuolat atnaujinami (b).

Kokybės kriterijai

Paprastai apskaičiavimo metodo patikimumas mažėja kuo sudėtingesnė junginio sandara. Paprastų molekulių, turinčių mažą molekulinę masę ir vieną arba dvi funkcines grupes, atveju, tarp įvairiais fragmentavimo metodais gautų rezultatų ir išmatuotos vertės galima laukti 0,1–0,3 log P_{ow} vieneto nuokrypio. Sudėtingesnių molekulių atveju paklaidos ribos gali būti didesnės. Tai priklauso nuo fragmentų konstantų patikimumo ir jų buvimo, taip pat nuo sugebėjimo įvertinti intramolekulines sąveikas (pvz., vandenilio jungtis) ir pataisos dėmenų teisingo naudojimo (mažiau problemų turint kompiuterinę programą CLOGP-3) (b). Joninių junginių atveju svarbu teisingai įvertinti krūvį arba jonizacijos laipsnį.

▼C1

Apskaičiavimo procedūros

Hansch π-metodas

Pradinė hidrofobinio pakaito darinio konstanta, π, įvesta *Fujira ir kt.* (f) apibrėžiama taip:

$\pi_x = \log P_{ow}$ (PhX) – $\log P_{ow}$ (PhH)

čia: P_{ow} (PhX) aromatinio darinio pasiskirstymo koeficientas ir P_{ow} (PhH) pradinio junginio pasiskirstymo koeficientas

(pvz., $\pi_{Cl} = \log P_{ow}$ (C_6H_5Cl) - $\log P_{ow}$ (C_6H_6) = 2,84 – 2,13 = 0,71).

Pagal jo apibrėžimą π metodas labiausiai taikytinas pakaitų aromatiniame žiede atveju, π vertės didelei daliai pakaitų yra pateiktos lentelėse (b), (c), (d). Jos taikomos apskaičiuoti aromatinių molekulių arba aromatinių struktūrinių fragmentų log P_{ow}.

Rekker metodas

Pagal Rekker (g) log P_{ow} vertė apskaičiuojama taip:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{sąveikos dėmenų})$$

kai f_i įvairių molekulės fragmentų konstantos ir a_i – konstantų pasikartojimo dažnis tiriamoje molekulėje. Pataisos dėmenys gali būti išreikšti kaip vienos atskiros C_m, (vadinamosios „magiškosios konstantos“) sveikasis kartotinis. Fragmentų konstantos f_i ir C_m buvo nustatytos iš 1 054 eksperimentinių P_{ow} verčių sąrašo (825 junginiai), naudojant daugianarę regresinę analizę (c), (h). Sąveikos dėmenų nustatymas atliekamas pagal nustatytas taisykles, kurios aprašytos literatūroje (e), (h), (i).

Hansch-Leo metodas

Pagal Hansch ir Leo (c) log P_{ow} vertė apskaičiuojama taip:

$$\log P_{ow} = \left(\sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j\right)$$

kai f_i įvairių molekulės fragmentų konstantos, F – pataisos dėmenys ir a_i, b_j – atitinkami pasikartojimo dažniai. Atomų ir grupių fragmentinių verčių sąrašas ir pataisos dėmenų f_i (vadinamųjų faktorių) sąrašas buvo nustatyti bandymų ir klaidų metodu, naudojant eksperimentines P_{ow} vertes. Pataisos dėmenys buvo suskirstyti į keletą skirtingų klasių (a), (c). Atsižvelgti į visas taisykles ir pataisos dėmenis yra gana sudėtinga ir reikalauja daug laiko. Yra sukurti programų paketai (b).

Kombinuotasis metodas

Sudėtinių molekulių log P_{ow} apskaičiavimas gali būti iš esmės pagerintas, jei molekulė dalinama į didesnes struktūrines dalis, kurių log P_{ow} patikimos vertės randamos lentelėse (b), (c) arba gaunamos naudojant pačių atliktus matavimus. Vėliau tokie fragmentai (pvz., heterociklai, antrachinonas, azobenzenas) gali būti derinami su Hansch π-vertėmis arba su Rekker arba Leo fragmentų konstantomis.

Pastabos

i) Apskaičiavimo metodai gali būti taikomi tik iš dalies arba visiškai jonizuotiems junginiams, jei įmanoma atsižvelgti į būtinuosius pataisos faktorius.

▼C1

ii) Jei gali būti padaryta prielaida apie tarpmolekulinių vandenilinių jungčių buvimą, turi būti pridedami atitinkami pataisos dėmenys (maždaug nuo + 0,6 iki + 1,0 log P_{ow} vieneto) (a). Tokių ryšių buvimo požymiai gali būti gauti naudojant molekulės erdvinius modelius arba spektroskopinius duomenis.

iii) Jei galimos kelios tautomerinės formos, apskaičiavimai turi remtis pačia patikimiausia forma.

iv) Būtina kruopščiai sekti fragmentų konstantų sąrašų pataisas.

Ataskaita

Taikant apskaičiavimo/vertinimo metodus, bandymų ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti tokia informacija:

— medžiagos aprašymas (mišinys, priemaišos ir t. t.),

— kokio nors galimo intramolekulinio vandenilinio ryšio, disociacijos, krūvio ir visų kitų neįprastų veiksnių (pvz., tautomerijos) požymiai,

— apskaičiavimo metodo aprašymas,

— duomenų bazės identifikavimas arba šaltinis,

— ypatumai pasirenkant fragmentus,

— išsamus apskaičiavimo dokumentavimas.

NUORODOS

a) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.

b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

c) C. Hansch, A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

d) Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. -Chill. Ther. 1979, vol. 14, 479.

f) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc., 1964, vol. 86, 5175.

g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Elsevier, New York, 1977, vol.1.

h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12,1459.

i) R.A. Scherrer, ACS, American Chemical Society, Washington D.C., 1984, Symposium Series 255, p. 225.

▼C1

2 Priedėlis

Etaloninės medžiagos, rekomenduojamos naudoti taikant HPLC (high power liquid chromatography) – efektyviąją skysčių chromatografiją

Nr.	Etalonine medžiaga	Log P_{ow}	pKa
1	2-butanonas	0,3	
2	4-acetilpiridinas	0,5	
3	Anilinas	0,9	
4	N-fenilacetamidas	1,0	
5	Benzilo alkoholis	1,1	
6	p-metoksifenolis	1,3	pKa = 10,26
7	Feniloksiacto rūgštis	1,4	pKa = 3,12
8	Fenolis	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-dinitrofenolis	1,5	pKa = 3,96
10	Benznitrilas	1,6	
11	Fenilacetonitrilas	1,6	
12	4-metilbenzilo alkoholis	1,6	
13	Acetofenonas	1,7	
14	2-nitrofenolis	1,8	pKa = 7,17
15	3-nitrobenzenkarboninė rūgštis	1,8	pKa = 3,47
16	4-chloranilinas	1,8	pKa = 4,15
17	Nitrobenzenas	1,9	
18	3-fenilpropen-2-olis	1,9	
19	Benzenkarboninė rūgštis	1,9	pKa = 4,19
20	p-krezolis	1,9	pKa = 10,17
21	3-fenilakrilo rūgštis	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Anizolas	2,1	
23	Metilbenzoatas	2,1	
24	Benzenas	2,1	
25	3-metilbenzenkarboninė rūgštis	2,4	pKa = 4,27
26	4-chlorfenolis	2,4	pKa = 9,1
27	Trichloretilenas	2,4	
28	Atrazinas	2,6	
29	Etilbenzoatas	2,6	
30	2,6-dichlorbenznitrilas	2,6	
31	3-chlorbenzenkarboninė rūgštis	2,7	pKa = 3,82
32	Toluenas	2,7	
33	1-naftolis	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-dichloranilinas	2,8	
35	Chlorbenzenas	2,8	
36	Alilfenileteris	2,9	
37	Brombenzenas	3,0	

▼C1

Nr.	Etaloninė medžiaga	Log P_{ow}	pKa
38	Etilbenzenas	3,2	
39	Benzofenonas	3,2	
40	4-fenilfenolis	3,2	pKa = 9,54
41	Timolis	3,3	
42	1,4-dichlorbenzenas	3,4	
43	Difenilaminas	3,4	pKa = 0,79
44	Naftalinas	3,6	
45	Fenilbenzoatas	3,6	
46	Izopropilbenzenas	3,7	
47	2,4,6-trichlorfenolis	3,7	pKa = 6
48	Bifenilas	4,0	
49	Benzilbenzoatas	4,0	
50	2,4-dinitro-6-(antr- butil)-fenolis	4,1	
51	1,2,4-trichlorbenzenas	4,2	
52	Dodekankarboninė rūgštis	4,2	
53	Difenileteris	4,2	
54	n-butilbenzenas	4,5	
55	Fenantrenas	4,5	
56	Fluorantenas	4,7	
57	Dibenzilas	4,8	
58	2,6-difenilpiridinas	4,9	
59	Trifenilaminas	5,7	
60	DDT [2,2,2-trichlor-1,1-bis-(p-chlorfenil)etanas]	6,2	
	Kitos mažą log P_{ow} turinčios etaloninės medžiagos		
1	Nikotino rūgštis	– 0,07	

▼C1

A.8. PLIŪPSNIO TEMPERATŪRA

1. METODAS

1.1. ĮVADAS

Prieš atliekant šį bandymą, naudinga turėti išankstinę informaciją apie medžiagos degumą. Bandymo metodika taikytina skystosioms medžiagoms, kurių garai gali būti padegti uždegimo priemonėmis. Šiame tekste pateikti metodai patikimi tiktai tame pliūpsnio temperatūros intervale, kuris yra tam metodui nurodytas.

Pasirenkant konkretų metodą, turi būti atsižvelgta į tiriamosios medžiagos cheminės reakcijos su bandymo indu galimybę.

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Pliūpsnio temperatūra – tai mažiausia temperatūra, perskaičiuota 101,325 kPa slėgiui, kurioje bandymo metodui apibrėžtomis sąlygomis virš skysčio atsiranda tiek garų, kad mėginio inde susidaro degus garų ir oro mišinys.

Vienetai: °C;

$t = T - 273{,}15$;

(t nurodoma oC, T nurodoma K).

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Etalonines medžiagas nebūtina naudoti kiekvienu atveju tiriant naują medžiagą. Pagrindinis etaloninių medžiagų naudojimo tikslas yra periodiškai patikrinti metodo kokybę ir užtikrinti gautų rezultatų palyginamumą su kitais metodais gautais bandymų duomenimis.

1.4. METODO PRINCIPAS

Medžiaga pilama į mėginio indą ir pagal atskiram bandymo metodui naudojamą metodiką šildoma arba aušinama iki bandymo temperatūros. Uždegimo bandymai atliekami norint nustatyti, ar mėginys bandymo temperatūroje užsiliepsnoja ar neužsiliepsnoja.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

1.5.1. **Pakartojamumas**

Pakartojamumas kinta atsižvelgiant į pliūpsnio temperatūros intervalą ir taikomą bandymo metodą; didžiausias kintamumas 2 °C.

1.5.2. **Jautrumas**

Jautrumas priklauso nuo taikyto bandymo metodo.

1.5.3. **Specifiškumas**

Kai kurių bandymo metodų specifiškumas apribotas tam tikrais pliūpsnio temperatūros intervalais ir priklauso nuo medžiagai būdingų savybių (pvz., didelės klampos).

▼C1

1.6. METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Pasiruošimas**

Bandomosios medžiagos ėminys įpilamas į bandymo aparatą pagal 1.6.3.1 ir (arba) 1.6.3.2.

Saugai užtikrinti rekomenduojama, kad intensyviai reaguojančių ir nuodingų medžiagų bandinys būtų mažas, maždaug 2 cm^3.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

Aparatas, kiek tai atitinka saugą, turi būti dedamas nuo skersvėjų apsaugotoje vietoje.

1.6.3. **Bandymo eiga**

1.6.3.1. *Pusiausvyrinis metodas*

Žr. ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. *Nepusiausvyrinis metodas*

Abel aparatas:

žr. BS 2000 170 dalį, NF M07–011, NF T66–009.

Abel-Pensky aparatas:

žr. EN 57, DIN 51755 1 dalį (temperatūroms nuo 5 iki 65 °C), DIN 51755 2 dalį (temperatūroms mažesnėm nei 5 °C), NF M07–036.

Tag aparatas:

žr. ASTM D 56.

Pensky-Martens aparatas:

žr. ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000–34, NF M07–019.

Pastabos:

Kai nepusiausvyriniu metodu pagal 1.6.3.2 nustatoma, kad pliūpsnio temperatūra lygi 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C arba 55 ± 2 °C, jos vertė turi būti patvirtinta pusiausvyriniu metodu, naudojant tą patį aparatą.

Skelbti rezultatams gali būti taikomi tik tokie metodai, kuriais galima nustatyti pliūpsnio temperatūrą.

Klampių skysčių (dažų, dervų ir panašių medžiagų), kurių sudėtyje yra tirpiklių, pliūpsnio temperatūrai nustatyti gali būti taikomas tik klampių medžiagų pliūpsnio temperatūrai nustatyti tinkamas aparatais ir metodas.

Žr. ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 1 dalį.

▼C1

2. **DUOMENYS**

3. **ATASKAITA**

Jei įmanoma, bandymo ataskaitoje turi būti tokia informacija:

— tiksli medžiagos specifikacija (tapatumas ir priemaišos),

— turi būti nurodytas taikytas metodas, taip pat visi galimi nukrypimai,

— rezultatai ir visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus.

4. **NUORODOS**

Nėra

▼C1

A.9. **DEGUMAS (KIETOSIOS MEDŽIAGOS)**

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Prieš atliekant šį bandymą, naudinga turėti išankstinę informaciją apie medžiagos potencialias sprogstamąsias savybes.

Šis bandymas turi būti taikomas tik medžiagoms, turinčioms miltelių, granulių arba pastos pavidalą.

Siekiant, kad nebūtų apimtos visos medžiagos, kurios gali būti padegtos, o tik tos, kurios greitai dega arba kurių elgsena degant bet kuriuo atveju yra ypač pavojinga, labai degiomis medžiagomis laikomos tik tos medžiagos, kurių degimo greitis yra didesnis nei tam tikra ribinė vertė.

Gali būti ypač pavojinga, jei įkaitimo zona plinta metaliniuose milteliuose, kadangi gesinant liepsną kyla sunkumų. Metaliniai milteliai turi būti laikomi labai degiomis medžiagomis, jei jie palaiko įkaitimo zonos plitimą miltelių masėje per tam tikrą laiką.

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Degimo laikas išreiškiamas sekundėmis.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nenurodytos.

1.4. METODO PRINCIPAS

Formuojamas maždaug 250 mm ilgio vientisas medžiagos ruožas arba miltelių juosta ir atliekamas išankstinis atrankos bandymas, norint nustatyti, ar padegus dujiniu degikliu vyksta degančios liepsnos plitimas ar rusenimas. Jei plitimas 200 mm juosta įvyksta per nustatytą laiką, tuomet degimo greičiui nustatyti bandymas atliekamas pagal visą programą.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nenurodyti.

▼C1

1.6. METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Išankstinis atrankos bandymas**

Ant nedegios, neakytos ir šilumai nelaidžios pagrindo plokštės formuojamas maždaug 250 mm ilgio, 20 mm pločio ir 10 mm aukščio medžiagos ruožas arba miltelių juosta. Vienas miltelių juostos galas karšta dujų degiklio liepsna (mažiausias skersmuo 5 mm) veikiamas tol, kol milteliai užsidega arba ne ilgiau kaip 2 minutes (metalų arba metalų lydinių milteliai veikiami 5 minutes). Reikia pasižymėti, ar degimo zona išilgai 200 mm plinta 4 min. bandymo laiko (arba 40 minučių metalų miltelių atveju). Jei medžiaga neužsidega ir degimo zona išilgai 200 mm miltelių juostos plinta su liepsna arba rusenant 4 minutes (arba 40 minučių) bandymo laiko, medžiaga neturi būti laikoma labai degia ir toliau jos bandyti nereikia. Jei degimo zona 200 mm ilgio medžiagos miltelių juosta plinta mažiau kaip 4 minutes arba mažiau kaip 40 minučių, jei tai metaliniai milteliai, turi būti atliekama toliau aprašyta veiksmų seka (1.6.2 punktas ir toliau).

1.6.2. **Degimo greičio nustatymo bandymas**

1.6.2.1. *Pasiruošimas*

Medžiagos milteliai arba granulės suberiamos į 250 mm ilgio formą, turinčią trikampio formos skerspjūvį, kurio vidinis aukštis 10 mm ir plotis 20 mm. Abejose formos pusėse išilgine kryptimi tvirtinamos dvi iš šonų ribojančios metalinės plokštės, kurios yra 2 mm aukštesnės nei viršutinis trikampio skerspjūvio kraštas (žr. paveikslą). Forma tris kartus numetama iš 2 cm aukščio ant kieto paviršiaus. Jei reikia, forma vėl pripildoma. Šoninės ribojančios plokštės nuimamos ir medžiagos perteklius nubraukiamas. Ant formos viršaus uždedama nedegi, neakyta ir blogai šilumą leidžianti pagrindo plokštė, įtaisas apverčiamas ir forma nuimama.

Pastos pavidalo medžiagos dedamos ant nedegios, neakytos ir blogai šilumą leidžiančios pagrindo plokštės, suformuojant iš jų 250 mm ilgio juostelę, kurios skerspjūvio plotas apie 1 cm^2.

1.6.2.2. *Bandymų sąlygos*

Jei bandoma drėgmei jautri medžiaga, bandymas, ją išėmus iš pakuotės, turi būti atliekamas kiek įmanoma greičiau.

1.6.2.3. *Bandymo eiga*

Bandinys dedamas į traukos spintą skersai traukos krypčiai.

Oro greitis turi būti pakankamas, kad dūmai negalėtų patekti į laboratoriją, ir bandymo metu turi nesikeisti. Apie įtaisą turi būti įtaisytas nuo skersvėjo saugantis ekranas.

Bandiniui viename gale padegti naudojama karšta dujų degiklio liepsna (mažiausias skersmuo 5 mm). Nudegus 80 mm bandinio, kitoje 100 mm atkarpoje matuojamas degimo greitis.

▼C1

Bandymas atliekamas šešis kartus, kiekvieną kartą naudojant švarią šaltą plokštę, nebent teigiamas rezultatas gaunamas anksčiau.

2. **DUOMENYS**

Vertinant rezultatus svarbi degimo trukmė, nustatyta išankstiniame atrankos bandyme (1.6.1.) ir trumpiausia degimo trukmė, gauta atliekant ne daugiau kaip šešis bandymus (1.6.2.3.).

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMŲ ATASKAITA

Jei įmanoma, bandymų ataskaitoje turi būti tokia informacija:

— tiksli medžiagos specifikacija (tapatumas ir priemaišos),

— bandomosios medžiagos apibūdinimas, jos fizinė būsena, įskaitant drėgmės kiekį,

— išankstinių atrankos bandymų ir degimo greičio bandymo, jei buvo atliekamas, rezultatai,

— visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus.

3.2. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Miltelių, granulių ir pastos pavidalo medžiagos turi būti laikomos labai degiomis, jei degimo trukmė bet kuriame bandyme, atliktame pagal 1.6.2 aprašytą metodiką, yra mažesnė kaip 45 sekundės. Metalų arba metalų lydinių milteliai laikomi labai degiais, jei jie gali būti padegti ir liepsna arba reakcijos zona išplinta per visą bandinį ne ilgiau kaip per 10 min.

4. **NUORODOS**

NF T 20–042 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

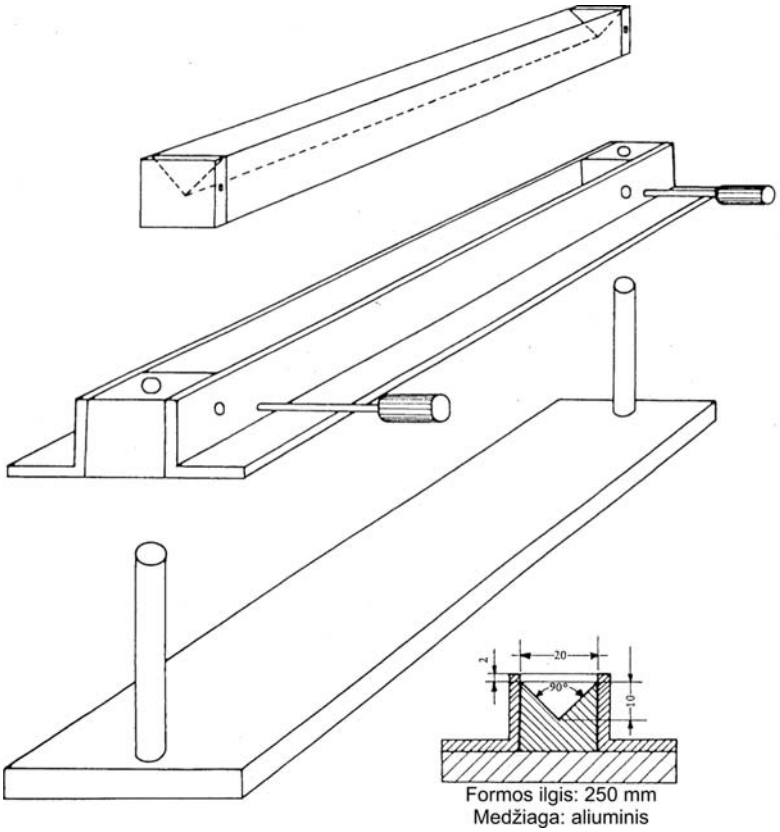
▼C1

Priedėlis

Paveikslas

Forma ir priedai bandiniui paruošti

(Visi matmenys milimetrais)



▼C1

A.10. **DEGUMAS (DUJOS)**

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Šis metodas leidžia nustatyti, ar dujos, sumaišytos su oru kambario temperatūroje (maždaug 20 °C), ir esant atmosferos slėgiui yra degios, o jei degios, tai koks yra degių dujų koncentracijos intervalas. Vis didesnės koncentracijos bandomųjų dujų mišiniai su oru veikiami elektros kibirkštimi ir stebima, ar mišinys užsidega.

1.2. APIBRĖŽTIS IR VIENETAI

Degumo intervalas yra intervalas tarp mažiausios ir didžiausios sprogumo ribinės koncentracijos. Mažiausia ir didžiausia sprogumo ribinė koncentracija yra tokia degių dujų mišinio su oru ribinė koncentracija, kuriai esant liepsnos plitimas nevyksta.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nenurodytos.

1.4. METODO PRINCIPAS

Dujų koncentracija ore didinama palaipsniui ir kiekvienu atveju dujų mišinys veikiamas elektros kibirkštimi.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Neapibrėžti.

1.6. METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Aparatūra**

Bandymo indas – vertikaliai pastatytas stiklinis cilindras, kurio mažiausias vidinis skersmuo 50 mm ir mažiausias aukštis 300 mm. Uždegimo elektrodai, tarp kurių yra 3–5 mm tarpas, įtaisomi 60 mm nuo cilindro dugno. Cilindre turi būti įtaisytas slėginis vožtuvas. Norint apriboti bet kokio sprogimo padarytą žalą, aparatas turi būti apsaugotas skydu.

Uždegimo šaltiniu naudojama pastovi indukcinė 0,5 s trukmės kibirkštis, generuojama aukštos įtampos transformatoriaus, kurio išėjimo įtampa 10–15 kV (didžiausia galia 300 W). Tinkamos aparatūros pavyzdys aprašytas (2) nuorodoje.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

Bandymas turi būti atliekamas kambario temperatūroje (maždaug 20 °C).

▼C1

1.6.3. **Bandymo eiga**

Žinomos koncentracijos dujų mišinys su oru įpučiamas į cilindrą, naudojant dozavimo siurblius. Per mišinį leidžiama kibirkštis ir stebima, ar liepsna atsiskiria nuo liepsnos šaltinio ir plinta savaime ar taip nevyksta. Dujų koncentracija keičiama 1 % tūr. pakopomis tol, kol dujos užsidega, kaip tai aprašyta anksčiau.

Jei cheminė dujų sandara rodo, kad jos neturėtų būti degios, ir gali būti apskaičiuota jų stechiometrinio mišinio su oru sudėtis, tai 1 % pakopomis reikia tikrinti pradedant mišiniu, kuriame dujų yra 10 % mažiau nei stechiometrinės sudėties mišinyje, ir baigiant mišiniu, kuriame dujų yra 10 % daugiau nei stechiometrinės sudėties mišinyje.

2. **DUOMENYS**

Šiai savybei nustatyti reikalingi tik duomenys apie liepsnos plitimą.

3. **ATASKAITA**

Jei įmanoma, bandymo ataskaitoje turi būti tokia informacija:

— tiksli medžiagos specifikacija (tapatumas ir priemaišos),

— naudotos aparatūros aprašymas, nurodant matmenis,

— temperatūra, kurioje bandymas buvo atliekamas,

— tirtos koncentracijos ir gauti rezultatai,

— bandymo rezultatas: nedegios dujos ar labai degios dujos,

— jei padaryta išvada, kad dujos nedegios, tai turi būti nurodytas koncentracijos intervalas, kuriame tai buvo daroma 1 % pakopomis,

— turi būti pateikta visa rezultatams aiškinti reikalinga informacija ir pastabos.

4. **NUORODOS**

1) NF T 20–041 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.

2) W. Berthold, D. Conrad, T. Grewer, H. Grosse- einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen'. Chem.-Ing.-Tech. 1984, vol. 56, 2, p. 126–127.Wortmann, T. Redeker und H. Schacke. 'Entwicklung

▼C1

A.11. **DEGUMAS (SĄLYTIS SU VANDENIU)**

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Šis bandymo metodas gali būti taikomas norint nustatyti, ar dėl medžiagos reakcijos su vandeniu arba drėgme nesusidaro pavojingas kiekis vienos arba keleto rūšių dujų, kurios galėtų būti labai degios.

Bandymo metodas gali būti taikomas kietosioms ir skystosioms medžiagoms. Šis metodas netaikytinas medžiagoms, kurios užsidega nuo sąlyčio su oru.

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Labai degios: medžiagos, kurios sąlytyje su vandeniu arba drėgnu oru pavojingais kiekiais ne mažesne kaip 1 litras/kg per valandą sparta išskiria labai degias dujas.

1.3. METODO PRINCIPAS

Medžiaga bandoma laikantis toliau aprašytos pakopų sekos; jei dujos kurioje nors pakopoje užsiliepsnoja, toliau bandyti nebūtina. Jei žinoma, kad medžiaga su vandeniu intensyviai nereaguoja, pradėkite nuo 4 pakopos (1.3.4).

1.3.1. **1 pakopa**

Bandomoji medžiaga dedama į lovelį su distiliuotu vandeniu 20 °C temperatūroje ir stebima, ar išsiskiriančios dujos užsiliepsnoja ar neužsiliepsnoja.

1.3.2. **2 pakopa**

Bandomoji medžiaga dedama ant filtravimo popieriaus, padėto į lėkštelę su distiliuotu vandeniu 20 °C temperatūroje, ir stebima, ar išsiskiriančios dujos užsiliepsnoja ar neužsiliepsnoja. Filtravimo popierius skirtas tik tam, kad medžiaga būtų vienoje vietoje, kas padidintų užsiliepsnojimo galimybę.

1.3.3. **3 pakopa**

Iš bandomosios medžiagos suformuojama krūvelė, kurios aukštis apie 2 cm ir skersmuo 3 cm. Ant krūvelės lašinami keli lašai vandens ir stebima, ar išsiskiriančios dujos užsiliepsnoja ar neužsiliepsnoja.

1.3.4. **4 pakopa**

Bandomoji medžiaga maišoma su distiliuotu vandeniu 20 °C temperatūroje ir kas valandą septynių valandų laikotarpiu matuojama dujų išsiskyrimo sparta. Jei dujų skyrimosi sparta svyruoja arba septynias valandas didėja, matavimo trukmė turi būti padidinta ne daugiau kaip iki penkių parų. Bandymas gali būti sustabdytas, jei išsiskyrimo sparta kuriuo nors momentu yra didesnė kaip 1 litras/kg per valandą.

▼C1

1.4. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nenurodytos.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

1.6. METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **1 pakopa**

1.6.1.1. *Bandymo sąlygos*

Bandymas atliekamas kambario temperatūroje (maždaug 20 °C).

1.6.1.2. *Bandymo eiga*

Nedidelis kiekis (skersmuo maždaug 2 mm) bandomosios medžiagos turi būti įdėtas į lovelį su distiliuotu vandeniu. Reikia stebėti, ar i) skiriasi kokios nors dujos ir ii) ar jos užsiliepsnoja. Jei dujos užsiliepsnoja, medžiagos toliau bandyti nereikia, nes medžiaga laikoma pavojinga.

1.6.2. **2 pakopa**

1.6.2.1. *Aparatūra*

Filtravimo popierius padedamas distiliuoto vandens, įpilto į bet kokį tinkamą indą, pvz., 100 mm skersmens garinimo lėkštelę, paviršiuje.

1.6.2.2. *Bandymo sąlygos*

Bandymas atliekamas kambario temperatūroje (maždaug 20 °C).

1.6.2.3. *Bandymo eiga*

Nedidelis kiekis (skersmuo maždaug 2 mm) bandomosios medžiagos dedamas filtravimo popieriaus centre. Reikia stebėti, ar i) skiriasi kokios nors dujos ir ii) ar jos užsiliepsnoja. Jei dujos užsiliepsnoja, medžiagos toliau bandyti nereikia, nes medžiaga laikoma pavojinga.

1.6.3. **3 pakopa**

1.6.3.1. *Bandymo sąlygos*

Bandymas atliekamas kambario temperatūroje (maždaug 20 °C).

1.6.3.2. *Bandymo eiga*

Iš bandomosios medžiagos suformuojama krūvelė, kurios aukštis apie 2 cm ir skersmuo 3 cm ir kurios viršuje yra padarytas įdubimas. Į įdubimą lašinami keli lašai vandens ir stebima, ar i) skiriasi kokios nors dujos ir ii) ar jos užsiliepsnoja. Jei dujos užsiliepsnoja, medžiagos toliau bandyti nereikia, nes medžiaga laikoma pavojinga.

▼C1

1.6.4. **4 pakopa**

1.6.4.1. *Aparatūra*

Surenkamas paveiksle parodytas aparatas.

1.6.4.2. *Bandymo sąlygos*

Patikrinkite, ar tiriamosios medžiagos pakuotėje yra miltelių, kurių dalelių skersmuo mažesnis kaip 500 μm. Jei milteliai sudaro daugiau kaip 1 % visos medžiagos masės arba jei medžiaga yra trapi, tai norint atsižvelgti į dalelių dydžio mažėjimą laikymo ir krovimo metu, prieš bandymus visa medžiaga turi būti sumalta į miltelius; kitais atvejais medžiaga turi būti bandoma tokia, kokia gauta. Bandymas turi būti atliekamas kambario temperatūroje (maždaug 20 °C) ir atmosferiniame slėgyje.

1.6.4.3. *Bandymo eiga*

Į aparato lašinamąjį piltuvą įpilama 10–20 ml vandens, o į kūginę kolbą įdedama 10 g bandomosios medžiagos. Išsiskyrusių dujų tūris gali būti išmatuotas bet kuriuo tinkamu būdu. Atidaromas lašinamojo piltuvo čiaupas, kad vanduo galėtų tekėti į kūginę kolbą, ir paleidžiamas sekundmatis. Išsiskyrusių dujų kiekis septynias valandas matuojamas kas valandą. Jei per šį laiką išsiskyrusių dujų kiekis svyruoja arba jei šio laikotarpio pabaigoje išsiskyrusių dujų kiekis didėja, matavimai turi būti tęsiami ne ilgiau kaip penkias paras. Jei kuriuo nors matavimo momentu dujų išsiskyrimo sparta yra didesnė kaip 1 litras/kg per valandą, bandymą galima nutraukti. Šis bandymas turi būti pakartotas tris kartus.

Jei cheminė dujų sudėtis nežinoma, dujos turi būti analizuojamos. Jei dujose yra labai degių komponentų ir nėra žinoma, ar visas mišinys yra labai degus, turi būti paruoštas ir pagal A. 11 metodą išbandytas tokios pačios sudėties mišinys.

2. **DUOMENYS**

Medžiaga laikoma pavojinga, jei:

— bet kurioje bandymo pakopoje įvyksta užsidegimas,

arba

— degios dujos skiriasi didesne kaip 1 litras/kg bandomosios medžiagos per valandą sparta.

3. **ATASKAITA**

Bandymų ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti tokia informacija:

— tiksli medžiagos specifikacija (tapatumas ir priemaišos),

— bet kokio bandomosios medžiagos pradinio ruošimo detalės,

▼C1

— bandymų rezultatai (1, 2, 3 ir 4 pakopos),

— išsiskyrusių dujų cheminė sudėtis,

— dujų išsiskyrimo sparta, jei vykdoma 4 pakopa (1.6.4),

— visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus.

4. **NUORODOS**

1) Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

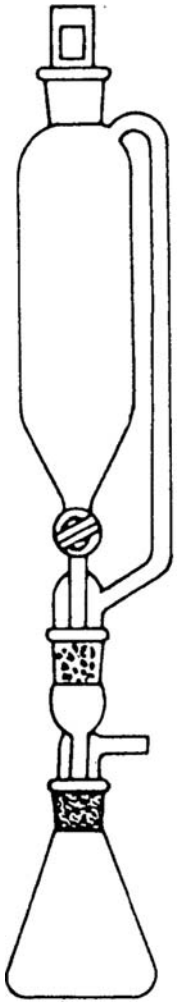
2) NF T 20–040 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼C1

Priedėlis

Paveikslas

Aparatas



▼C1

A.12. **PIROFORINĖS KIETŲJŲ MEDŽIAGŲ IR SKYSČIŲ SAVYBĖS**

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Bandymo metodikos taikytinos kietosioms ir skystosioms medžiagoms, kurių maži kiekiai savaime užsidega po trumpalaikio sąlyčio su oru kambario temperatūroje (maždaug 20 °C).

Šis bandymo metodas netaikomas medžiagoms, kurios kambario temperatūros ore savaime užsidega tik po kelių valandų arba dienų arba kurioms reikia aukštesnės temperatūros.

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Laikoma, kad medžiagos turi piroforinių savybių, jei 1.6 apibrėžtomis sąlygomis jos užsidega arba apanglėja.

Savaiminį skysčių užsiliepsnojimą gali tekti tirti taikant A.15 metodą „Skysčių ir dujų savaiminio užsiliepsnojimo temperatūra“.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nenurodytos.

1.4. METODO PRINCIPAS

Kieta arba skysta medžiaga maišoma su inertišku nešikliu ir kambario temperatūroje penkias minutes laikoma ore. Jei skystos medžiagos neužsidega, jos sugeriamos filtravimo popieriumi ir kambario temperatūroje (maždaug 20 °C) penkias minutes laikomos ore. Kieta arba skysta medžiaga laikoma piroforine, jei ji užsidega, arba skystis uždega ar apanglėja filtravimo popierius.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Pakartojamumas: kadangi tai labai svarbu saugos požiūriu, vienintelio teigiamo rezultato pakanka, kad medžiaga būtų laikoma piroforine.

1.6. BANDYMŲ METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Aparatūra**

Maždaug 10 cm skersmens porcelianinė lėkštutė kambario temperatūroje (maždaug 20 °C) apytikriai iki 5 mm aukščio pripildoma diatominio molio.

Pastaba

Diatominis molis arba kuri nors kita panaši inertiška medžiaga, kurią būtų galima visur gauti, turi būti imama vietoje grunto, ant kurio bandomoji medžiaga galėtų būti išpilta avarijos atveju.

Bandyti skysčiams, kurie neužsidega ore sumaišyti su inertiniu nešikliu, reikia turėti sausą filtravimo popierių.

▼C1

1.6.2. **Bandymo eiga**

a) *Kietųjų medžiagų milteliai*

1–2 cm^3 bandomosios kietos medžiagos miltelių iš maždaug 1 m aukščio beriama ant nedegaus paviršiaus ir žiūrima, ar medžiaga užsidega krisdama arba per penkias minutes po nusėdimo.

Bandymas kartojamas šešis kartus, jei medžiaga neužsidega anksčiau.

b) *Skysčiai*

Maždaug 5 cm^3 bandomojo skysčio supilama į paruoštą porcelianinę lėkštutę ir stebima, ar medžiaga užsidega per penkias minutes.

Jei per šešis bandymus medžiaga neužsidega, daromi tokie bandymai:

0,5 ml mėginys švirkštu užpilamas ant akyto filtravimo popieriaus ir stebima, ar per penkias minutes po suvilgymo filtravimo popierius užsidega ar apanglėja. Bandymas atliekamas tris kartus, jei popierius neužsidega arba neapanglėja anksčiau.

2. **DUOMENYS**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Bandymas gali būti nutrauktas, gavus pirmą teigiamą rezultatą.

2.2. VERTINIMAS

Jei su inertišku nešikliu sumaišyta ir ore padėta medžiaga užsidega per penkias minutes arba jei skystoji medžiaga per penkias minutes apdegina arba uždega joje suvilgytą ir ore padėtą filtravimo popierių, ji laikoma piroforine medžiaga.

3. **ATASKAITA**

Bandymų ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti tokia informacija:

— tiksli medžiagos specifikacija (tapatumas ir priemaišos),

— bandymų rezultatai,

— visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus.

4. **NUORODOS**

1) NF T 20–039 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.

2) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, United Nations, New York.

▼C1

A.13. **SPROGUMAS**

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Šis metodas pateikia bandymo schemą norint nustatyti, ar kelia sprogimo pavojų kieta arba pastos pavidalo medžiaga, veikiant liepsnai (terminis jautrumas) arba smūgiui ar trinčiai (jautrumas mechaniniams veiksniams), ir ar kelia sprogimo pavojų skysta medžiaga, veikiant liepsnai arba smūgiui.

Metodas susideda iš trijų dalių:

a) terminio jautrumo bandymas (1);

b) mechaninio jautrumo smūgiui bandymas (1);

c) mechaninio jautrumo trinčiai bandymas (1).

Šiuo metodu gauti duomenys leidžia įvertinti tikimybę įvykti sprogimui, jei veikia kai kurie įprasti veiksniai. Metodas neskirtas nustatyti, ar medžiaga gali sprogti bet kokiomis sąlygomis.

Metodas tinka nustatyti, ar tam tikromis direktyvoje apibrėžtomis sąlygomis, medžiaga kelia sprogimo pavojų (terminis ir mechaninis jautrumas). Jame naudojama kelių tipų aparatūra, kuri turi platų pritaikymą tarptautiniu mastu (1) ir kurią naudojant paprastai gaunami reikšmingi duomenys. Reikia pripažinti, kad metodas nėra tikslus. Be nurodytos aparatūros gali būti naudojami alternatyvūs aparatai, jei jie turi tarptautinį pripažinimą o rezultatai gali būti atitinkamai susieti su rezultatais, gautais naudojant nurodytą aparatūrą.

Bandymų atlikti nereikia, kai turima informacija apie medžiagos termodinamines savybes (pvz., susidarymo šilumą skilimo šilumą) ir (arba) kai kurių chemiškai aktyvių grupių (2) nebuvimas struktūrinėje formulėje leidžia pagrįstai neabejoti, kad medžiaga negali greitai suirti skiriantis dujoms arba šilumai (t. y. medžiaga nekelia jokio sprogimo pavojaus). Su skysčiais nereikia atlikti mechaninio jautrumo trinčiai bandymo.

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Sprogstamosios medžiagos:

medžiagos, kurios gali sprogti veikiant liepsnai arba kurios yra jautrios smūgiui ar trinčiai nurodytame aparate (arba yra jautresnės mechaniniam poveikiui nei 1,3-dinitrobenzenas alternatyviame aparate).

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

1,3-dinitrobenzenas, techniškai gryna kristalinė medžiaga, išsijota per 0,5 mm akučių sietą skirta trinties ir smūgio metodams.

Perhidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazinas (RDX, heksogenas, ciklonitas – CAS 121–82–4), perkristalintas iš vandeninio cikloheksanono tirpalo, drėgnas išsijotas per 250 μm akučių sietą ir išlikęs ant 150 μm akučių sieto bei išdžiovintas 103 ± 2 °C temperatūroje (4 valandas), skirtas antros eilės trinties ir smūgio bandymams.

▼C1

1.4. METODO PRINCIPAS

Norint nustatyti trijų jautrumo bandymų saugos sąlygas, būtina atlikti išankstinius bandymus.

1.4.1. **Saugaus naudojimo bandymai (3)**

Saugumo sumetimais, prieš atliekant pagrindinius bandymus labai maži medžiagos mėginiai (maždaug 10 mg) atviroje vietoje kaitinami dujų liepsnoje, veikiami smūgio bet kokiame patogios formos aparate ir veikiami trinties, naudojant medinį plaktuką ir priekalą arba bet kokios rūšies trinties aparatą. Tikslas – nustatyti, ar medžiaga yra tiek jautri ir sprogi, kad nurodytieji jautrumo bandymai, ypač terminio jautrumo bandymas, turi būti atliekami laikantis specialių saugos priemonių, kad būtų išvengta pavojaus sužeisti operatorių.

1.4.2. **Terminis jautrumas**

Norint nustatyti, ar medžiaga gali sprogti intensyvaus kaitinimo ir apibrėžto uždaro tūrio sąlygomis, ji pagal šį metodą kaitinama plieniniame vamzdyje, užkimštame skirtingų angos skersmenų diafragmomis.

1.4.3. **Mechaninis jautrumas (smūgis)**

Taikant šį metodą medžiaga veikiama smūgio, kai nustatyto dydžio masė metama iš nustatyto aukščio.

1.4.4. **Mechaninis jautrumas (trintis)**

Taikant šį metodą kietos arba pastos pavidalo medžiagos veikiamos trinties tarp standartinių paviršių nustatytomis apkrovos ir santykinio judėjimo sąlygomis.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nenurodyti.

1.6. METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Terminis jautrumas (liepsnos poveikis)**

1.6.1.1. *Aparatūra*

Aparatą sudaro vienkartinio naudojimo plieninis vamzdis su jam skirtu daugkartinio naudojimo uždarymo įtaisu (1 paveikslas), įstatytas į kaitinimo ir apsauginį įtaisą. Kiekvienas vamzdis yra giliojo tempimo plonalakščio plieno vamzdis (žr. priedėlį), vamzdžio vidinis skersmuo 24 mm, ilgis 75 mm, sienelių storis 0,5 mm. Atviras vamzdžio galas užriečiamas, kad jį būtų galima uždaryti diafragmos bloku. Jį sudaro slėgiui atspari diafragma, kurios centre esanti anga yra gerai pritvirtinta prie vamzdžio dviejų dalių sriegine jungtimi (veržle ir sandarikliu su sriegiu). Veržlė ir sandariklis su sriegiu pagaminti iš chromo manganinio plieno (žr. priedėlį), kuris nekibirkščiuoja iki 800 °C. Diafragmos yra 6 mm storio, pagamintos iš kaitrai atsparaus plieno (žr. priedėlį), ir turi įvairaus skersmens angas.

▼C1

1.6.1.2. *Bandymų sąlygos*

Paprastai medžiaga yra bandoma tokia, kokia yra gauta, nors kai kuriais atvejais, pvz. jei ji yra presuota, lieta arba kitokiu būdu tankinta, prieš bandant ją gali tekti smulkinti.

Jei bandomos kietosios medžiagos, kiekvienam bandymui reikalingos medžiagos masė nustatoma atliekant dviejų pakopų tuščiąjį bandymą. Pasvertas vamzdis pripildomas 9 cm^3 medžiagos, toliau medžiaga plūkiama 80 N jėga, tenkančia visam vamzdžio skerspjūviui. Kad būtų saugu arba tais atvejais, kai bandinio fizinė forma dėl spaudimo gali pasikeisti, gali būti taikomos kitos pripildymo metodikos; pvz., jei medžiaga yra labai jautri trinčiai, plūkimas netinka. Jei medžiaga yra spūdi, jos dedama daugiau ir ji plūkiama, kol vamzdis pripildomas tiek, kad iki viršaus lieka 55 mm. Nustatoma bendra masė, kurios reikia pripildyti iki 55 mm lygio, ir dedamos dar dvi tokios dalys, kiekvieną kartą plūkiant 80 N jėga. Po to plūkiant arba išimant medžiagos dedama tiek, kad iki vamzdžio viršaus liktų 15 mm. Atliekamas antras tuščiasis bandymas, iš pradžių su suplūktu kiekiu, kuris sudarytų vieną trečdalį pirmame tuščiajame bandyme nustatytos masės. Įdedamos dar dvi tokios dalys plūkiant 80 N jėga, po to, prireikus, įdedant arba išimant dalį medžiagos nustatomas jos 15 mm lygis iki viršaus. Kietosios medžiagos kiekis, nustatytas antrame tuščiajame bandyme, naudojamas kiekvienam bandymui, pripildant tris kartus vienodais kiekiais, kiekvieną suspaudžiant iki 9 cm^3 reikalinga tam jėga. (Tai galima palengvinti naudojant tarpinius žiedus).

Skysčių ir gelių dedama į vamzdį iki 60 mm aukščio, ypatingą dėmesį kreipiant į gelių įkrovimą, kad būtų išvengta tuštumų susidarymo. Ant vamzdžio iš apačios užstumiamas sandariklis su sriegiu, įstatoma diafragma su reikiamo skersmens anga ir, šiek tiek sutepus molibdeno disulfido pagrindu pagamintu tepalu, užsukama veržlė. Labai svarbu kontroliuoti, kad medžiagos nepatektų tarp jungės ir diafragmos arba tarp sriegių.

Kaitinama propano dujomis iš pramoninio baliono, turinčio reduktorių (60–70 mbar), leidžiamomis per debitmatį ir tolygiai vamzdynu paskirstomomis (kaip rodo degiklių liepsnos stebėjimas) keturiems degikliams. Degikliai išdėstyti apie bandymo kamerą, kaip parodyta 1 paveiksle. Keturi degikliai bendrai suvartoja 3,2 litro propano per minutę. Galima deginti kitokias dujas ir naudoti kitokius degiklius, tačiau kaitinimo sparta turi būti tokia, kokia nurodyta 3 paveiksle. Visuose aparatuose kaitinimo sparta turi būti periodiškai tikrinama, naudojant dietilftalatu pripildytus vamzdžius, kaip parodyta 3 paveiksle.

1.6.1.3. *Bandymų eiga*

Kiekvienas bandymas atliekamas tol, kol vamzdis sutrūkinėja į dalis, arba jis kaitinamas penkias minutes. Vertinama, kad bandymo metu įvyko sprogimas, jei jis baigiasi vamzdžio sutrūkimu į tris arba daugiau skeveldrų, kurios kai kuriais atvejais gali jungtis siauromis metalo juostomis, kaip parodyta 2 paveiksle. Jei bandymo metu susidaro mažiau skeveldrų arba jų visai nesusidaro, tuomet nelaikoma, kad įvyko sprogimas.

▼C1

Iš pradžių atliekama trijų bandymų serija su 6,0 mm skersmens diafragma, ir jei sprogimų neįvyksta, atliekama antroji trijų bandymų serija su 2 mm skersmens diafragma. Jei sprogimas įvyksta bet kurioje bandymų serijoje, tolesni bandymai nereikalingi.

1.6.1.4. *Vertinimas*

Bandymų rezultatas laikomas teigiamu, jei sprogimas įvyksta bet kurioje anksčiau nurodytų bandymų serijoje.

1.6.2. **Mechaninis jautrumas (smūgis)**

1.6.2.1. *Aparatūra (4 paveikslas)*

Pagrindinės tipiško aparato su krintančiu kūju dalys yra lietas plieninis blokas su pagrindu, priekalas, kolona, kreipikliai, krintantys svarsčiai, paleidžiantysis įtaisas ir mėginio laikiklis. Plieninis priekalas, 100 mm (skersmuo) × 70 mm (aukštis), varžtais tvirtinamas ant plieninio bloko, 230 mm (aukštis) × 250 mm (plotis) × 200 mm (aukštis), esančio ant lieto pagrindo 450 mm (ilgis) × 450 mm (plotis) × 60 mm (aukštis). Kolona, pagaminta iš besiūlio trauktinio plieninio vamzdžio, tvirtinama laikiklyje, priveržtame užpakalinėje plieninio bloko sienoje. Keturiais varžtais aparatas tvirtinamas prie vientiso betoninio bloko, 60 × 60 × 60 cm, tokiu būdu, kad kreipiklių strypai būtų vertikalūs ir krintantis svarstis kristų laisvai. Naudojami 5 ir 10 kg svarsčiai, pagaminti iš vientiso plieno. Visų svarsčių smogiamoji galvutė pagaminta iš grūdinto plieno, HRC 60–63, ir jos mažiausias skersmuo lygus 25 mm.

Bandinys dedamas į smūgiavimo įtaisą, kurį sudaro du vienas ant kito uždėti koaksialūs plieniniai cilindrai, esantys tuščiaviduriame cilindro formos plieniniame kreipiamajame žiede. Vientiso plieno cilindrai turi būti 10 (– 0,003, – 0,005) mm skersmens ir 10 mm aukščio, jų paviršius turi būti poliruotas, kraštai apvalinti (kreivės spindulys 0,5 mm) ir HRC 58–65 kietumo. Tuščiavidurio cilindro išorinis skersmuo turi būti lygus 16 mm, poliruotos ištekintos angos skersmuo 10 (+ 0,005, + 0,010) mm ir aukštis 13 mm. Smogiamasis įtaisas surinktas ant tarpinio priekalo (26 mm skersmuo ir 26 mm aukštis), pagaminto iš plieno, ir centruotas žiedu su angomis dujoms išleisti.

1.6.2.2. *Bandymų sąlygos*

Bandinio tūris turi būti lygus 40 mm^3, arba tūris turi atitikti bet kokį alternatyvųjį aparatą. Kietos medžiagos turi būti išbandytos sausos ir ruošiamos taip:

a) milteliai sijojami (sieto akučių dydis 0,5 mm); bandymui naudojama visa tai, kas išbyra per sietą;

b) presuotos, lietos ar kitu būdu tankintos medžiagos smulkinamos į mažus gabaliukus ir sijojamos; bandymui naudojamos sijotos 0,5–1 mm skersmens frakcijos, kurios turi sudaryti reprezentatyvią pradinės medžiagos dalį.

Medžiagos, kurios paprastai tiekiamos pastos pavidalo, turi būti, jei tai įmanoma, bandomos išdžiovintos arba, bet kuriuo atveju, pašalinus kuo didesnę dalį skiediklio. Skysčiai bandomi tarp viršutinio ir apatinio plieninio cilindro esant 1 mm tarpui.

▼C1

1.6.2.3. *Bandymų eiga*

Atliekama šešių bandymų serija, metant 10 kg masės svarstį iš 0,40 m aukščio (40 J). Jei 40 J atveju šešių bandymų metu sprogimas įvyksta, turi būti atliekama kita 6 bandymų serija, metant 5 kg masės svarstį iš 0,15 m aukščio (7,5 J). Kituose aparatuose bandinys lyginamas su pasirinktąja etalonine medžiaga, naudojant nustatytą metodiką (pvz., kėlimo-metimo metodiką ir t. t.).

1.6.2.4. *Vertinimas*

Bandymų rezultatas laikomas teigiamu, jei bent vieno bandymo metu, naudojant nurodytą smūgiavimo įtaisą, įvyksta sprogimas (liepsnos blyksniai ir (arba) garsas, prilygstantis sprogimo garsui) arba bandinys yra jautresnis nei 1,3-dinitrobenzenas ar heksogenas atliekant alternatyvų smūgio bandymą.

1.6.3. **Mechaninis jautrumas (trintis)**

1.6.3.1. *Aparatūra (5 paveikslas)*

Trinties aparatą sudaro lieto plieno pagrindo plokštė, ant kurios montuojamas trinties įtaisas. Jį sudaro nejudantis porcelianinis kaištis ir judanti porcelianinė plokštė. Porcelianinė plokštė privirtinta prie vežimėlio, kuris juda dviem kreipikliais. Vežimėlis prijungtas prie elektros variklio jungiamuoju strypu, ekscentriniu krumpliaračiu ir atitinkama pavara tokiu būdu, kad porcelianinė plokštė po porcelianiniu kaiščiu pajudinama tik kartą 10 mm į priekį ir atgal. Porcelianinį kaištį galima apkrauti, pvz., 120 arba 360 N apkrova.

Plokščios porcelianinės plokštės pagamintos iš balto techninio porceliano (šiurkštumas nuo 9 iki 32 μm), jų matmenys: 25 mm (ilgis) × 25 mm (plotis) × 5 mm (storis). Cilindrinis 15 mm ilgio porcelianinis kaištis taip pat pagamintas iš balto techninio porceliano, jo skersmuo lygus 10 mm, ir galai turi šiurkštintą sferinį paviršių, kurio kreivės spindulys lygus 10 mm.

1.6.3.2. *Bandymo sąlygos*

Bandinio tūris turi būti lygus 10 mm^3 arba toks, kad tiktų bet kuriam alternatyviam aparatui.

Kietos medžiagos išbandomos sausos ir ruošiamos taip:

a) milteliai sijojami (sieto akučių dydis 0,5 mm); bandymui naudojama visa tai, kas iškrenta per sietą;

b) presuotos, lietos ar kitu būdu sutankintos medžiagos smulkinamos į mažus gabalus ir sijojamos; bandymuose naudojama sijota frakcija, kurios dalelių skersmuo < 0,5 mm.

Medžiagos, kurios paprastai tiekiamos pastos pavidalu, turi būti bandomos sausos, kur įmanoma. Jei sauso medžiagos pavidalo paruošti neįmanoma, pasta (pašalinus kiek įmanoma didesnį kiekį skiediklio) bandoma šablonu pagamintą 0,5 mm storio, 2 mm pločio ir 10 mm ilgio plėvelę.

▼C1

1.6.3.3. *Bandymų eiga*

Porcelianinis kaištis uždedamas ant bandomosios medžiagos ir veikiamas apkrova. Atliekant bandymą porceliano plokštės akytumo žymės turi būti skersai judėjimo krypties. Kaištis turi būti ant bandinio, po kaiščiu turi būti pakankamas kiekis bandinio medžiagos ir plokštė po kaiščiu turi judėti teisingai. Plokštelę padengti pastos pavidalo medžiaga naudojamas 0,5 mm storio laikiklis, turintis 2 × 10 mm griovelį. Porcelianinė plokštelė turi judėti po porcelianiniu kaiščiu 10 mm į priekį ir atgal per 0,44 sekundės. Kiekviena plokštelės ir kaiščio paviršiaus dalis turi būti naudojama tik vieną kartą; du kiekvieno kaiščio galai naudojami dviems bandymams ir kiekvienas iš dviejų plokštelės paviršių naudojamas trims bandymams.

Atliekama šešių bandymų serija, naudojant 360 N apkrovą. Jei šių šešių bandymų metu gaunamas teigiamas rezultatas, turi būti atlikta kita šešių bandymų serija su 120 N apkrova. Kituose aparatuose bandinys lyginamas su pasirinkta etalonine medžiaga, taikant nustatytą metodiką (pvz., kėlimo-metimo metodiką ir t. t.).

1.6.3.4. *Vertinimas*

Bandymų rezultatai laikomi teigiamais, jei kurio nors šių bandymų metu naudojant nustatytą trinties aparatą įvyksta bent vienas sprogimas (prilygstantis sprogimui traškesys ir (arba) sprogimą primenantis garsas arba liepsnos blyksnis) arba jei jie atitinka lygiaverčius kriterijus vykdant alternatyvų trinties bandymą.

2. **DUOMENYS**

Iš esmės medžiaga pagal šią direktyvą laikoma kelianti sprogimo pavojų, jei terminio jautrumo, jautrumo smūgiui arba trinčiai bandymo rezultatas yra teigiamas.

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMŲ ATASKAITA

Bandymų ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti tokia informacija:

— bandomosios medžiagos tapatumas, sudėtis, grynumas, drėgmės kiekis ir t. t.,

— bandinio fizinė forma ir ar jis buvo smulkinamas, trupinamas ir (arba) sijojamas,

— stebėjimai vykdant terminio jautrumo bandymus (pvz., bandinio masė, skeveldrų skaičius ir t. t.),

— stebėjimai vykdant mechaninio jautrumo bandymus (pvz., didelio dūmų kiekio susidarymas arba visiškas medžiagos irimas be garso, liepsnos, kibirkščių, traškesio ir t. t.),

— kiekvieno tipo bandymų rezultatai,

— jei buvo naudojamas alternatyvus aparatas, turi būti pateiktas mokslinis pagrindimas, taip pat duomenys apie koreliaciją tarp rezultatų, gautų nustatytu aparatu, ir rezultatų, gautų lygiaverčiu aparatu,

▼C1

— visi naudingi komentarai, pvz., nuoroda į panašių medžiagų bandymus, kurie galbūt tiktų tinkamai paaiškinti rezultatus,

— visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus.

3.2. REZULTATŲ AIŠKINIMAS IR VERTINIMAS

Bandymų ataskaitoje turi būti paminėti visi rezultatai, kurie laikomi klaidingais, anomaliais arba nereprezentatyviais. Jei kokius nors rezultatus reikia atmesti, turi būti pateiktas paaiškinimas ir visų alternatyvių arba papildomų bandymų rezultatai. Jei anomalus rezultatas negali būti paaiškintas, jis turi būti priimtas toks, koks yra, ir turi būti naudojamas medžiagai atitinkamai klasifikuoti.

4. **NUORODOS**

1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.

2) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0–750–60103–5, 1990.

3) Koenen, H., Ide, K.H. and Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol.3, p. 6–13 ir 30–42.

4) NF T 20–038 (September 85). Chemical products for industrial use – Determination of explosion risk.

▼C1

Priedėlis

Terminio jautrumo bandyme naudojamų medžiagų specifikacijos pavyzdys (žr. DIN 1623)

1) Vamzdis: medžiagos specifikacija Nr. 1.0336.505g

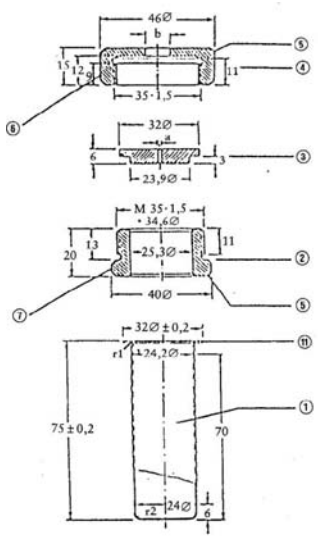
2) Diafragma: medžiagos specifikacija Nr. 1.4873

3) Sandariklis su sriegiu ir veržlė: medžiagos specifikacija Nr. 1.3817

1 paveikslas

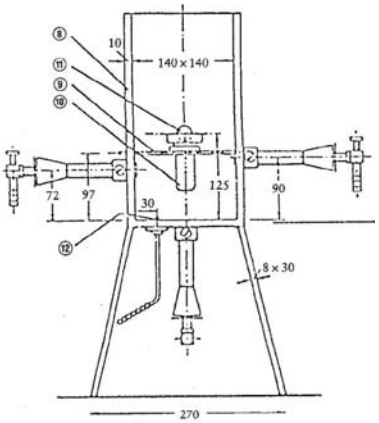
Terminio jautrumo bandymo aparatas

(visi matmenys milimetrais)



1a pav. Plieninis vamzdi s ir priedai

(1) vamzdis
(1a) išorinė jungė
(2) sandariklis su sriegiu; mažo trinties koeficiento sriegis
(3) diafragma: skersmuo a = 2,0 arba 6,0 mm
(4) veržlė b = 10 mm skersmuo
(5) nuožulnus paviršius
(6) 2 briaunos 41 dydžio raktui



1b pav. Kaitinimo ir apsauginis įtaisas

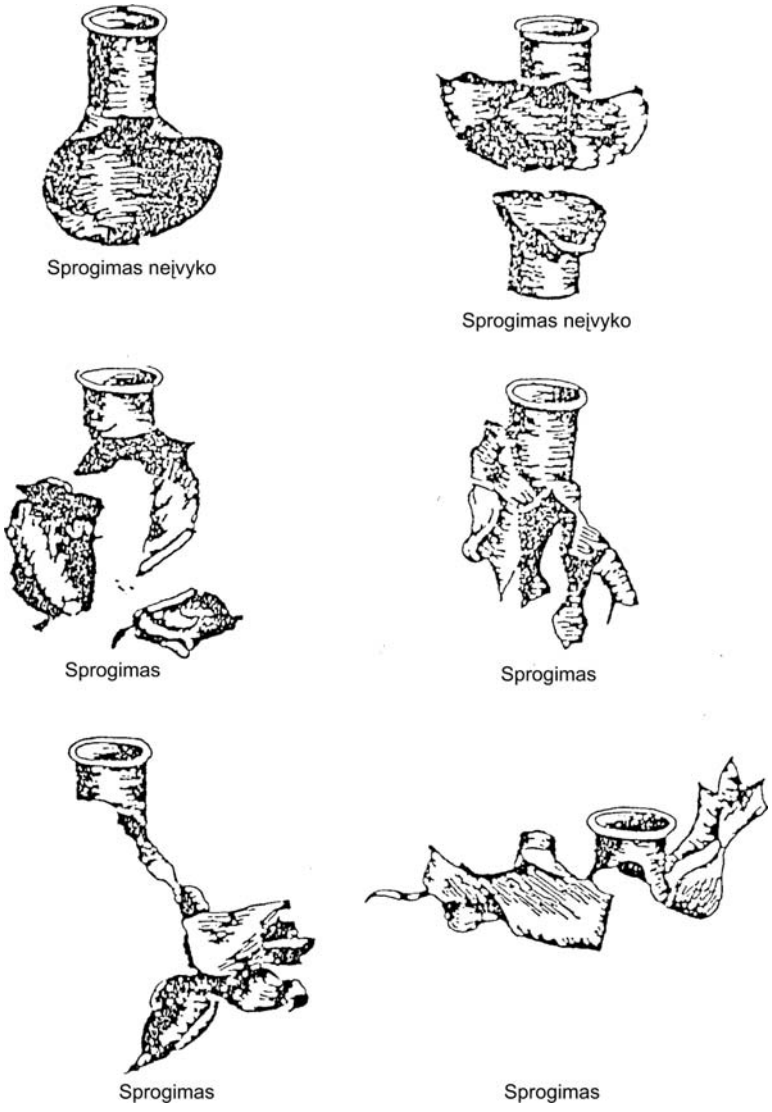
(7) 2 briaunos 36 dydžio raktui
(8) skeveldroms atspari dėžė
(9) 2 strypai vamzdžiui laikyti
(10) surinktas vamzdis
(11) užpakalinio degiklio padėtis, kiti degikliai matomi
(12) tuščiosios eigos purkštukas

▼C1

2 paveikslas

Terminio jautrumo bandymas

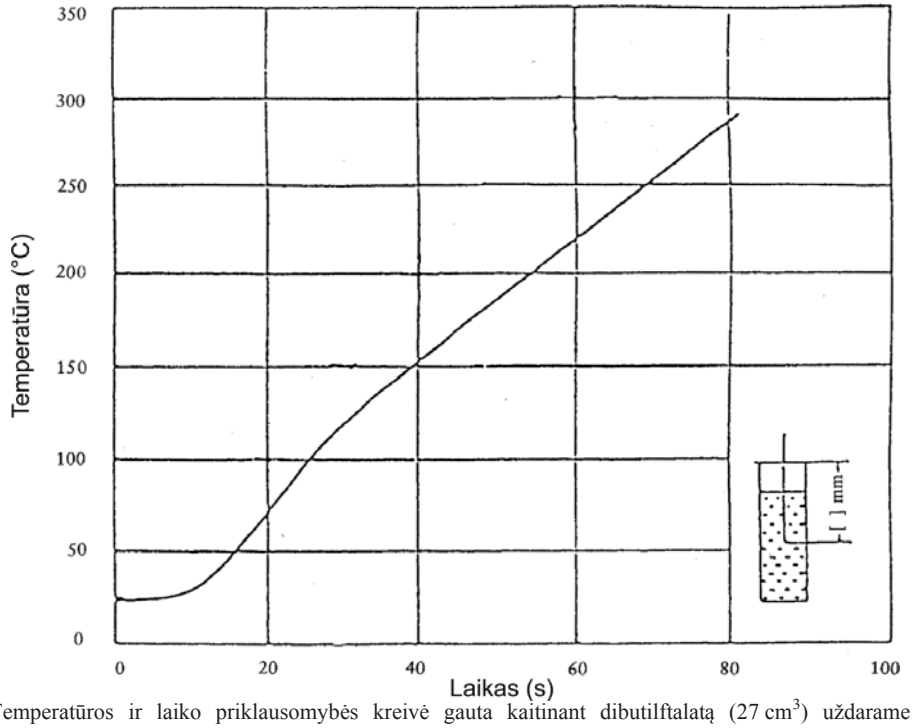
(skeveldrų susidarymo pavyzdžiai)



▼C1

3 paveikslas

Kaitinimo spartos kalibravimas terminio jautrumo bandymui



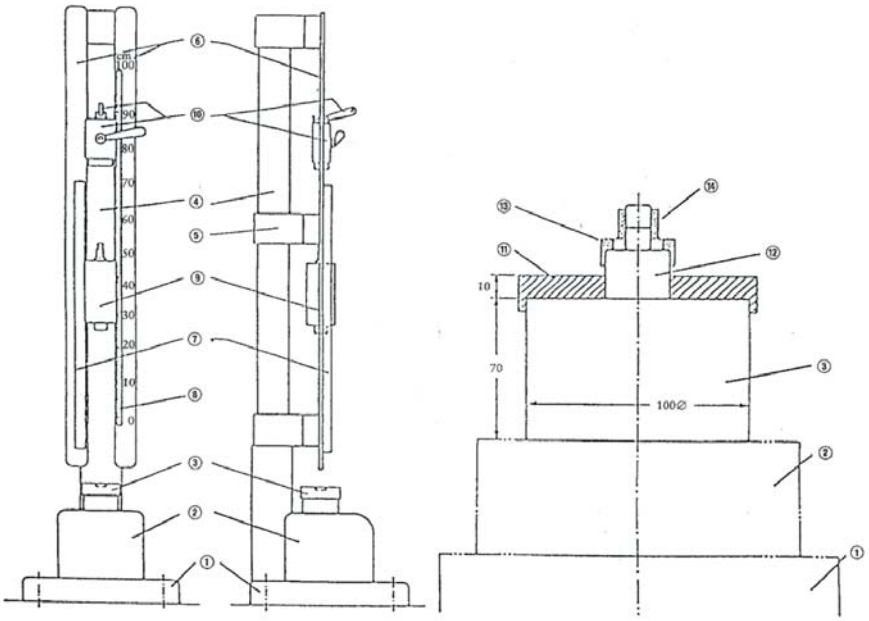
Temperatūros ir laiko priklausomybės kreivė gauta kaitinant dibutilftalatą (27 cm^3) uždarame (1,5 mm diafragma) vamzdyje, naudojant 3,2 litro per minutę propano srautą. Temperatūra matuota 1 mm skersmens chromelio/aliumelio termoelementu, įdėtu į apvalkalą iš nerūdijančio plieno ir įstatytu vamzdžio viduryje 43 mm žemiau jo briaunos. Kaitinimo sparta 135 °C–285 °C temperatūroje turi būti nuo 185 iki 215 K/minutę.

▼C1

4 paveikslas

Jautrumo smūgiui bandymo aparatas

(visi matmenys milimetrais)



4a pav. Krintantis kūjis, priekis ir šonas, bendras vaizdas

(1) pagrindas, 450 × 450 × 60
(2) plieninis blokas, 230 × 250 × 200
(3) priekalas, 100 skersmuo × 70
(4) kolona
(5) vidurinioji skersė
(6) 2 kreipikliai
(7) krumplinis stovas

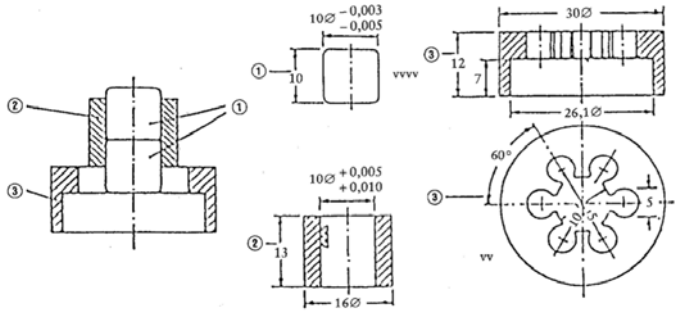
4b pav. Krintantis kūjis, apatinė dalis

(8) graduotoji skalė
(9) krintantis kūjis (tvoklė)
(10) laikantysis ir paleidžiantysis įtaisas
(11) nustatymo plokštė
(12) tarpinis priekalas (keičiamas), 26 skersmuo × 26
(13) nustatymo žiedas su angomis
(14) smūgiavimo įtaisas

▼C1

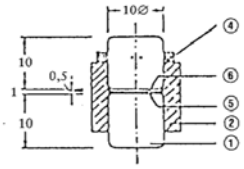
4 paveikslo

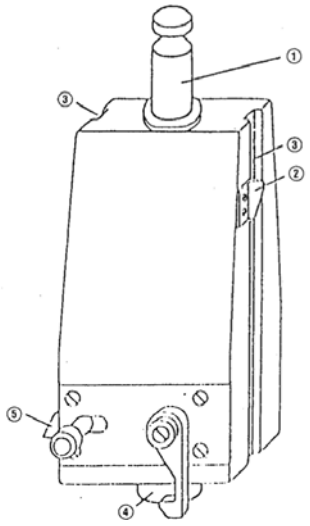
tęsinys



4c pav. Smūgiavimo įtaisas miltelių arba pastos pavidalo medžiagoms

(1) plieniniai cilindrai
(2) plieninių cilindrų kreipiamasis žiedas
(3) nustatymo žiedas su angomis
  (a) vertikalusis pjūvis
  (b) horizontalioji projekcija
(4) guminis žiedas
(5) skystoji medžiaga (40 mm³)
(6) erdvė be skysčio





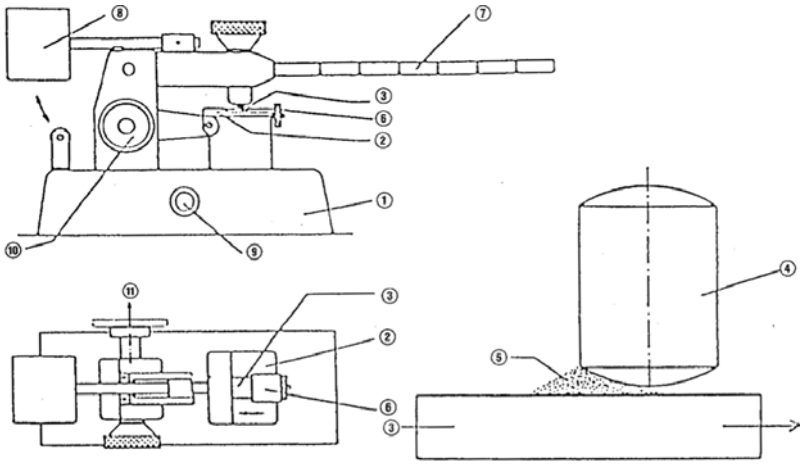
4e pav. Kūjis (kūjo masė 5 kg)

(1) pakabos mova
(2) aukščio žymeklis
(3) padėties nustatymo griovelis
(4) cilindrinė smūgiavimo galvutė
(5) gaudyklė

▼C1

5 paveikslas

Jautrumo trinčiai bandymo aparatas



5a pav. Trinties aparatas, vertikalusis ir horizontalusis vaizdas

(1) plieninis pagrindas
(2) judamasis vežimėlis
(3) porcelianinė plokštelė, 25 * 25 * 5 mm, dedama ant vežimėlio
(4) nejudantis porcelianinis kaištis 10 mm skersmuo » 15mm
(5) bandinys, apytikriai 10 mm^3

5b pav. Kaiščio ant bandinio pradinė padėtis

(6) kaiščio laikiklis
(7) apkrovos svirtis
(8) atsvaras
(9) jungiklis
(10) ratas vežimėlio pradinei padėčiai nustatyti
(11) Į elektrinės pavaros variklį

▼C1

A.14. **SKYSČIŲ IR DUJŲ SAVAIMINIO UŽSILIEPSNOJIMO TEMPERATŪRA**

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Šiuo bandymu neturi būti tiriamos sprogstamosios medžiagos ir medžiagos, kurios užsidega sąlytyje su oru esant kambario temperatūrai. Bandymo metodika taikytina dujoms, skysčiams ir garams, kurie ore gali užsidegti susilietę su karštu paviršiumi.

Savaiminio užsiliepsnojimo temperatūra gali žymiai sumažėti, jei yra katalizatoriaus savybių turinčių priemaišų, dėl paviršiaus medžiagų savybių arba dėl didesnio bandymui naudojamo indo tūrio.

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Savaiminio užsiliepsnojimo laipsnis apibūdinamas savaiminio užsiliepsnojimo temperatūra. Savaiminio užsiliepsnojimo temperatūra yra mažiausia temperatūra, kurioje bandomoji medžiaga užsiliepsnoja, sumaišyta su oru esant bandymo metode apibrėžtoms sąlygoms.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Etaloninės medžiagos nurodytos standartuose (žr. 1.6.3). Jos turi būti visų pirma naudojamos tikrinti metodo veikimą ir lyginti rezultatus, gautus taikant kitus metodus.

1.4. METODO PRINCIPAS

Taikant šį metodą nustatoma mažiausia gaubto vidinio paviršiaus temperatūra, kurioje savaime užsiliepsnoja po gaubtu įpurkštos dujos, garai arba skystis.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Pakartojamumas kinta atsižvelgiant į savaiminio užsiliepsnojimo temperatūros intervalą ir taikytą metodą.

Jautrumas ir specifiškumas priklauso nuo taikyto bandymo metodo.

1.6. METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Aparatūra**

Aparatas aprašytas 1.6.3 nurodytame metode.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

Tiriamosios medžiagos bandinys yra tiriamas pagal 1.6.3 nurodytą metodą.

1.6.3. **Bandymo eiga**

Žr. IEC 79–4, DIN 51794, ASTM-E 659–78, BS 4056, NF T 20–037.

▼C1

2. **DUOMENYS**

Užrašykite bandymų temperatūrą, atmosferos slėgį, naudotą bandinio kiekį ir bandinio savaiminio užsiliepsnojimo vėlinimosi trukmę.

3. **ATASKAITA**

Jei įmanoma, bandymų ataskaitoje turi būti tokia informacija:

— tiksli medžiagos specifikacija (tapatumas ir priemaišos),

— naudotas bandinio kiekis, atmosferos slėgis,

— naudota aparatūra,

— matavimų rezultatai (bandymų temperatūra, su savaiminiu užsiliepsnojimu susiję rezultatai, atitinkamų vėlinimųsi trukmė),

— visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus.

4. **NUORODOS**

Nėra.

▼C1

A.15. **KIETŲJŲ MEDŽIAGŲ SANTYKINĖ SAVAIMINIO UŽSILIEPSNOJIMO TEMPERATŪRA**

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Šiuo bandymu neturi būti tiriamos sprogiosios medžiagos ir medžiagos, kurios sąlytyje su oru savaime užsiliepsnoja kambario temperatūroje.

Šio bandymo tikslas – gauti išankstinę informaciją apie kietųjų medžiagų savaiminį užsiliepsnojimą aukštesnėje temperatūroje.

Jei medžiagos reakcijos su deguonimi arba egzoterminio jos skilimo metu susidariusi šiluma aplinkoje išsisklaido nepakankamai greitai, dėl savaiminio įkaitimo įvyksta savaiminis užsiliepsnojimas. Taigi savaiminis užsiliepsnojimas įvyksta, kai šilumos susidarymo greitis yra didesnis nei jos netekimo greitis.

Bandymo metodika yra naudinga kaip išankstinis kietųjų medžiagų atrankos bandymas. Atsižvelgiant į sudėtingą kietųjų medžiagų užsidegimo ir degimo prigimtį, šiuo metodu nustatyta savaiminio užsiliepsnojimo temperatūra turi būti taikoma tik palyginimui.

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Pagal šį metodą nustatyta savaiminio užsiliepsnojimo temperatūra yra mažiausia aplinkos temperatūra, išreikšta °C, kurioje tam tikras medžiagos kiekis užsidega apibrėžtomis sąlygomis.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nenurodytos.

1.4. METODO PRINCIPAS

Tam tikras bandomosios medžiagos kiekis kambario temperatūroje dedamas į krosnį; užrašoma bandinio viduje matuojamos temperatūros kitimo laike kreivė, krosnies temperatūrą 0,5 °C/min sparta didinant iki 400 °C arba iki lydymosi temperatūros, jei ji žemesnė. Šiame bandyme krosnies temperatūra, kurioje bandinio temperatūra pasiekia 400 °C dėl savaiminio įkaitimo, vadinama savaiminio užsiliepsnojimo temperatūra.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Aparatūra**

1.6.1.1. *Krosnis*

Laboratorinė krosnis (tūris apie 2 litrus), su programuojamu temperatūros reguliavimu ir savaimine oro cirkuliacija bei sprogimo slėgio mažinimo vožtuvu. Siekiant išvengti galimo sprogimo pavojaus, bet kokios skilimo metu susidarančios dujos turi nepatekti ant elektrinių kaitinimo elementų.

▼C1

1.6.1.2. *Kubas iš vielos tinklelio*

Iš nerūdijančio plieno pagamintas vielos tinklelis su 0,045 mm akutėmis turi būti supjaustytas pagal 1 paveiksle pateiktą pavyzdį. Tinklelis turi būti sulankstytas kubu su atviru viršumi ir sutvirtintas viela.

1.6.1.3. *Termoelementai*

Tinkami termoelementai.

1.6.1.4. *Savirašis*

Bet koks dviejų kanalų savirašis, kalibruotas nuo 0 °C iki 600 °C arba pagal atitinkamą įtampą.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

Medžiagos bandomos tokios, kokios yra gaunamos.

1.6.3. **Bandymo eiga**

Kubas užpildomas bandomąja medžiaga ir, švelniai tapšnojant, jos dedama vis daugiau, kol kubas visiškai prisipildo. Toliau kubas kambario temperatūroje pakabinamas krosnies viduryje. Vienas termoelementas patalpinamas kubo viduje, o temperatūrai krosnyje registruoti kitas termoelementas dedamas tarp kubo ir krosnies sienos.

Krosnies ir bandinio temperatūra nuolat užrašoma, krosnies temperatūrą 0,5 °C/min sparta didinant iki 400 °C arba iki lydymosi temperatūros, jei ji yra žemesnė.

Kai medžiaga užsiliepsnoja, bandinio viduje esantis termoelementas rodys labai staigų temperatūros didėjimą lyginant su krosnies temperatūra.

2. **DUOMENYS**

Norint vertinti, svarbu žinoti krosnies temperatūrą, kurioje bandinio temperatūra dėl jo savaiminio įkaitimo pasiekia 400 °C (žr. 2 paveikslą).

3. **ATASKAITA**

Jei įmanoma, ataskaitoje turi būti tokia informacija:

— tiriamosios medžiagos apibūdinimas,

— matavimo rezultatai, įskaitant temperatūros kitimo laike kreivę,

— visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus.

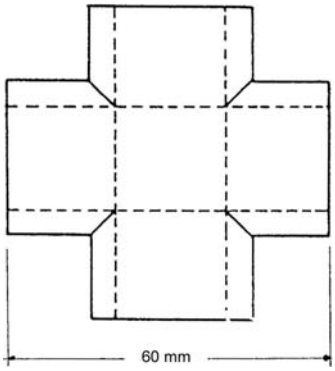
4. **NUORODOS**

NF T 20–036 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

▼C1

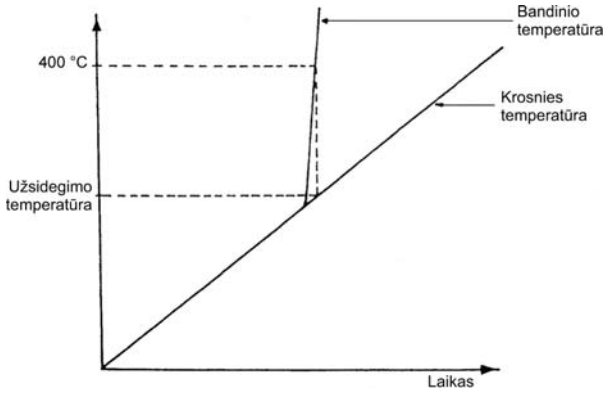
1 paveikslas

20 mm bandymo kubo pavyzdys



2 paveikslas

Tipinė temperatūros kitimo laike kreivė



▼C1

A.16. OKSIDACINĖS SAVYBĖS (KIETOSIOS MEDŽIAGOS)

1. METODAS

1.1. ĮVADAS

Prieš atliekant šį bandymą naudinga turėti išankstinę informaciją apie bet kurias medžiagos potencialias sprogumo savybes.

Šis bandymas netaikomas skysčiams, dujoms, sprogstamosioms arba labai degioms medžiagoms arba organiniams peroksidams.

Šio bandymo atlikti nereikia, jei struktūrinės formulės analizė leidžia pagrįstai neabejoti, kad medžiaga negali egzotermiškai reaguoti su degiąja medžiaga.

Norint išsiaiškinti, ar bandymas turi būti atliekamas taikant ypatingas saugumo priemones, turi būti daromas išankstinis bandymas.

1.2. APIBRĖŽTIS IR VIENETAI

Degimo trukmė: reakcijos laikas, kurį reakcijos zona sklinda palei krūvelę, bandymą atliekant pagal 1.6 aprašytą metodiką.

Degimo greitis: išreikštas milimetrais per sekundę.

Didžiausias degimo greitis: degimo greičio didžiausia vertė, gauta deginant mišinius, kuriuose oksidatorius sudaro nuo 10 % iki 90 % mišinio masės.

1.3. ETALONINĖ MEDŽIAGA

Bandyme ir išankstiniame bandyme kaip etaloninė medžiaga naudojamas bario nitratas (analiziškai grynas).

Etaloninis mišinys yra toks bario nitrato ir celiuliozės miltelių mišinys, paruoštas pagal 1.6, kurio degimo greitis yra didžiausias (paprastai tai mišinys, kuriame bario nitrato yra 60 % masės).

1.4. METODO PRINCIPAS

Išankstinis bandymas atliekamas saugos tikslais. Toliau bandyti nereikia, jei išankstiniu bandymu nustatoma, kad bandomoji medžiaga turi oksidacinių savybių. Jei taip nėra, su medžiaga turi būti atliktas visas bandymas.

Atliekant visą bandymą, bandomoji medžiaga ir atitinkama degioji medžiaga maišomos įvairiais santykiais. Iš kiekvieno mišinio paruošiama krūvelė, kuri viename gale padegama. Nustatytas didžiausias degimo greitis lyginamas su etaloninio mišinio didžiausiu degimo greičiu.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Jei reikia, tinka bet kuris malimo ir maišymo būdas su sąlyga, kad šešių atskirų bandymų didžiausio degimo greitis nuo aritmetinio vidurkio vertės skiriasi ne daugiau kaip 10 %.

▼C1

1.6. METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Paruošimas**

1.6.1.1. *Bandomoji medžiaga*

Bandinį smulkinkite, kad dalelių dydis būtų < 0,125 mm pagal tokią metodiką: bandomąją medžiagą sijokite, likusiąją dalį malkite ir vėl sijokite, kol per sietą išsijojamas visas bandinys.

Galima taikyti bet kokį malimo ir sijojimo būdą, kuris atitiktų kokybės kriterijus.

Prieš ruošiant mišinį medžiaga išdžiovinama 105 °C temperatūroje iki pastoviosios masės. Jei bandomosios medžiagos skilimo temperatūra yra mažesnė kaip 105 °C, medžiaga turi būti išdžiovinta atitinkamoje mažesnėje temperatūroje.

1.6.1.2. *Degioji medžiaga*

Degioji medžiaga yra celiuliozės milteliai. Celiuliozės rūšis turi atitikti plonasluoksnėje chromatografijoje arba kolonėlinėje chromatografijoje naudojamą celiuliozę. Nustatyta, kad bandymui tinkama celiuliozės rūšis, kurios daugiau kaip 85 % plaušelių ilgis yra nuo 0,020 iki 0,075 mm. Celiuliozės milteliai sijojami per sietą, kurio akučių dydis 0,125 mm. Visą bandymą turi būti naudojama celiuliozė iš tos pačios partijos.

Prieš ruošiant mišinį celiuliozės milteliai džiovinami 105 °C temperatūroje iki pastoviosios masės.

Jei išankstiniam bandymui naudojami medienos miltai, ruošiami spygliuočių medienos miltai, surinkus tą dalį, kuri nusisijoja per 1,6 mm dydžio akučių sietą, ji gerai sumaišoma, po to ne didesnis kaip 25 mm storio sluoksnis keturias valandas džiovinamas 105 °C temperatūroje. Atšaldoma ir laikoma sandariame inde, jį pripildžius kuo pilniau iki naudojimo, sunaudoti geriausiai per 24 valandas po džiovinimo.

1.6.1.3. *Padegimo šaltinis*

Padegimo šaltinis turi būti karšta dujų degiklio (mažiausias skersmuo 5 mm) liepsna. Jei naudojamas kitas uždegimo šaltinis (pvz., bandant inertinių dujų atmosferoje), būtina pateikti aprašymą ir naudojimo pagrindimą.

1.6.2. **Bandymo eiga**

Pastaba

Oksidatorių mišiniai su celiulioze arba medienos miltais turi būti laikomi potencialiai sprogiais mišiniais ir su jais turi būti elgiamasi kiek galima atsargiau.

1.6.2.1. *Išankstinis bandymas*

Išdžiovinta medžiaga gerai sumaišoma su išdžiovinta celiulioze arba medienos miltais, imant 2 masės dalis bandomosios medžiagos ir 1 masės dalį celiuliozės arba medienos miltų ir mišinys, pripildant be plūkimo kūgio formos šabloną (pvz., laboratorinį stiklinį piltuvą, užkimšus jo kojelę), formuojamas į kūgio formos krūvelę, kurios matmenys 3,5 cm (pagrindo skersmuo) × 2,5 cm (aukštis).

▼C1

Krūvelė dedama ant šaltos nedegios, neakytos ir blogai šilumą praleidžiančios pagrindo plokštės. Bandymas turi būti atliktas traukos spintoje, kaip aprašyta 1.6.2.2.

Padegimo šaltiniu prisiliečiama prie kūgio. Stebimas ir užrašomas vykstančios reakcijos intensyvumas ir trukmė.

Jei reakcija vyksta intensyviai, medžiaga turi būti laikoma oksiduojančia.

Kiekvienu atveju, jei kyla abejonių, būtina atlikti toliau aprašytą bandinių eilės bandymą.

1.6.2.2. *Bandinių eilės bandymas*

Paruoškite oksidatoriaus ir celiuliozės mišinius, kuriuose oksidatoriaus kiekis kinta kas 10 % nuo 10 % iki 90 % masės. Norint degimo greičio didžiausią vertę gauti tiksliau, kraštiniams atvejams turi būti naudojami tarpinės sudėties oksidatoriaus ir celiuliozės mišiniai.

Krūvelei paruošti naudojama forma. Iš metalo pagaminta forma yra 250 mm ilgio, o jos skerspjūvis yra trikampis, kurio vidinis aukštis 10 mm ir vidinis ilgis 20 mm. Abejose formos pusėse išilgine kryptimi tvirtinamos dvi šoninės metalinės plokštės, kurios yra 2 mm aukštesnės nei viršutinis trikampio skerspjūvio kraštas (žr. paveikslą). Šis įtaisas pripildomas mišinio, jo neplakant ir įpilant nedidelį perteklių. Forma vieną kartą numetama iš 2 cm aukščio ant kieto paviršiaus, o medžiagos perteklius nubraukiamas įstrižai pasukta plokštele. Šoninės plokštės nuimamos ir likę milteliai lyginami velenėliu. Po to, ant formos viršaus uždedama nedegi, neakyta ir blogai šilumą praleidžianti pagrindo plokštė, įtaisas apverčiamas ir forma nuimama.

Krūvelė dedama į traukos spintą skersai traukos krypčiai.

Oro greitis turi būti pakankamas, kad dūmai negalėtų patekti į laboratoriją, ir bandymo metu turi nesikeisti. Apie įtaisą turi būti įtaisytas nuo skersvėjų saugantis ekranas.

Kadangi celiuliozė ir kai kurios bandomosios medžiagos yra higroskopiškos, bandymas turi būti atliekamas kiek įmanoma greičiau.

Vieną krūvelės galą padekite, prikišę prie jo liepsną.

Po to, kai reakcijos zona įveikia pradinį 30 mm atstumą, matuokite reakcijos trukmę 200 mm atstumu.

Bandymas atliekamas su etalonine medžiaga ir bent vieną kartą su kiekvienu iš bandomosios medžiagos mišinių su celiulioze.

Jei nustatoma, kad didžiausias degimo greitis yra žymiai didesnis nei etaloninio mišinio didžiausias degimo greitis, bandymas gali būti nutrauktas; priešingu atveju bandymas turi būti pakartotas penkis kartus su kiekvienu iš trijų mišinių, kuriems gautas didžiausias degimo greitis.

▼C1

Jei kyla įtarimas, kad rezultatas yra klaidingai teigiamas, bandymas turi būti pakartotas vietoje celiuliozės naudojant inertišką medžiagą, kurios dalelių dydis būtų panašus, pvz., diatomitą. Be to, bandomosios medžiagos ir celiuliozės mišinys, kurio degimo greitis yra didžiausias, turi būti pakartotinai išbandytas inertiškoje atmosferoje (deguonies < 2 % pagal tūrį).

2. **DUOMENYS**

Saugos tikslais turi būti laikoma, kad didžiausias degimo greitis, o ne jo vidutinė vertė yra bandomosios medžiagos oksidacines savybes apibūdinantis parametras.

Vertinant imama didžiausia degimo greičio vertė, gauta atlikus šešis atitinkamo mišinio bandymus.

Nubrėžkite kiekvieno mišinio didžiausiojo degimo greičio priklausomybės nuo oksidatoriaus koncentracijos kreivę. Iš kreivės nustatykite didžiausiąją degimo greičio vertę.

Šešios išmatuotos degimo greičio vertės, gautos atliekant bandymus su mišiniu, kuriam nustatytas didžiausias degimo greitis, turi nesiskirti nuo aritmetinio vidurkio vertės daugiau kaip 10 %; kitu atveju turi būti patobulinti malimo ir maišymo metodai.

Gautą didžiausiąjį degimo greitį palyginkite su etaloninio mišinio didžiausiuoju degimo greičiu (žr. 1.3).

Jei bandymai atliekami inertiškoje atmosferoje, didžiausias reakcijos greitis lyginamas su etaloninio mišinio degimo inertiškoje atmosferoje didžiausiu greičiu.

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMŲ ATASKAITA

Jei įmanoma, bandymų ataskaitoje turi būti tokia informacija:

— bandomosios medžiagos tapatumas, sudėtis, grynumas, drėgmės kiekis ir t. t.,

— kiekvienas bandinio apdorojimo būdas (pvz., malimas, džiovinimas),

— bandymuose naudotas uždegimo šaltinis,

— matavimų rezultatai,

— reakcijos pobūdis (pvz., degimas pliūpsniais paviršiuje, degimas visoje bandinio masėje, visa informacija apie degimo produktus ir t. t.),

— visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus, įskaitant degimo intensyvumo aprašymą (liepsnojimas, kibirkščiavimas, rūkimas, lėtas rusenimas ir t. t.) ir apytikrę degimo trukmę, nustatytą išankstiniame saugos (atrankos) bandyme bandomajai ir etaloninei medžiagoms,

— bandymų su inertiška medžiaga rezultatai, jei yra,

— bandymų inertiškoje atmosferoje rezultatai, jei yra.

▼C1

3.2. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Laikoma, kad medžiaga yra oksiduojanti, jei:

a) išankstinio bandymo reakcija vyksta intensyviai,

b) atliekant išsamų bandymą bandomųjų mišinių degimo greitis yra didesnis arba lygus celiuliozės ir bario nitrato etaloninio mišinio didžiausiajam degimo greičiui.

Norint išvengti klaidingai teigiamų rezultatų, juos aiškinant turi būti atsižvelgta į rezultatus, gautus atliekant medžiagos mišinių su inertiška medžiaga bandymus ir (arba) inertiškoje atmosferoje atliktų bandymų rezultatus.

4. **NUORODOS**

NF T 20–035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

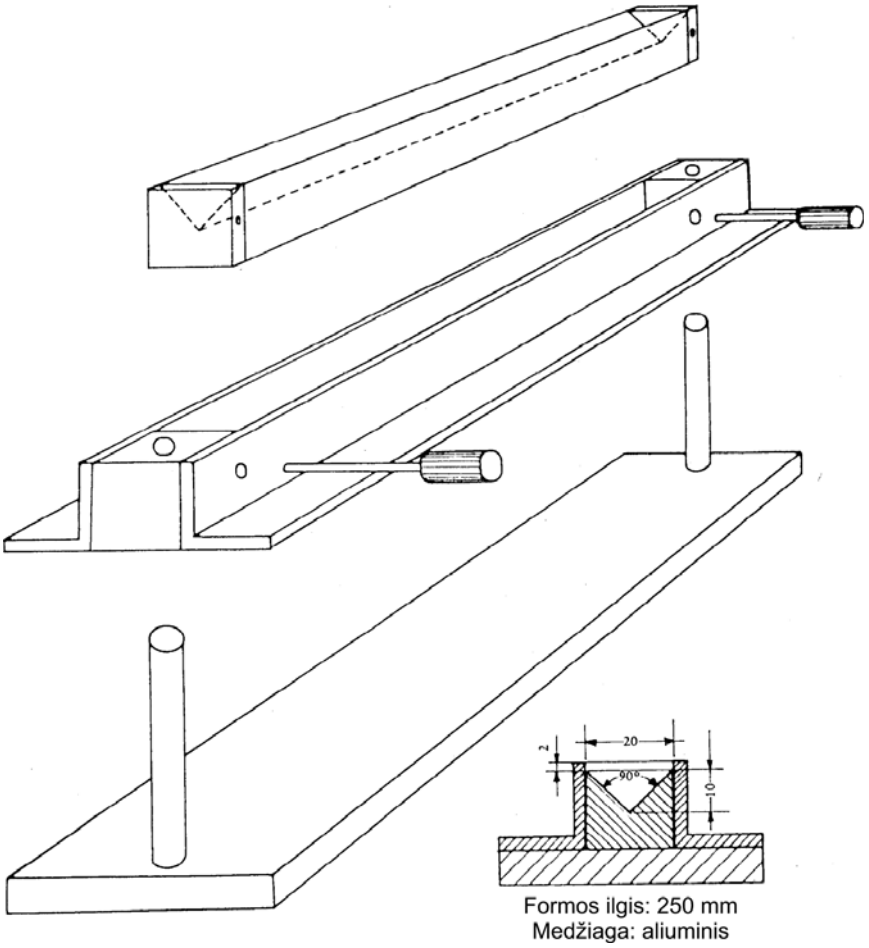
▼C1

Priedėlis

Paveikslas

Bandiniui ruošti naudojama forma ir priedai

(visi matmenys milimetrais)



▼C1

A.17. POLIMERŲ SKAITINĖS VIDUTINĖS MOLEKULINĖS MASĖS IR MOLEKULINĖS MASĖS PASISKIRSTYMAS

1. METODAS

Šis gelchromatografijos (Gel Permeation Chromatographic) metodas yra OECD TG 118 (1996) kopija. Pagrindiniai principai ir papildoma techninė informacija pateikta 1 nuorodoje.

1.1. ĮVADAS

Kadangi polimerų savybės yra labai skirtingos, neįmanoma aprašyti vieną atskirą metodą tiksliai nustatantį atskyrimo ir vertinimo sąlygas, kurios apimtų visas galimybes ir specifinius atvejus, pasitaikančius atskiriant polimerus. Ypač sudėtingas polimerų sistemas dažnai neįmanoma paruošti gelchromatografijai (GPC). Kai GPC nenaudotina, molekulinę masę galima nustatyti kitų metodų pagalba (žr. papildymą). Tokiais atvejais turi būti pateiktos visos taikyto metodo detalės ir pagrindimas.

Aprašytas metodas paruoštas DIN 55672 standarto (1) pagrindu. Visa detali informacija apie tai, kaip atlikti bandymus ir kaip vertinti duomenis, galima rasti šiame DIN standarte. Tuo atveju, kai būtina keisti bandymo sąlygas, šie keitimai turi būti pagrįsti. Galima taikyti kitus standartus, jei jie yra visiškai aprašyti. Aprašytame metode kalibravimui naudojami žinomo polidispersiškumo polistireno bandiniai ir metodą gali tekti keisti, pritaikant kai kuriems polimerams, pvz., vandenyje tirpiems ir ilgos šakotos grandinės polimerams.

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Skaitinė vidutinė molekulinė masė M_n ir masinė vidutinė molekulinė masė M_w nustatomos taikant tokias lygtis:

$$M_n = \sum_{i=1}^{n} H_i \Big/ \sum_{i=1}^{n} H_i/M_i \qquad M_n = \sum_{i=1}^{n} H_i \Big/ \sum_{i=1}^{n} H_i/M_i$$

čia:

H_i yra nuo pagrindo linijos išmatuotas detektoriaus signalo lygis sulaikymo tūriui V_i,

M_i sulaikymo tūrį V_i atitinkančios polimero frakcijos molekulinė masė ir

n yra duomenų taškų skaičius.

Molekulinės masės skirstinio plotį, kuris yra sistemos dispersiškumo matas, nustato santykis M_w/M_n.

▼C1

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Kadangi GPC yra santykinis metodas, turi būti atliekamas kalibravimas. Paprastai šiam tikslui naudojami siaurame intervale pasiskirstę linijinės sandaros polistireno etalonai, kurių vidutinės molekulinės masės M_n ir M_w ir molekulinės masės pasiskirstymas yra žinomi. Kalibravimo kreivę nežinomo bandinio molekulinei masei nustatyti galima naudoti tik tuomet, jei bandiniui ir etalonams atskirti naudotos sąlygos buvo parinktos identišku būdu.

Nustatyta priklausomybė tarp molekulinės masės ir eliuavimo tūrio galioja tik konkretaus bandymo specifinėmis sąlygomis. Svarbiausios sąlygos yra temperatūra, tirpiklis (arba tirpiklių mišinys), chromatografavimo sąlygos ir atskyrimo kolonėlė arba kolonėlių sistema.

Taip nustatytos bandinio molekulinės masės yra santykinės vertės ir vadinamos „molekulinėmis masėmis pagal polistireną“. Tai reiškia, kad dėl sandaros ir cheminių skirtumų tarp bandinio ir etalonų molekulinės masės nuo absoliučiųjų verčių gali skirtis didesniu arba mažesniu laipsniu. Jei naudojami kiti etalonai, pvz., polietilenglikolis, polioksietilenas, polimetilmetakrilatas, poliakrilo rūgštis, turi būti nurodyta priežastis.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandinio molekulinės masės skirstinys ir vidutinės molekulinės masės (M_n, M_w) gali būti nustatyti taikant GPC. GPC yra specialus skysčių chromatografijos metodas, kuriame bandinys atskiriamas pagal atskirų komponentų hidrodinaminius tūrius (2).

Atskyrimas vyksta, kai bandinys praeina per kolonėlę, užpildytą poringa medžiaga, dažniausiai organiniu geliu. Mažos molekulės gali įsiskverbti į poras, tuo tarpu didelės molekulės ekskliuduojamos. Todėl didelių molekulių kelias yra trumpesnis ir jos išplaunamos pirmos. Vidutinio dydžio molekulės įsiskverbia į kai kurias poras ir išplaunamos vėliau. Mažiausios molekulės, kurių vidutinis hidrodinaminis spindulys yra mažesnis nei gelio poros, gali įsiskverbti į visas poras. Šios molekulės išplaunamos paskutinės.

Teoriškai atskyrimą apsprendžia vien tik molekulių dydis, tačiau praktikoje sunku išvengti kai kurių trukdančių sugerties veiksnių. Netolygus kolonėlės užpildymas ir nenaudingi tūriai gali bloginti padėtį (2).

Aptikimas atliekamas, pvz., matuojant lūžio rodiklį arba UV-sugertį, taip gaunama paprasta pasiskirstymo kreivė. Tačiau norint kreivei priskirti tikrąsias molekulinės masės vertes, kolonėlę reikia kalibruoti, leidžiant per ją žinomos molekulinės masės polimerus, geriausiai - panašios sandaros polimerus, pvz., įvairius polistireno etalonus. Vertikaliojoje ašyje žymint įvairios molekulinės masės išplautų dalelių kiekį, kuris reiškiamas mase, o horizontaliojoje ašyje – molekulinės masės logaritmą, dažniausiai gaunama Gauso kreivė, kartais su iškreipta nedidele uodega mažos molekulinės masės pusėje.

▼C1

1.5. KOKYBĖS KERITERIJAI

Eliuavimo tūrio pakartojamumas (variacijos koeficientas) turi būti geresnis nei 0,3 %. Jei vertinant skirtingu laiku darytą chromatogramą, ji neatitinka tik ką minėto kriterijaus, reikiamas analizės pakartojamumas turi būti užtikrintas atliekant pataisą vidiniu etalonu (1). Polidispersiškumas priklauso nuo etalonų molekulinės masės. Polistireno etalonų atveju tipiškos vertės yra tokios:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p yra etalono molekulinė masė, atitinkanti smailės viršūnę)

1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Etaloninių polistireno tirpalų ruošimas**

Polistireno etalonai ištirpinami juos kruopščiai sumaišant su pasirinktu eliuentu. Ruošiant tirpalus turi būti atsižvelgta į gamintojo rekomendacijas.

Pasirinktų etalonų koncentracijos priklauso nuo įvairių veiksnių, pvz., injekcijos tūrio, tirpalo klampumo ir analizinio detektoriaus jautrumo. Norint išvengti perkrovos, didžiausias injekcijos tūris turi būti pritaikytas kolonėlės ilgiui. Taikant GPC medžiagų atskyrimui analizėje, tipiški injekcijos tūriai 30 cm × 7,8 mm kolonėlei paprastai yra 40–100 µl. Galima naudoti didesnį tūrį, tačiau jis neturi viršyti 250 µl. Prieš pradedant tikrąjį kolonėlės kalibravimą, turi būti nustatytas optimalus santykis tarp injekcijos tūrio ir koncentracijos.

1.6.2. **Bandinio tirpalo ruošimas**

Iš esmės tie patys reikalavimai taikomi ruošiant bandinių tirpalus. Bandinys ištirpinamas tinkamame tirpiklyje, pvz., tetrahidrofurane, kruopščiai maišant. Jokiu būdu negalima tirpinti naudojant ultragarsinę vonią. Jei būtina, bandinio tirpalas gryninamas, filtruojant per membraninį filtrą, kurio porų dydis 0,2–2 µm.

Galutinėje ataskaitoje turi būti pažymėta, ar buvo neištirpusių dalelių, nes tai gali būti didelės molekulinės masės medžiagų dalelės. Ištirpusių dalelių procentinei masės daliai nustatyti turi būti taikomas tinkamas metodas. Tirpalai turi būti panaudoti per 24 valandas.

1.6.3. **Aparatūra**

— rezervuaras tirpikliui,

— dujų pašalinimo įtaisas (jei reikia),

— siurblys,

▼C1

— pulsacijų slopintuvas (jei reikia),

— injekcijos sistema,

— chromatografinės kolonėlės,

— detektorius,

— debitmatis (jei reikia),

— duomenų rašiklis-procesorius,

— atliekų indas.

Turi būti užtikrinta, kad GPC sistema būtų inertiška naudojamiems tirpikliams (pvz., naudoti plieninius kapiliarus, jei tirpiklis tertrahidrofuranas).

1.6.4. **Įšvirkštimas ir tirpiklio tiekimo sistema**

Tam tikras bandinio tirpalo tūris griežtai nustatytoje zonoje įleidžiamas į kolonėlę, naudojant automatinį bandinio tiektuvą arba rankiniu būdu. Švirkšto stūmoklio per greitas ištraukimas arba spaudimas įleidžiant rankiniu būdu gali būti molekulinių masių stebimo pasiskirstymo pokyčių priežastimi. Kiek įmanoma, tirpiklio tiekimo sistema turi būti be pulsacijų, geriausiu atveju jai reikia pulsacijų slopintuvo. Srautas yra apie 1 ml/min.

1.6.5. **Kolonėlė**

Atsižvelgiant į bandinį, polimeras tiriamas naudojant vieną paprastą kolonėlę arba kelias nuosekliai sujungtas kolonėles. Prekyboje yra keletas kolonėlėms užpildyti naudojamų poringų medžiagų su apibrėžtomis savybėmis (pvz., porų dydžiu, ekskliudavimo ribomis). Atskyrimui naudojamo gelio arba kolonėlės aukščio pasirinkimas priklauso ir nuo bandinio savybių (hidrodinaminių tūrių, molekulinės masės pasiskirstymo) ir nuo specifinių atskyrimo sąlygų, pvz., tirpiklio, temperatūros ir srauto (1) (2) (3).

1.6.6. **Teorinės lėkštelės**

Atskyrimui naudojama kolonėlė arba kolonėlių sistema turi būti apibūdinta teorinių lėkštelių skaičiumi. Tetrahidrofurano kaip eliuento atveju reikia į žinomo ilgio kolonėlę įleisti etilbenzeno arba kito tinkamo nepolinio tirpiklio tirpalą. Teorinių lėkštelių skaičius apskaičiuojamas pagal tokią lygtį:

$$N = 5{,}54 \left(\frac{(V_e)}{(W_{1/2})} \right)^2 \qquad \text{arba} \qquad N = 16 \left(\frac{(V_e)}{(W)} \right)^2$$

kurioje:

N = teorinių lėkštelių skaičius

V_e = smailės viršūnę atitinkantis eliuavimo tūris

▼C1

W = smailės plotis pagrindo linijoje

$W_{1/2}$ = smailės plotis per smailės aukščio vidurį

1.6.7. **Atskyrimo efektyvumas**

Be teorinių lėkštelių skaičiaus, kuris apsprendžia juostos plotį, tam tikrą vaidmenį vaidina atskyrimo efektyvumas, kurį apibūdina kalibracinės kreivės statumas. Kolonėlės atskyrimo efektyvumas nustatomas pagal tokią priklausomybę:

$$\left(\frac{((V_{e,M_x}) - (V_{e,(10M_x)}))}{\text{kolonėlės skerspjūvio plotas}}\right) \geq 6{,}0 \left[\frac{(cm^3)}{(cm^2)}\right]$$

kurioje:

$V_{e,Mx}$ = polistireno, turinčio molekulinę masę M_x, eliuavimo tūris,

V_e, (10Mx) = polistireno, turinčio 10 kartų didesnę molekulinę masę, eliuavimo tūris.

Sistemos atskiriamoji galia dažniausiai apibrėžiama taip:

$$R_{1,2} = 2 \times \left(\frac{(V_{e1} - V_{e2})}{(W_1 + W_2)}\right) \times \left(\frac{(1)}{(\log_{10}(M_2/M_1))}\right)$$

čia:

V_{e1}, V_{e2} = dviejų polistireno etalonų eliuavimo tūriai, atitinkantys smailės viršūnę,

W_1, W_2 = smailių pločiai pagrindo linijoje,

M_1, M_2 = molekulinės masės, atitinkančios smailių viršūnes (turi skirtis 10 kartų).

Kolonėlės sistemai R vertė turi būti didesnė kaip 1,7 (4).

1.6.8. **Tirpikliai**

Visi tirpikliai turi būti labai gryni (tetrahidrofurano grynumas 99,5 %). Tirpiklio indas (jei reikia, su inertinių dujų atmosfera) turi būti pakankamai didelis kolonėlei kalibruoti ir kelių bandinių analizei atlikti. Prieš tirpiklį tiekiant siurbliu į kolonėlę iš jo turi būti pašalintos dujos.

1.6.9. **Temperatūros reguliavimas**

Svarbių vidinių komponentų (injekcijos kilpos, kolonėlių, detektoriaus ir vamzdžių) temperatūra turi būti pastovi ir atitikti pasirinktą tirpiklį.

▼C1

1.6.10. **Detektorius**

Detektoriaus paskirtis – kiekybiškai registruoti iš kolonėlės išplauto bandinio koncentraciją. Norint, kad smailės nebūtų labai plačios, detektoriaus kiuvetės tūris turi būti kuo mažesnis. Jis neturi būti didesnis kaip 10 µl, išskyrus šviesos sklaidos ir klampumo detektorius. Detektavimui paprastai naudojama diferencinė refraktometrija. Tačiau, jei to reikalauja bandinio specifinės savybės arba eliuavimo tirpiklis, gali būti naudojami kitų tipų detektoriai, pvz., UV/VIS, IR, klampumo detektoriai ir t. t.

2. **DUOMENYS IR ATASKAITA**

2.1. DUOMENYS

Išsamių vertinimo kriterijų, taip pat duomenų kaupimui ir apdorojimui keliamų reikalavimų reikia ieškoti DIN standarte (1).

Kiekvienam bandiniui turi būti atlikti du nepriklausomi bandymai. Bandiniai turi būti analizuojami atskirai.

Kiekvieną kartą matuojant reikia gauti M_n, M_w, M_w/M_n ir M_p vertes. Būtina aiškiai nurodyti, kad išmatuotos vertės yra santykinės vertės, atitinkančios naudojamų etalonų molekulinę masę. Po sulaikymo tūrio arba sulaikymo trukmės verčių (galbūt pataisytų naudojant vidinį etaloną) nustatymo vienam šių dydžių atidedamos log M_p vertės (M_p yra kalibravimo etalono smailės viršūnę atitinkanti vertė). Kiekvienai molekulinės masės dešimtainei skilčiai būtina turėti bent du kalibravimo taškus, o visai kalibracinei kreivei, kuri turi apimti įvertintą bandinio molekulinę masę, turi būti bent penki matavimų taškai. Mažą molekulinę masę atitinkantis kalibracinės kreivės galinis taškas nustatomas pagal n – heksilbenzeną arba kitokį tinkamą nepolinį tirpiklį. Skaitinė vidutinė ir masinė vidutinė molekulinės masės paprastai apskaičiuojamos elektroninėmis duomenų apdorojimo priemonėmis, taikant 1.2 skyriaus formules. Atliekant apskaičiavimus rankiniu būdu, galima pasižiūrėti į ASTM D 3536–91 (3).

Pasiskirstymo kreivė turi būti pateikta lentelės pavidalu arba kaip grafikas (diferencinis dažnis arba bendrojo kiekio procentinės dalys pagal log M). Vaizduojant grafiškai viena molekulinės masės dešimtainė skiltis paprastai turi būti 4 cm pločio, o smailės viršūnės aukštis turi būti apie 8 cm. Integralinių pasiskirstymo kreivių atveju atstumas ordinatėje tarp taškų, atitinkančių 0 ir 100 %, turi būti apie 10 cm.

2.2. BANDYMŲ ATASKAITA

Bandymų ataskaitoje turi būti tokia informacija:

2.2.1. **Bandomoji medžiaga**

— turima informacija apie bandomąją medžiagą (tapatumas, priedai, priemaišos),

▼C1

— bandinio apdorojimo aprašymas, pastebėjimai, problemos.

2.2.2. **Aparatūra**

— tirpiklio rezervuaras, inertinės dujos, dujų pašalinimas iš eliuento, eliuento sudėtis, priemaišos,

— siurblys, pulsacijų slopintuvas, injekcijos sistema,

— atskyrimo kolonėlės (gamintojas, visa informacija apie kolonėlių charakteristikas, pvz., porų dydis, atskyrimo medžiagos rūšis ir t. t., naudotų kolonėlių skaičius, ilgis ir jungimo tvarka),

— kolonėlės (arba jų rinkinio) teorinių lėkštelių skaičius, atskyrimo efektyvumas (sistemos atskyrimo galia),

— informacija apie smailių simetriją,

— kolonėlės temperatūra, temperatūros reguliavimo būdas,

— detektorius (matavimo principas, tipas, kiuvetės tūris),

— debitmatis, jei buvo naudotas (gamintojas, matavimo principas),

— duomenų registravimo ir apdorojimo sistema (aparatas ir programinė įranga).

2.2.3. **Sistemos kalibravimas**

— kalibracinės kreivės gavimo metodo detalus aprašymas,

— informacija apie šio metodo kokybės kriterijus (pvz., koreliacijos koeficientą, paklaidų kvadratų sumą ir t. t.),

— informacija apie visas ekstrapoliacijas, prielaidas ir aproksimacijas, darytas bandymo eigoje ir vertinant bei apdorojant duomenis,

— visi matavimai, naudoti kalibracinei kreivei gauti, turi būti dokumentuoti lentelėje, kurioje kiekvienam kalibravimo taškui būtų pateikta tokia informacija:

  — bandinio pavadinimas,

  — bandinio gamintojas,

  — etalonų būdingosios vertės M_p, M_n, M_w ir M_w/M_n, kokias pateikė gamintojas, arba gautos vėlesniuose matavimuose, kartu nurodant nustatymo metodo detales,

  — injekcijos tūris ir injekcijos koncentracija,

▼C1

— kalibravimui naudota M_p vertė,

— išmatuotas eliuavimo tūris arba pataisyta sulaikymo trukmė, atitinkantys smailės viršūnę,

— smailės viršūnę atitinkanti apskaičiuota M_p vertė,

— apskaičiuotos ir kalibravimui naudotos M_p vertės procentinė paklaida.

2.2.4. **Vertinimas:**

— vertinimas atsižvelgiant į laiką: metodai taikyti reikiamam pakartojamumui užtikrinti (pataisų darymo metodas, vidinis standartas ir t. t.),

— informacija apie tai, ar vertinimas buvo atliekamas pagal eliuavimo tūrį ar pagal sulaikymo trukmę,

— informacija apie vertinimo ribas, jei smailė nėra iki galo analizuota,

— lyginimo metodų aprašymas, jei jie buvo taikyti,

— bandinio ruošimo ir išankstinio apdorojimo metodikos,

— duomenys apie neištirpusias daleles, jei yra,

— injekcijos tūris (µl) ir injekcijos koncentracija (mg/ml)

— stebėjimų duomenys, nurodantys veiksnius, kurie yra nukrypimų nuo teorinio GPC profilio priežastis,

— bandymo metodikose darytų visų keitimų detalus aprašymas,

— detalės apie paklaidų intervalus,

— bet kokia kita informacija ir stebėjimų duomenys, reikalingi duomenims interpretuoti.

3. **NUORODOS**

1) DIN 55672 (1995) Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

3) ASTM D 3536–91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4) ASTM D 5296–92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼C1

Priedėlis

Kitų polimerų skaitinės vidutinės molekulinės masės nustatymo metodų pavyzdžiai

Gelchromatografija (GPC) yra labiausiai tinkamas būdas M_n nustatyti, ypač, jei yra rinkinys etalonų, kurių sandara yra panaši į polimero sandarą. Tačiau, jei norint taikyti GPC kyla praktinių sunkumų arba kai jau iš anksto tikimasi, kad medžiaga neatitiks M_n nustatyto kriterijaus (kas turi būti patvirtinta), taikytini šie alternatyvūs metodai, pvz.:

1. **Koligatyviųjų savybių naudojimas**

1.1. Ebulioskopija arba krioskopija:

matuojamas tirpiklio virimo temperatūros didėjimas (ebulioskopija) arba užšąlimo temperatūros mažėjimas (krioskopija), kai jame ištirpinama polimero. Metodas remiasi faktu, kad ištirpinto polimero įtaką virimo (užšalimo) temperatūros pokyčiui apsprendžia polimero molekulinė masė (1) (2).

Taikomumas: $M_n < 20\,000$.

1.2. Garų slėgio mažėjimas:

matuojamas pasirinkto etaloninio skysčio garų slėgis prieš įdedant polimero ir po žinomų polimero kiekių pridėjimo (1) (2).

Taikomumas: $M_n < 20\,000$ (teoriškai; tačiau praktikoje metodo pritaikymas ribotas).

1.3. Membraninė osmometrija:

remiasi osmoso principu, t. y. tirpiklio molekulių savaiminiu perėjimu per puslaidę membraną iš praskiesto tirpalo į koncentruotą tirpalą. Bandyme praskiesto tirpalo koncentracija yra nulinė, o koncentruotame tirpale yra polimero. Dėl tirpiklio siurbimo per membraną susidaro slėgių skirtumas, kurio dydis priklauso nuo polimero koncentracijos ir molekulinės masės (1) (3) (4).

Taikomumas: kai M_n yra 20 000–200 000 intervale.

1.4. Osmometrija garų fazėje:

gryno tirpiklio aerozolio garavimo greitis lyginamas su bent trijų aerozolių, turinčių skirtingos koncentracijos polimero, garavimo greičiu (1) (2) (4).

Taikomumas: $M_n < 20\,000$.

▼C1

2. **Galinių grupių analizė**

Norint taikyti šį metodą, reikia žinoti bendrąją polimero sandarą ir jo galinių grupių (kurias nuo pagrindinės grandinės turi būti galima atskirti, pvz., taikant branduolių magnetinio rezonanso metodą arba titravimo (derivatizavimo) metodą) prigimtį. Pagal polimere esančių galinių grupių molekulinę koncentraciją gali būti nustatyta jo molekulinės masės vertė (7) (8) (9).

Taikomumas: M_n iki 50 000 (patikimumui mažėjant).

3. **Nuorodos**

1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.

2) Glover, C.A., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

3) ASTM D 3750–79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4) Coll, H. (1989). membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, p. 25–52.

5) ASTM 3592–77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure osmometry. In: Determinationn of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

7) SchrËder, E., Müller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.

8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.

9) Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139–2146.

▼C1

A.18. **MAŽOS MOLEKULINĖS MASĖS MEDŽIAGŲ KIEKIS POLIMERUOSE**

1. **METODAS**

Šis gelchromatografijos (Gel Permeation Chromatographic) metodas yra OECD TG 119 (1996) kopija. Pagrindiniai principai ir papildoma techninė informacija pateikta nuorodose.

1.1. ĮVADAS

Kadangi polimerų savybės yra labai skirtingos, neįmanoma aprašyti vieną atskirą metodą, tiksliai nustatantį atskyrimo ir vertinimo sąlygas, kurios apimtų visas galimybes ir specifinius atvejus, pasitaikančius atskiriant polimerus. Ypač sudėtingas polimerų sistemas dažnai neįmanoma paruošti gelchromatografijai (GPC). Kai GPC nenaudotina, molekulinę masę galima nustatyti kitų metodų pagalba (žr. papildymą). Tokiais atvejais turi būti pateiktos visos taikyto metodo detalės ir pagrindimas.

Aprašytas metodas paruoštas DIN 55672 standarto (1) pagrindu. Visa detali informacija apie tai, kaip atlikti bandymus ir kaip vertinti duomenis, galima rasti šiame DIN standarte. Tuo atveju, kai būtina keisti bandymo sąlygas, šie keitimai turi būti pagrįsti. Galima taikyti kitus standartus, jei jie yra visiškai aprašyti. Aprašytame metode kalibravimui naudojami žinomo polidispersiškumo polistireno bandiniai ir metodą gali tekti keisti, pritaikant kai kuriems polimerams, pvz., vandenyje tirpiems ir ilgos šakotos grandinės polimerams.

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Mažesnė nei 1 000 daltonų molekulinė masė sąlygiškai apibrėžiama kaip maža molekulinė masė.

Skaitinė vidutinė molekulinė masė M_n ir masinė vidutinė molekulinė masė M_w nustatomos taikant tokias lygtis:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

kuriose:

H_i = yra nuo pagrindo linijos išmatuotas detektoriaus signalo lygis sulaikymo tūriui V_i,

M_i = sulaikymo tūrį V_i atitinkančios polimero frakcijos molekulinė masė ir n yra duomenų taškų skaičius.

Molekulinės masės skirstinio plotį, kuris yra sistemos dispersiškumo matas, nusako santykis M_w/M_n.

▼C1

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Kadangi GPC yra santykinis metodas, turi būti atliekamas kalibravimas. Paprastai šiam tikslui naudojami siaurame intervale pasiskirstę linijinės sandaros polistireno etalonai, kurių vidutinės molekulinės masės M_n ir M_w ir molekulinės masės pasiskirstymas yra žinomi. Kalibravimo kreivę nežinomo bandinio molekulinei masei nustatyti galima naudoti tik tuomet, jei bandiniui ir etalonams atskirti naudotos sąlygos buvo parinktos identišku būdu.

Nustatyta priklausomybė tarp molekulinės masės ir eliuavimo tūrio galioja tik konkretaus bandymo specifinėmis sąlygomis. Svarbiausios sąlygos yra temperatūra, tirpiklis (arba tirpiklių mišinys), chromatografavimo sąlygos ir atskyrimo kolonėlė arba kolonėlių sistema.

Taip nustatytos bandinio molekulinės masės yra santykinės vertės ir vadinamos „molekulinėmis masėmis pagal polistireną“. Tai reiškia, kad dėl sandaros ir cheminių skirtumų tarp bandinio ir etalonų molekulinės masės nuo absoliučiųjų verčių gali skirtis didesniu arba mažesniu laipsniu. Jei naudojami kiti etalonai, pvz., polietilenglikolis, polioksietilenas, polimetilmetakrilatas, poliakrilo rūgštis, turi būti nurodyta jų naudojimo priežastis.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandinio molekulinės masės skirstinys ir vidutinės molekulinės masės (M_n, M_w) gali būti nustatyti taikant GPC. GPC yra specialus skysčių chromatografijos metodas, kuriame bandinys atskiriamas pagal atskirų komponentų hidrodinaminius tūrius (2).

Atskyrimas vyksta, kai bandinys praeina per kolonėlę, užpildytą poringa medžiaga, dažniausiai organiniu geliu. Mažos molekulės gali įsiskverbti į poras, tuo tarpu didelės molekulės ekskliuduojamos. Todėl didelių molekulių kelias yra trumpesnis ir jos išplaunamos pirmos. Vidutinio dydžio molekulės įsiskverbia į kai kurias poras ir išplaunamos vėliau. Mažiausios molekulės, kurių vidutinis hidrodinaminis spindulys yra mažesnis nei gelio poros, gali įsiskverbti į visas poras. Šios molekulės išplaunamos paskutinės.

Teoriškai atskyrimą apsprendžia vien tik molekulių dydis, tačiau praktikoje sunku išvengti kai kurių trukdančių sugerties veiksnių. Netolygus kolonėlės užpildymas ir nenaudingi tūriai gali bloginti padėtį (2).

Aptikimas atliekamas, pvz., matuojant lūžio rodiklį arba UV-sugertį, ir gaunama paprasta pasiskirstymo kreivė. Tačiau norint kreivei priskirti tikrąsias molekulinės masės vertes, kolonėlę reikia kalibruoti, leidžiant per ją žinomos molekulinės masės polimerus ir geriausiai būtų apskritai panašios sandaros polimerus, pvz., įvairius polistireno etalonus. Vertikaliojoje ašyje žymint įvairios molekulinės masės išplautų dalelių kiekį, kuris reiškiamas mase, o horizontaliojoje ašyje – molekulinės masės logaritmą, paprastai gaunama Gauso kreivė, kartais iškreipta nedidele uodega mažos molekulinės masės pusėje.

▼C1

Pagal šią kreivę nustatomas mažos molekulinės masės medžiagų kiekis. Apskaičiavimas gali būti tikslus tik tuo atveju, jei mažos molekulinės masės dalelių atsakas yra ekvivalentiškas jų masės daliai polimere.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Eliuavimo tūrio pakartojamumas (variacijos koeficientas) turi būti geresnis nei 0,3 %. Jei vertinant skirtingu laiku darytą chromatogramą, ji neatitinka tik ką minėto kriterijaus, reikiamas analizės pakartojamumas turi būti užtikrintas atliekant korekciją vidiniu etalonu (1). Polidispersiškumas priklauso nuo etalonų molekulinės masės. Polistireno etalonų atveju tipiškos vertės yra tokios:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p yra etalono molekulinė masė, atitinkanti smailės viršūnę).

1.6. BANDYMŲO METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Etaloninių polistireno tirpalų ruošimas**

Polistireno etalonai ištirpinami juos kruopščiai sumaišant su pasirinktu eliuentu. Ruošiant tirpalus turi būti atsižvelgta į gamintojo rekomendacijas.

Pasirinktų etalonų koncentracijos priklauso nuo įvairių veiksnių, pvz., injekcijos tūrio, tirpalo klampumo ir analizinio detektoriaus jautrumo. Norint išvengti perkrovos, didžiausias injekcijos tūris turi būti pritaikytas kolonėlės ilgiui. Taikant GPC medžiagų atskyrimui analizėje, tipiški injekcijos tūriai 30 cm × 7,8 mm kolonėlei paprastai yra 40–100 µ1. Galima naudoti didesnį tūrį, tačiau jis neturi viršyti 250 µ1. Prieš pradedant tikrąjį kolonėlės kalibravimą, turi būti nustatytas optimalus santykis tarp injekcijos tūrio ir koncentracijos.

1.6.2. **Bandinio tirpalo ruošimas**

Iš esmės tie patys reikalavimai taikomi ruošiant bandinių tirpalus. Bandinys ištirpinamas tinkamame tirpiklyje, pvz., tetrahidrofurane, kruopščiai maišant. Jokiu būdu negalima tirpinti naudojant ultragarsinę vonią. Jei būtina, bandinio tirpalas gryninamas, filtruojant per membraninį filtrą, kurio porų dydis 0,2–2 µm.

Galutinėje ataskaitoje turi būti pažymėta, ar buvo neištirpusių dalelių, nes tai gali būti didelės molekulinės masės medžiagų dalelės. Ištirpusių dalelių procentinei masės daliai nustatyti turi būti taikomas tinkamas metodas. Tirpalai turi būti panaudoti per 24 valandas.

▼C1

1.6.3. **Pataisos atsižvelgiant į priemaišų ir priedų kiekį**

Paprastai būtina daryti medžiagų, kurių molekulinė masė M < 1 000, kiekio pataisas atsižvelgiant į esančių nepolimerinių medžiagų (pvz., priemaišų ir (arba) priedų) indėlį, išskyrus kai nustatytas kiekis ir taip jau < 1 %. Tai daroma polimero tirpalo arba GPC eliuato tiesioginės analizės būdu.

Tais atvejais, kai išėjusio iš kolonėlės eliuato koncentracija tolesnei analizei per maža, jis turi būti koncentruojamas. Gali prireikti eliuatą išgarinti iki sauso likučio ir vėl jį ištirpinti. Eliuato koncentravimas turi būti atliktas tokiomis sąlygomis, kurios užtikrintų, kad eliuatas išliks nepakitęs. Eliuato apdorojimas po GPC pakopos priklauso nuo kiekybiniam nustatymui taikomo metodo.

1.6.4. **Aparatūra**

GPC aparatą sudaro šios sudedamosios dalys:

— rezervuaras tirpikliui,

— dujų pašalinimo įtaisas (jei reikia),

— siurblys,

— pulsacijų slopintuvas (jei reikia),

— injekcijos sistema,

— chromatografinės kolonėlės,

— detektorius,

— debitmatis (jei reikia),

— duomenų rašiklis-procesorius,

— atliekų indas.

Turi būti užtikrinta, kad GPC sistema būtų inertiška naudojamiems tirpikliams (pvz., naudojant plieninius kapiliarus, jei tirpiklis tetrahidrofuranas).

1.6.5. **Įšvirkštimas ir tirpiklio tiekimo sistema**

Tam tikras bandinio tirpalo tūris griežtai nustatytoje zonoje įleidžiamas į kolonėlę, naudojant automatinį bandinio tiektuvą arba rankiniu būdu. Švirkšto stūmoklio per greitas ištraukimas arba spaudimas įleidžiant rankiniu būdu gali būti molekulinių masių stebimo pasiskirstymo pokyčių priežastimi. Kiek įmanoma, tirpiklio tiekimo sistema turi būti be pulsacijų, geriausiu atveju jai reikia pulsacijų slopintuvo. Srautas yra apie 1 ml/min.

1.6.6. **Kolonėlė**

Atsižvelgiant į bandinį, polimeras tiriamas naudojant vieną paprastą kolonėlę arba kelias nuosekliai sujungtas kolonėles. Prekyboje yra keletas kolonėlėms užpildyti naudojamų poringų medžiagų su apibrėžtomis savybėmis (pvz., porų dydžiu, ekskliudavimo ribomis). Atskyrimui naudojamo gelio arba kolonėlės aukščio pasirinkimas priklauso ir nuo bandinio savybių (hidrodinaminių tūrių, molekulinės masės pasiskirstymo) ir nuo specifinių atskyrimo sąlygų, pvz., tirpiklio, temperatūros ir srauto (1) (2) (3).

▼C1

1.6.7. **Teorinės lėkštelės**

Atskyrimui naudojama kolonėlė arba kolonėlių sistema turi būti apibūdinta teorinių lėkštelių skaičiumi. Tetrahidrofurano kaip eliuento atveju reikia į žinomo ilgio kolonėlę įleisti etilbenzeno arba kito tinkamo nepolinio tirpiklio tirpalą. Teorinių lėkštelių skaičius apskaičiuojamas pagal tokią lygtį:

$$N = 5{,}54\left(\frac{(V_e)}{(W_{1/2})}\right)^2 \qquad \text{arba} \qquad N = 16\left(\frac{(V_e)}{(W)}\right)^2$$

kurioje:

N = teorinių lėkštelių skaičius

V_e = smailės viršūnę atitinkantis eliuavimo tūris

W = smailės plotis pagrindo linijoje

$W_{1/2}$ = smailės plotis per smailės aukščio vidurį.

1.6.8. **Atskyrimo efektyvumas**

Be teorinių lėkštelių skaičiaus, kuris apsprendžia juostos plotį, tam tikrą vaidmenį vaidina atskyrimo efektyvumas, kurį apibūdina kalibracinės kreivės statumas. Kolonėlės atskyrimo efektyvumas nustatomas pagal tokią priklausomybę:

$$\left(\frac{((V_{e,M_x}) - (V_{e,(10M_x)}))}{\text{kolonėlės skerspjūvio plotas}}\right) \geq 6{,}0 \left[\frac{(cm^3)}{(cm^2)}\right]$$

kurioje:

$V_{e,Mx}$ = polistireno, turinčio molekulinę masę M_x, eliuavimo tūris

$V_{e,(10Mx)}$ = polistireno, turinčio 10 kartų didesnę molekulinę masę, eliuavimo tūris.

Sistemos atskiriamoji galia dažniausiai apibrėžiama taip:

$$R_{1,2} = 2 \times \left(\frac{(V_{e1} - V_{e2})}{(W_1 + W_2)}\right) \times \left(\frac{(1)}{(\log_{10}(M_2/M_1))}\right)$$

čia:

V_{e1}, V_{e2} = dviejų polistireno etalonų eliuavimo tūriai, atitinkantys smailės viršūnę,

W_1, W_2 = smailių pločiai pagrindo linijoje,

M_1, M_2 = molekulinės masės, atitinkančios smailių viršūnes (turi skirtis 10 kartų).

Kolonėlės sistemai R vertė turi būti didesnė kaip 1,7 (4).

▼C1

1.6.9. **Tirpikliai**

Visi tirpikliai turi būti labai gryni (tetrahidrofurano grynumas 99,5 %). Tirpiklio indas (jei reikia inertinių dujų atmosferoje) turi būti pakankamai didelis kolonėlei kalibruoti ir kelių bandinių analizei atlikti. Prieš tirpiklį tiekiant siurbliu į kolonėlę iš jo turi būti pašalintos dujos.

1.6.10. **Temperatūros reguliavimas**

Svarbių vidinių komponentų (injekcijos kilpos, kolonėlių, detektoriaus ir vamzdžių) temperatūra turi būti pastovi ir atitikti pasirinktą tirpiklį.

1.6.11. **Detektorius**

Detektoriaus paskirtis – kiekybiškai registruoti iš kolonėlės išplauto bandinio koncentraciją. Norint, kad smailės nebūtų labai plačios, detektoriaus kiuvetės tūris turi būti kuo mažesnis. Jis neturi būti didesnis kaip 10 μl, išskyrus šviesos sklaidos ir klampumo detektorius. Aptikimui paprastai naudojama diferencinė refraktometrija. Tačiau, jei to reikalauja bandinio specifinės savybės arba eliuavimo tirpiklis, gali būti naudojami kitų tipų detektoriai, pvz., UV/VIS, IR, klampumo detektoriai ir t. t.

2. **DUOMENYS IR ATASKAITA**

2.1. DUOMENYS

Išsamių vertinimo kriterijų, taip pat duomenų kaupimui ir apdorojimui keliamų reikalavimų reikia ieškoti DIN standarte (1).

Kiekvienam bandiniui turi būti atlikti du nepriklausomi bandymai. Bandiniai turi būti analizuojami atskirai. Visais atvejais taip pat yra svarbu apskaičiuoti tuščiųjų bandinių, apdorojamų vienodai su bandiniu, duomenis.

Būtina aiškiai nurodyti, kad išmatuotos vertės yra santykinės vertės, atitinkančios naudojamų etalonų molekulinę masę.

Po sulaikymo tūrio arba sulaikymo trukmės verčių (galbūt pataisytų naudojant vidinį etaloną) nustatymo vienam šių dydžių atidedamos log M_p vertės (M_p yra kalibravimo etalono smailės viršūnę atitinkanti vertė). Kiekvienai molekulinės masės dešimtainei skilčiai būtina turėti bent du kalibravimo taškus, o visai kalibracinei kreivei, kuri turi apimti įvertintą bandinio molekulinę masę, turi būti bent penki matavimų taškai. Mažą molekulinę masę atitinkantis kalibracinės kreivės galinis taškas nustatomas pagal n – heksilbenzeną arba kitokį tinkamą nepolinį tirpiklį. Kreivės dalis, atitinkanti mažesnę nei 1 000 molekulinę masę, apskaičiuojama ir prireikus pataisoma atsižvelgiant į priemaišas ir priedus. Eliuavimo kreivės paprastai vertinamos elektroninio duomenų apdorojimo būdu. Atliekant apskaičiavimus rankiniu būdu, galima pasižiūrėti į ASTM D 3536–91 (3).

▼C1

Jei kolonėlėje sulaikomas koks nors netirpus polimeras, jo molekulinė masė greičiausiai yra didesnė nei tirpiosios dalies, ir jei į jo kiekį neatsižvelgti, gaunamas mažos molekulinės masės medžiagų kiekio pervertinimas. Papildyme pateikiamos rekomendacijos, kaip daryti mažos molekulinės masės medžiagų kiekio pataisą atsižvelgiant į netirpų polimerą.

Pasiskirstymo kreivė turi būti pateikta lentelės pavidalu arba kaip grafikas (diferencinis dažnis arba bendrojo kiekio procentinės dalys pagal log M). Vaizduojant grafiškai viena molekulinės masės dešimtainė skiltis paprastai turi būti 4 cm pločio, o smailės viršūnės aukštis turi būti apie 8 cm. Integralinių pasiskirstymo kreivių atveju atstumas ordinatėje tarp taškų, atitinkančių 0 ir 100 %, turi būti apie 10 cm.

2.2. BANDYMO ATASKAITA

Bandymų ataskaitoje turi būti tokia informacija:

2.2.1. **Bandomoji medžiaga**

— turima informacija apie bandomąją medžiagą (tapatumas, priedai, priemaišos),

— bandinio apdorojimo aprašymas, pastebėjimai, problemos.

2.2.2. **Aparatūra**

— tirpiklio rezervuaras, inertinės dujos, dujų pašalinimas iš eliuento, eliuento sudėtis, priemaišos,

— siurblys, pulsacijų slopintuvas, injekcijos sistema,

— atskyrimo kolonėlės (gamintojas, visa informacija apie kolonėlių charakteristikas, pvz., porų dydis, atskyrimo medžiagos rūšis ir t. t., naudotų kolonėlių skaičius, ilgis ir jungimo tvarka),

— kolonėlės (arba jų rinkinio) teorinių lėkštelių skaičius, atskyrimo efektyvumas (sistemos atskyrimo galia),

— informacija apie smailių simetriją,

— kolonėlės temperatūra, temperatūros reguliavimo būdas,

— detektorius (matavimo principas, tipas, kiuvetės tūris),

— debitmatis, jei buvo naudotas (gamintojas, matavimo principas),

— duomenų registravimo ir apdorojimo sistema (aparatūra ir programinė įranga).

2.2.3. **Sistemos kalibravimas**

— kalibracinės kreivės gavimo metodo detalus aprašymas,

▼C1

— informacija apie šio metodo kokybės kriterijus (pvz., koreliacijos koeficientą, paklaidų kvadratų sumą ir t. t.),

— informacija apie visas ekstrapoliacijas, prielaidas ir aproksimacijas, darytas bandymo eigoje ir vertinant bei apdorojant duomenis,

— visi matavimai, naudoti kalibracinei kreivei gauti, turi būti dokumentuoti lentelėje, kurioje kiekvienam kalibravimo taškui būtų pateikta tokia informacija:

  — bandinio pavadinimas,

  — bandinio gamintojas,

  — etalonų būdingosios vertės M_p, M_n, M_w ir M_w/M_n, kokias pateikė gamintojas, arba gautos vėlesniuose matavimuose, kartu nurodant nustatymo metodo detales,

  — injekcijos tūris ir injekcijos koncentracija,

  — kalibravimui naudota M_p vertė,

  — išmatuotas eliuavimo tūris arba pataisyta sulaikymo trukmė, atitinkantys smailės viršūnę,

  — smailės viršūnę atitinkanti apskaičiuota M_p vertė,

  — apskaičiuotos ir kalibravimui naudotos M_p vertės procentinė paklaida.

2.2.4. **Informacija apie mažą molekulinę masę turinčio polimero kiekį**

— analizei taikytų metodų aprašymas ir bandymų atlikimo eiga,

— informacija apie mažos molekulinės masės medžiagų procentinę dalį (m/m), apskaičiuotą viso bandinio masei,

— informacija apie priemaišų, priedų ir kitų nepolimerinių medžiagų masės procentinę dalį, apskaičiuotą viso bandinio masei.

2.2.5. **Vertinimas:**

— vertinimas atsižvelgiant į laiką: visi metodai taikyti reikiamam pakartojamumui užtikrinti (pataisų darymo metodas, vidinis standartas ir t. t.),

— informacija apie tai, ar vertinimas buvo atliekamas pagal eliuavimo tūrį ar pagal sulaikymo trukmę,

— informacija apie vertinimo ribas, jei smailė nėra iki galo analizuota,

— lyginimo metodų aprašymas, jei jie buvo taikyti,

— bandinio ruošimo ir išankstinio apdorojimo metodikos,

— duomenys apie neištirpusias daleles, jei yra,

▼C1

— injekcijos tūris (μl) ir injekcijos koncentracija (mg/ml),

— stebėjimų duomenys, nurodantys veiksnius, kurie yra nukrypimų nuo teorinio GPC profilio priežastis,

— bandymo metodikose darytų visų pakeitimų detalus aprašymas,

— detalės apie paklaidų intervalus,

— bet kokia kita informacija ir stebėjimų duomenys, reikalingi duomenims interpretuoti.

3. **NUORODOS**

1) DIN 55672 (1995) Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds. (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

3) ASTM D 3536–91, (1991). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4) ASTM D 5296–92, (1992). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼C1

Priedėlis

Nurodymai, kaip daryti mažos molekulinės masės medžiagos kiekio pataisas dėl netirpaus polimero buvimo

Kai bandinyje yra netirpaus polimero, GPC analizės metu prarandama masė. Netirpus polimeras negrįžtamai sulaikomas kolonėlėje arba ant bandinio filtro, o tirpioji bandinio dalis praeina per kolonėlę. Jei galima įvertinti arba išmatuoti polimero lūžio rodiklio pokytį (dn/dc), tai galima įvertinti kolonėlėje prarastą masę. Tokiu atveju pataisa daroma naudojant išorinį kalibravimą žinomos koncentracijos etaloninėmis medžiagomis bei dn/dc refraktometro atsakui kalibruoti. Čia pateiktame pavyzdyje naudojamas polimetilmetakrilato (pMMA) etalonas.

Norint akrilo polimerų analizėje atlikti išorinį kalibravimą, GPC metodu analizuojamas žinomos koncentracijos pMMA tirpalas tetrahidrofurane ir gauti duomenys naudojami refraktometro konstantai nustatyti pagal lygtį:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc),$$

čia:

K = refraktometro konstanta (mikrovoltas iš sekundės mililitrui),

R = pMMA etalono atsakas (mikrovoltas iš sekundės),

C = pMMA etalono koncentracija (mg/ml),

V = injekcijos tūris (ml), ir

dn/dc = tetrahidrofurane ištirpinto pMMA lūžio rodiklio pokytis (ml/mg).

Tipiniai pMMA etalono duomenys:

R = 2937 891,

C = 1,07 mg/ml,

V = 0,1 ml,

dn/dc = $9 \times 10–5$ ml/mg.

Toliau gautoji K vertė $3,05 \times 10^{11}$ naudojama teoriškam detektoriaus atsakui apskaičiuoti, jei pro detektorių butų išplauta 100 % įšvirkšto polimero kiekio.

▼C1

A.19. POLIMERŲ TIRPUMAS VANDENYJE/EKSTRAHAVIMASIS IŠ VANDENS

1. METODAS

Aprašytas metodas yra OECD TG 120 (1997) pataisytos versijos kopija. Kita techninė informacija pateikta (1) nuorodoje.

1.1. ĮVADAS

Prieš taikant toliau išdėstytą metodą, kai kuriems polimerams, pvz., emulsiniams polimerams, gali būti reikalingi paruošiamieji darbai. Metodas netaikomas skystiesiems polimerams ir polimerams, kurie bandymo sąlygomis reaguoja su vandeniu.

Kai metodą taikyti netikslinga arba neįmanoma, polimerų tirpumas (ekstrahavimasis) gali būti tiriamas kitų metodų pagalba. Tokiais atvejais turi būti pateiktos visos metodo detalės ir pagrindimas.

1.2. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Polimerų tirpumas (ekstrahavimasis) vandeninėje terpėje nustatomas taikant kolbos metodą (žr. A.6 tirpumas vandenyje, kolbos metodas), kuriame daromi toliau aprašyti pakeitimai.

1.4. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.5. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.5.1. **Įranga**

Bandant šiuo metodu reikalinga tokia įranga:

— trupintuvas, pvz., malūnas žinomo dydžio dalelėms gauti,

— purtyklė, kurioje būtų galima reguliuoti temperatūrą,

— membraninių filtrų sistema,

— atitinkama analizinė įranga,

— standartizuoti sietai.

1.5.2. **Bandinio ruošimas**

Reprezentatyvus bandinys iš pradžių turi būti susmulkintas iki 0,125–0,25 mm dydžio dalelių, naudojant atitinkamus sietus. Bandinio patvarumui užtikrinti arba malimo procese gali būti reikalingas aušinimas. Medžiagos gumos pagrindu gali būti trupinamos skystojo azoto temperatūroje (1).

Jei reikiamo dydžio dalelių frakcijos gauti negalima, turi būti imtasi veiksmų dalelių dydžiui kiek įmanoma sumažinti, o rezultatas turi būti pateiktas ataskaitoje. Ataskaitoje būtina nurodyti būdą, kaip sutrupintas bandinys buvo laikomas prieš bandymą.

▼C1

1.5.3. **Bandymo eiga**

Į tris indus su stikliniais kamščiais atskirai pasveriami trys bandomosios medžiagos 10 g masės bandiniai ir į kiekvieną indą įpilama 1 000 ml vandens. Jei pasirodo, kad 10 g polimero apdoroti nėra galimybės, turi būti naudojamas kitas gretimas didžiausias kiekis, kurį galima apdoroti, o vandens tūris atitinkamai keičiamas.

Indai gerai užkemšami ir purtomi 20 °C temperatūroje. Turi būti naudojamas purtymo arba maišymo įtaisas, galintis veikti pastovioje temperatūroje. Po 24 valandų kiekvieno indo turinys centrifuguojamas arba filtruojamas ir atitinkamu analizės metodu skaidrioje vandeninėje fazėje nustatoma polimero koncentracija. Jei tinkamų metodų analizuoti vandeninėje terpėje nėra, bendrasis tirpumas (ekstrahavimasis) gali būti nustatytas pagal sauso likučio ant filtro arba sausų centrifugavimo nuosėdų masę.

Paprastai būtina kiekybiškai atskirti priemaišas ir priedus nuo mažos molekulinės masės medžiagų. Gravimetrinio nustatymo atveju, norint atsižvelgti į likučius, atsirandančius dėl bandymo metodikos taikymo, svarbu atlikti tuščiąjį bandymą be bandomosios medžiagos.

Polimerų tirpumas (ekstrahavimasis) vandenyje 37 °C temperatūroje ir esant pH 2 bei pH 9 gali būti nustatytas tokiu pat būdu, kuris aprašytas atliekant bandymą 20 °C temperatūroje. pH vertė gali būti reguliuojama pridedant tinkamo buferinio tirpalo arba tinkamų rūgščių ar šarmų, pvz., druskos rūgšties, acto rūgšties, analiziškai gryno natrio ar kalio hidroksido, arba NH_3.

Atsižvelgiant į taikomą analizės metodą turi būti atliekami vienas arba du bandymai. Kai yra specifiniai tiesioginės polimerų komponentų analizės vandeninėje terpėje metodai, turėtų pakakti vieno anksčiau aprašyto bandymo. Tačiau kai tokių metodų nėra, o polimero tirpumo (ekstrahavimosi) nustatymas apribotas tik netiesiogine analize, vandeniniame ekstrakte nustatant tik bendrosios organinės anglies kiekį (BOA), turi būti atliktas papildomas bandymas. Be to, šis papildomas bandymas turi būti atliekamas tris kartus, naudojant 10 kartų mažesnius polimero bandinius ir tuos pačius vandens kiekius, kurie buvo naudojami pirmajame bandyme.

1.5.4. **Analizė**

1.5.4.1. *Vieno dydžio bandinio analizė*

Gali būti naudojami tiesioginės polimero komponentų analizės vandeninėje terpėje metodai. Kaip alternatyvą galima būtų svarstyti galimybę netiesiogiai analizuoti ištirpintų/ekstrahuotų polimerų komponentus, nustatant bendrąjį tirpiųjų dalių kiekį ir darant pataisas dėl polimerams nebūdingų komponentų buvimo.

Analizė vandeninėje fazėje visų polimerinių medžiagų bendrajam kiekiui nustatyti galima:

jei taikomas pakankamai jautrus metodas, pvz.:

— BOA nustatymas, taikant šlapią suardymą persulfatu arba dichromatu CO_2 gauti, kurio kiekis įvertinamas IR arba cheminės analizės metodu,

▼C1

— atominė absorbcinė analizė (AAS) arba jos induktyviai sužadintos plazmos (ICP) emisijos atitikmuo silicio arba metalų turintiems polimerams nustatyti,

— UV absorbcija arba spektrofluorimetrija polimerams su vienvalente aromatine grupe,

— LC-MS (skysčių chromatografija – masių spektroskopija) mažos molekulinės masės bandiniams,

arba atliekamas vandeninio ekstrakto garinimas vakuume iki sauso likučio ir jo spektrinė analizė (IR, UV ir t. t.) arba likučio AAS (ICP) analizė.

Jei pačios vandeninės fazės analizė neįmanoma, vandeninis ekstraktas turi būti ekstrahuojamas organiniu tirpikliu, kuris nesimaišo su vandeniu, pvz., chlorintuoju angliavandeniliu. Tirpiklis vėliau išgarinamas, o likutis analizuojamas, kaip anksčiau nurodyta, polimero kiekiui nustatyti. Visų šio likučio komponentų, kurie identifikuojami kaip priemaišos arba priedai, kiekis turi būti atimtas, kad būtų galima nustatyti paties polimero tirpumo (ekstrahavimosi) laipsnį.

Kai tokių medžiagų kiekis yra gana didelis, likutį gali tekti analizuoti, pvz., HPLC (didelio efektyvumo skysčių chromatografijos) arba GPC (gelchromatografijos) metodais, kurių pagalba priemaišos būtų atskirtos nuo monomero ir jo darinių, kad būtų galima nustatyti tikrąjį pastarųjų medžiagų kiekį.

Kai kuriais atvejais gal būt pakaktų tiesiog išgarinti organinį tirpiklį iki sauso likučio ir jį pasverti.

1.5.4.2. *Bandymas su dviem skirtingo dydžio bandiniais*

Visuose vandeniniuose ekstraktuose atliekama BOA analizė.

Neištirpusi bandinio dalis (likutis po ekstrahavimo) analizuojama gravimetriškai. Jei po kiekvieno indo turinio centrifugavimo arba filtravimo, polimero likučiai lieka ant indo sienelių, indas turi būti skalaujamas filtratu tol, kol inde nelieka jokių matomų likučių. Toliau filtratas vėl centrifuguojamas arba filtruojamas. Ant filtro arba centrifugavimo mėgintuvėlyje esantis likutis džiovinamas vakuume 40 °C temperatūroje ir sveriamas. Džiovinama tol, kol gaunama pastovi masė.

2. **DUOMENYS**

2.1. BANDYMAS, ATLIKTAS NAUDOJANT VIENO DYDŽIO BANDINĮ

Turi būti pateikti kiekvienai iš trijų kolbų gauti atskiri rezultatai ir jų vidutinės vertės, išreiškiant masės vienetais tirpalo tūriui (paprastai mg/l) arba masės vienetais polimero masei (paprastai mg/g). Taip pat papildomai turi būti pateiktas bandinio masės nuostolis (apskaičiuotas tirpinio masę dalinant iš pradinio bandinio masės). Turi būti apskaičiuoti variacijos koeficientai. Atskiri skaičiai turi būti pateikti visai medžiagai (polimeras + pagrindiniai priedai ir t. t.) ir tik polimerui (t. y. atimant tokių priedų indėlį).

▼C1

2.2. BANDYMAS, ATLIKTAS NAUDOJANT DU SKIRTINGO DYDŽIO BANDINIUS

Turi būti pateiktos atskiros BOA kiekio vandeniniuose ekstraktuose vertės, gautos dviejuose trigubuose bandymuose, ir kiekvieno bandymo vidutinė vertė, išreiškiant masės vienetais tirpalo tūriui (paprasta mgC/l), taip pat masės vienetais pradinio bandinio masei (paprastai mgC/g).

Jei tarp rezultatų, gautų dideliam ir mažam bandinio masės bei vandens santykiui, skirtumo nėra, tai galėtų rodyti, kad visi ekstrahuojami komponentai buvo iš tikrųjų ekstrahuoti. Tokiu atveju, tiesioginė analizė paprastai nebūtina.

Turi būti pateiktos likučių atskiros masės ir išreikštos pradinės bandinio masės procentais. Turi būti apskaičiuojamos bandyme gautos vidutinės vertės. Skirtumas tarp 100 ir nustatyto procentinio kiekio rodo tirpios ir ekstrahuojamos medžiagos procentinį kiekį pradiniame bandinyje.

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti tokia informacija:

3.1.1. **Bandomoji medžiaga**

— turima informacija apie bandomąją medžiaga (tapatumas, priedai, priemaišos, mažos molekulinės masės medžiagų kiekis).

3.1.2. **Bandymų sąlygos**

— naudotų metodikų ir bandymų sąlygų aprašymas,

— analizės ir aptikimo metodų aprašymas.

3.1.3. **Rezultatai**

— tirpumo/ekstrahuojamumo rezultatai, mg/1; atskiros ir vidutinės vertės ekstrahavimo bandymuose įvairiuose tirpaluose, suardyto polimero kiekis ir priemaišos, priedai ir t. t.,

— tirpumo/ekstrahuojamumo rezultatai mg/g polimero,

— vandeninių ekstraktų BOA vertės, tirpalo masė ir apskaičiuotas kiekis procentais, jei matuotas,

— kiekvieno bandinio pH,

— informacija apie tuščiajame bandyme gautas vertes,

— jei būtina, nuorodos į bandymo medžiagos nepatvarumą bandymo ir analizės eigoje,

— visa informacija, kuri yra svarbi interpretuojant rezultatus.

4. **NUORODOS**

1) DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.

▼C1

A.20. **OKSIDACINĖS SAVYBĖS (SKYSČIAI)**

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Šis bandymų metodas skirtas matuoti skystosios medžiagos gebą padidinti degiosios medžiagos degimo greitį arba degimo intensyvumą arba sudaryti mišinį su degiąja medžiaga, kuris užsidega savaime, kai dvi medžiagos sumaišomos kartu. Jis yra pagrįstas JT bandymu, taikomu oksiduojamiesiems skysčiams (1), ir jį atitinka. Tačiau, kadangi šis A.21 metodas visų pirma rengiamas siekiant atitikti Direktyvos 67/548 reikalavimus, reikia lyginti tik su viena etalonine medžiaga. Bandymas ir lyginimas su papildomomis etaloninėmis medžiagomis gali būti reikalingas, kai bandymų rezultatus numatoma naudoti kitais tikslais ([1]).

Šio bandymo daryti nereikia, kai tiriant struktūrinę formulę neabejotinai nustatoma, kad medžiaga negali egzotermiškai reaguoti su degiąja medžiaga.

Prieš darant šį bandymą naudinga turėti išankstinės informacijos apie visas galimas medžiagos sprogiąsias savybes.

Šis bandymas netaikomas kietosioms medžiagoms, dujoms, sprogiosioms ar labai degioms medžiagoms arba organiniams peroksidams.

Šio bandymo galima nedaryti, jei bandomosios medžiagos rezultatai jau yra gauti darant JT oksiduojamųjų skysčių bandymą.

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Vidutinė slėgio didėjimo trukmė – išmatuoto bandomojo mišinio slėgio didėjimo, palyginti su atmosferos slėgiu, nuo 690 kPa iki 2 070 kPa trukmės verčių vidurkis.

1.3. ETALONINĖ MEDŽIAGA

Kaip etaloninė medžiaga naudojamas 65 % (m/m) vandeninis azoto rūgšties (analiziškai grynos) tirpalas ([2]).

([1]) Pvz., JT transporto reglamentų kontekste.

([2]) Prieš bandymus rūgštis turėtų būti titruojama jos koncentracijai patvirtinti.

▼C1

Be to, jei bandytojas numato, kad šio bandymo rezultatai gali būti naudojami kitais tikslais ([1]), pasirinktinai gali būti tikslinga naudoti papildomas etalonines medžiagas ([2]).

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandomasis skystis maišomas masių santykiu 1:1 su pluoštine celiuliioze ir mišinys dedamas į slėginį indą. Jei maišant arba dedant įvyksta savaiminis užsidegimas, toliau bandymo daryti nereikia.

Jei mišinys savaime neužsidega, atliekamas visas bandymas. Mišinys kaitinamas slėgio inde ir nustatomas vidutinis laikas, per kurį slėgis, palyginti su atmosferos slėgiu, padidėja nuo 690 kPa iki 2 070 kPa. Šis padidėjęs slėgis lyginamas su vidutine etaloninės (-ių) medžiagos (-ų) ir celiuliozės santykio 1:1 mišinio slėgio didėjimo trukme.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Darant penkis vienos medžiagos bandymus, aritmetinis vidurkis ir atskiri rezultatai turi skirtis ne daugiau kaip 30 %. Rezultatai, kurie palyginti su vidurkiu skiriasi daugiau kaip 30 %, turi būti atmesti, maišymo ir pripildymo metodika patobulinta ir bandymas pakartotas.

1.6. METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Pasiruošimas**

1.6.1.1. *Degioji medžiaga*

Kaip degioji medžiaga naudojama sausa pluoštinė celiuliozė, kurios plaušelių ilgis 50–250 μm, o vidutinis skersmuo – 25 μm ([3]). Ne didesnio kaip 25 mm storio celiuliozės sluoksnis 4 h džiovinamas iki pastoviosios masės esant 105 °C ir aušinamas bei prieš bandymą laikomas desikatoriuje su džiovikliu. Vandens kiekis išdžiovintoje celiuliozėje turi būti mažesnis kaip 0,5 % sausos medžiagos masės ([4]). Prireikus džiovinimo trukmė turi būti padidinta tokiam drėgmės kiekiui pasiekti ([5]). Viso bandymo metu turi būti naudojama ta pati celiuliozės siunta.

([1]) Pvz., JT transporto reglamentų kontekste.
([2]) Pvz.: 1 nuorodoje naudojama 50 % (m/m) perchlorato rūgštis ir 40 % (m/m) natrio chloratas.
([3]) Pvz., Whatman Column Chromatographic Cellulose Powder CF 11, katalogo Nr. 4021 050.
([4]) Patvirtinama, pvz., titruojant Karlo Fišerio metodu.
([5]) Be to, tokį drėgmės kiekį galima pasiekti kitu metodu, pvz., 24 h kaitinant vakuume esant 105 °C.

▼C1

1.6.1.2. *Aparatūra*

1.6.1.2.1. Slėginis indas

Būtina turėti slėginį indą. Slėginį indą sudaro 89 mm ilgio ir 60 mm išorinio skersmens plieninis cilindras (žr. 1 paveikslą). Staklėmis gaminamos dvi plokštelės priešingiems cilindro galams (sumažinančios skerspjūvį iki 50 mm), kurios padėtų įtvirtinti cilindrą, įstatant uždegimo žvakę ir ventiliavimo angos aklidangtį. Indas su 20 mm skersmens anga iš abiejų galų viduje platinamas iki 19 mm gylio ir sriegiamas 1 „Britų standarto vamzdinis sriegis arba jo metrinis atitikmuo. Slėgio mažinimo atvamzdis įsriegiamas į kreivąjį slėginio indo paviršių 35 mm nuo vieno galo ir 90° kampu ištekintoms plokštelėms. Gręžiama 12 mm gylio anga, kurioje daromas sriegis įsukti atvamzdžiui, turinčiam 1/2“ Britų standarto vamzdinį (arba jo metrinio atitikmens) sriegį. Prireikus įstatomas inertinės medžiagos sandariklis hermetiškumui užtikrinti. Atvamzdžio ilgis, matuojant nuo slėginio indo korpuso, lygus 55 mm, jame išgręžiama 6 mm skersmens anga. Atvamzdžio galas platinamas ir įsriegiamas diafragminio tipo slėgio keitliui įsukti. Galima naudoti bet kurį slėgio matavimo įtaisą, kurio neveiktų karštos dujos arba skilimo produktai ir kuris galėtų matuoti slėgio didėjimo greitį nuo 690 iki 2 070 kPa ne ilgiau kaip per 5 ms.

Į tolesnį nuo atvamzdžio slėginio indo galą įsukama uždegimo žvakė, turinti du elektrodus, vieną izoliuotą nuo korpuso, o kitą įžemintą žvakės korpuse. Į kitą slėginio indo galą įstatoma trūkioji membrana (trūkimo slėgis maždaug 2 200 kPa), kurią laiko kamštis su 20 mm anga. Prireikus uždegimo žvakė sandarinama inertinės medžiagos sandarikliu hermetiškumui užtikrinti. Visą sąranka tvirtinama laikančiajame stove naudojimui tinkamame aukštyje (2 paveikslas). Stovą paprastai sudaro mažaanglio plieno pagrindo plokštė, kurios matmenys yra 235 mm × 184 mm × 6 mm, ir 185 mm ilgio kvadratinė tuščiavidurė sekcija, kurios matmenys – 70 mm × 70 mm × 4 mm.

Vienas kvadratinės tuščiavidurės sekcijos galas nupjaunamas iš abiejų priešingų šonų dviem plokščiabriaunėms 86 mm ilgio kojoms gauti. Šių plokščiųjų šonų galai nupjaunami 60° kampu ir privirinami prie pagrindo plokštės. Viename viršutinio galo šone išpjaunama 22 mm pločio ir 46 mm gylio anga, į kurią įsistato slėginio indo atvamzdis, kai visa slėginio indo sąranka uždegimo žvake žemyn nuleidžiama į laikantįjį stovą. Prie žemesnės tuščiavidurės sekcijos sienos iš vidaus privirinamas 30 mm pločio ir 6 mm storio plieninis fiksatorius. Priešingoje sienoje įsriegiamos angos dviem 7 mm ilgio sparnuotosioms veržlėms, kurios neleistų slėginiam indui judėti. Slėginiam indui laikyti iš apačios prie šoninių sienų privirinamos dvi 12 mm pločio ir 6 mm storio plieninės juostos, įremtos į tuščiavidurės sekcijos pagrindą.

▼C1

1.6.1.2.2. Uždegimo sistema

Uždegimo sistemą sudaro 25 cm ilgio ir 0,6 mm skersmens Ni/Cr viela, kurios savitoji varža yra 3,85 Ω/m. Viela susukama į apviją naudojant 5 mm skersmens strypą ir tvirtinama prie uždegimo žvakės elektrodų. Apvijos konfigūracija turi atitikti vieną iš pavaizduotų 3 paveiksle. Atstumas nuo slėginio indo dugno iki apatinės uždegimo apvijos pusės turi būti 20 mm. Jei elektrodų ilgis nereguliuojamas, uždegimo vielos galai nuo apvijos iki slėginio indo dugno turi būti izoliuoti keraminiu apvalkalu. Viela kaitinama naudojant stabilizuotos įtampos srovės šaltinį, kuris galėtų tiekti mažiausiai 10 A stiprumo srovę.

1.6.2. **Bandymo eiga** ([1])

Aparatas su slėgio keitliu ir kaitinimo sistema, bet be trūkiosios membranos, tvirtinamas stove uždegimo žvake žemyn. Cheminėje stiklinėje stikline lazdele ([2]) sumaišoma 2,5 g bandomojo skysčio ir 2,5 g išdžiovintos celiuliozės. Saugai užtikrinti, maišant tarp operatoriaus ir mišinio turi būti saugos skydas. Jei mišinys užsidega maišant arba pilant į indą, toliau bandyti nereikia. Mišinį reikia dėti į slėginį indą mažomis dalimis tapšnojant ir užtikrinti, kad jis būtų dedamas apie uždegimo apviją ir gerai su ja liestųsi. Svarbu kad dedant mišinį apvija nebūtų deformuota, kadangi dėl to gali būti gauti klaidingi rezultatai ([3]). Trūkioji membrana dedama į vietą ir gerai užsukamas tvirtinimo kamštis. Indas su įkrova trūkiąja membrana į viršų įstatomas į laikantįjį stovą, kuris turi būti statomas tinkamoje šarvuotoje traukos spintoje arba deginimo kameroje. Prie uždegimo žvakės kontaktų jungiamas maitinimo šaltinis ir įjungiama 10 A srovė. Laikas nuo maišymo pradžios iki maitinimo įjungimo turi būti ne didesnis kaip 10 min.

Slėgio keitliu gautas signalas užrašomas tinkama sistema, kuri leistų gauti nepertraukiamą slėgio kitimo laike kreivę ir kartu ją analizuoti (pvz., pereinamųjų vyksmų sąvirašis, sujungtas su diagramų sąvirašiu). Mišinys kaitinamas tol, kol plyšta trūkioji membrana, arba bent 60 s. Jei trūkioji membrana neplyšta, mišinys paliekamas aušti prieš tai jį atsargiai atidarant, imantis atsargumo priemonių, jei slėginiame inde dar būtų per didelis slėgis. Medžiaga ir kiekviena etaloninė medžiaga bandoma penkis kartus. Užrašomas laikas, per kurį slėgis padidėja nuo 690 kPa iki 2 070 kPa virš atmosferos slėgio. Apskaičiuojama vidutinė slėgio didėjimo trukmė.

Kartais medžiagos gali sukelti slėgio didėjimą (per didelį arba per mažą), kurio priežastis cheminės reakcijos, neapibūdinančios medžiagos oksiduojamųjų savybių. Tokiais atvejais norint nustatyti reakcijos tipą, bandymą gali tekti kartoti, vietoj celiuliozės naudojant inertinę medžiagą, pvz., diatomitą.

([1]) Oksidatoriaus ir celiuliozės mišiniai turi būti laikomi potencialiai sprogiais mišiniais, todėl su jais reikia elgtis atsargiai.

([2]) Praktiškai tai galima padaryti ruošiant didesnį nei bandymui reikia bandomojo skysčio ir celiuliozės 1:1 mišinio kiekį ir supilant 5 ± 0,1 g į slėginį indą. Kiekvienam bandymui ruošiamas naujas mišinys.

([3]) Visų pirma turi būti išvengta gretimų apvijos vijų sąlyčio.

▼C1

2. **DUOMENYS**

Bandomosios medžiagos ir etaloninės (-ių) medžiagos (-ų) slėgio didėjimo trukmės vertės. Bandymų su inertine medžiaga slėgio didėjimo trukmės vertės, jei tokie bandymai daromi.

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Apskaičiuojamos bandomosios medžiagos ir etaloninės (-ių) medžiagos (-ų) vidutinės slėgio didėjimo trukmės vertės.

Apskaičiuojama bandymų su inertine medžiaga slėgio didėjimo trukmės vertė, jei tokie bandymai daromi.

Kai kurie rezultatų pavyzdžiai pateikti 1 lentelėje

1 lentelė

Rezultatų pavyzdžiai [a]

Medžiaga [b]	1:1 mišinio su celiuliozė vidutinė slėgio didėjimo trukmė (ms)
Amonio dichromatas, sotusis vandeninis tirpalas	20 800
Kalcio nitratas, sotusis vandeninis tirpalas	6 700
Geležies (III) nitratas, sotusis vandeninis tirpalas	4 133
Ličio perchloratas, sotusis vandeninis tirpalas	1 686
Magnio perchloratas, sotusis vandeninis tirpalas	777
Nikelio nitratas, sotusis vandeninis tirpalas	6 250
Azoto rūgštis, 65 %	4 767 [c]
Perchlorato rūgštis, 50 %	121 [c]
Perchlorato rūgštis, 55 %	59
Kalio nitratas, 30 % vandeninis tirpalas	26 690
Sidabro nitratas, sotusis vandeninis tirpalas	[d]
Natrio chloratas, 40 % vandeninis tirpalas	2 555 [c]
Natrio nitratas, 45 % vandeninis tirpalas	4 133
Inertinė medžiaga	
Vanduo: celiuliozė	[d]

[a] Žr. 1 nuorodą dėl klasifikavimo pagal JT transportavimo schemą.
[b] Sotieji tirpalai turi būti ruošiami esant 20 °C.
[c] Vidutinė vertė, gauta darant tarplaboratorinius lyginamuosius tyrimus.
[d] Didžiausias 2 070 kPa slėgis nebuvo pasiektas.

▼C1

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymų ataskaitoje pateikiama ši informacija:

— bandomosios medžiagos tapatumas, sudėtis, grynumas ir kitos savybės,

— bandomosios medžiagos koncentracija,

— naudojamos celiuliozės džiovinimo metodika,

— drėgmės kiekis naudojamoje celiuliozėje,

— matavimų rezultatai,

— inertinės medžiagos bandymų rezultatai, jei yra,

— apskaičiuotosios vidutinės slėgio didėjimo trukmės vertės,

— visi nukrypimai nuo šio metodo ir jų pagrįstumas,

— visa papildoma informacija arba pastabos rezultatams interpretuoti.

3.2. REZULTATŲ AIŠKINIMAS ([1])

Bandymų rezultatai įvertinti:

a) pagal tai, ar bandomosios medžiagos ir celiuliozės mišinys užsidega savaime; ir

b) lyginant medžiagos ir etaloninės (-ių) medžiagos (-ų) vidutinę slėgio didėjimo nuo 690 kPa iki 2 070 kPa trukmę.

Skystoji medžiaga turi būti laikoma oksidatoriumi, kai:

a) medžiagos ir celiuliozės santykio 1:1 mišinys, masės dalimis, užsidega savaime; arba

b) medžiagos ir celiuliozės santykio 1:1 mišinio, masės dalimis, vidutinė slėgio didėjimo trukmė yra mažesnė arba lygi 65 % (m/m) vandeninio azoto rūgšties tirpalo ir celiuliozės santykio 1:1 mišinio, masės dalimis, vidutinei slėgio didėjimo trukmei.

Siekiant išvengti klaidingų teigiamų rezultatų, interpretuojant juos reikėtų atsižvelgti į rezultatus, gautus bandant medžiagą su inertine medžiaga.

([1]) Žr. 1 nuorodą dėl rezultatų pagal JT transportavimo reglamentus interpretavimo, kai naudojamos kelios etaloninės medžiagos.

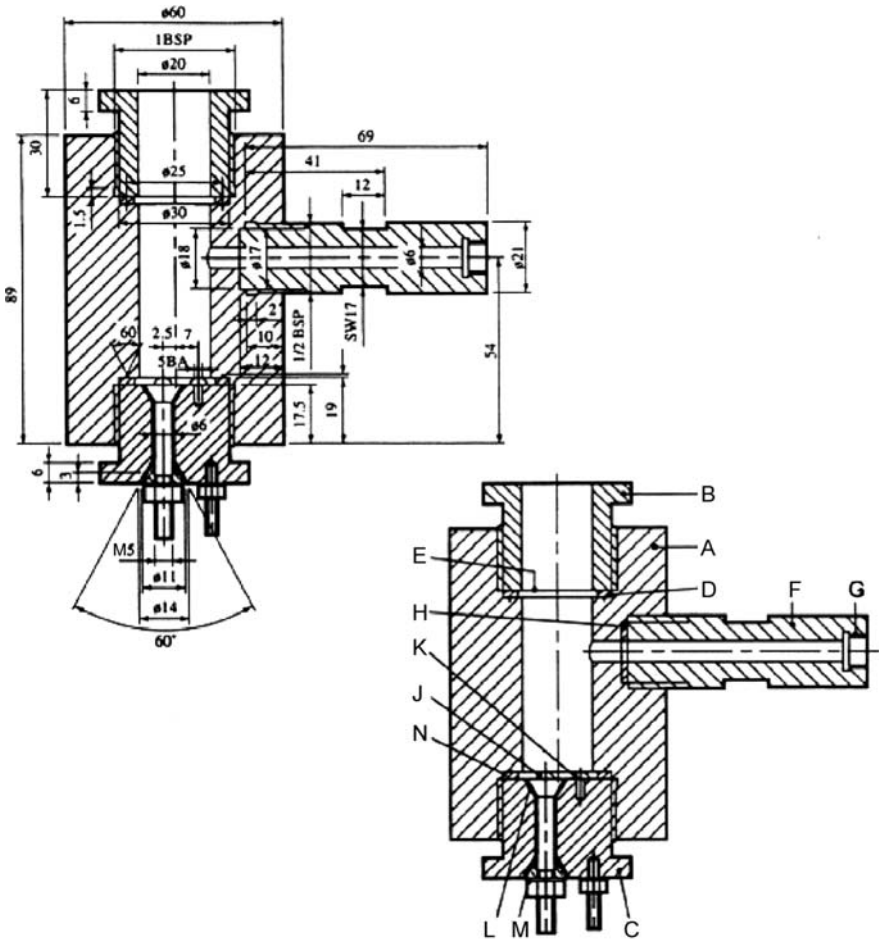
▼C1

4. **NUORODOS**

Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, page 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

1 paveikslas

Slėginis indas



(A) Slėginio indo korpusas

(B) Trūkiosios membranos tvirtinimo kamštis

(C) Uždegimo žvakė

(D) Minkštas švininis tarpiklis

(E) Trūkioji membrana

(F) Atvamzdis

(G) Slėgio keitlio galvutė

(H) Tarpiklis

(J) Izoliuotas elektrodas

(K) Įžemintas elektrodas

(L) Izoliacija

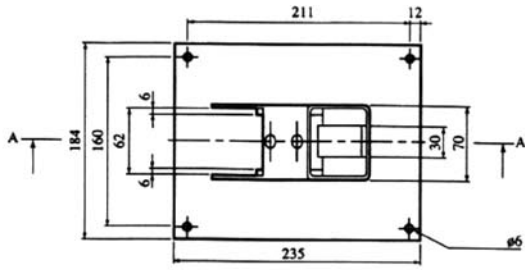
(M) Plieninis kūgis

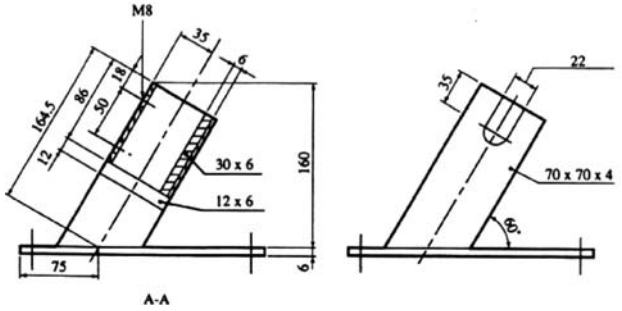
(N) Tarpiklio deformavimo griovelis

▼C1

2 paveikslas

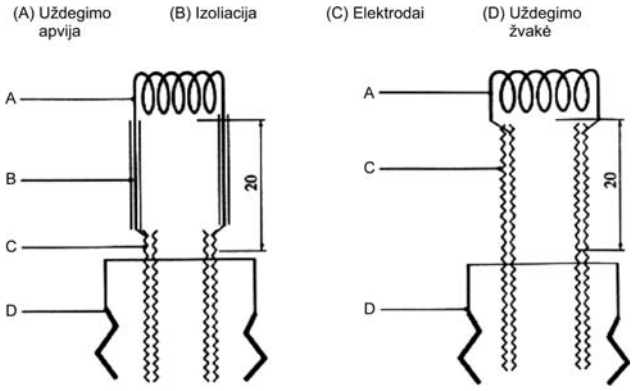
Laikantysis stovas





3 paveikslas

Uždegimo sistema



Pastaba: galima naudoti bet kurią iš šių schemų.

▼M1

A.22. PLAUŠELIŲ SKERSMENS ILGIO SVORINIS GEOMETRINIS VIDURKIS

1. METODAS

1.1. ĮVADAS

Šiame metode aprašyta biriųjų dirbtinių mineralinių plaušelių (MMMF) skersmens ilgio svorinio geometrinio vidurkio (*Length Weighted Geometric Mean Diameter* – LWGMD) matavimo metodika. Kadangi LWGMD generalinės aibės vertės turės 95 % tikimybę būti tarp imties 95 % pasikliovimo lygmenų (LWGMD ± dviguba standartinės paklaidos vertė), ataskaitoje pateikta vertė (bandymo vertė) bus imties apatinio 95 % pasikliovimo rėžio vertė (t.y. LWGMD – dviguba standartinės paklaidos vertė). Metodas pagrįstas atnaujintu (1994 m. birželis) Saugos ir sveikatos agentūros (HSE) pramonei skirtos metodikos projektu, kuris buvo suderintas ECFIA ir HSE pasitarime Chesteryje 1993 m. rugsėjo 26 d. ir kuris buvo parengtas pagal antrąjį tarplaboratorinį tyrimą bei jam yra skirtas (1, 2). Šis matavimo metodas gali būti taikomas MMMF turinčių biriųjų medžiagų arba produktų plaušelių skersmeniui apibūdinti, įskaitant ugniai atsparios keramikos pluoštus (RCF), dirbtinius stiklo pluoštus (MMVF), kristalinius ir polikristalinius pluoštus.

Ilgio svorinis skaičiavimas yra būdas kompensuoti skersmens pasiskirstymą dėl ilgų plaušelių trūkinėjimo, imant medžiagos ėminius arba ją tvarkant. MMMF skersmens verčių pasiskirstymui matuoti naudojama geometrinė statistika (geometrinis vidurkis), kadangi šių skersmens verčių pasiskirstymui aproksimuoti naudojamas lognormalusis skirstinys.

Ilgio ir skersmens matavimas yra varginantis ir daug laiko užimantis procesas, tačiau jei būtų matuojami tik tie plaušeliai, kurie liečia be galo ploną liniją rastrinio elektroninio mikroskopo (SEM) regos lauke, tikimybė pasirinkti tam tikrą plaušelį proporcinga jo ilgiui. Kadangi taip atsižvelgiama į ilgį darant ilgio svorinius apskaičiavimus, vienintelis reikalingas matmuo yra skersmuo ir LWGMD – 2SE galima apskaičiuoti aprašytu būdu.

1.2. APIBRĖŽTYS

Dalelė: objektas, kurio ilgio ir pločio santykis yra mažesnis kaip 3:1.

Plaušelis: objektas, kurio ilgio ir pločio santykis (matmenų santykis) yra ne mažesnis kaip 3:1.

1.3. TAIKYMO SRITIS IR APRIBOJIMAI

Metodas skirtas tirti skersmens verčių pasiskirstymą, kai vidutinis medianinis skersmuo yra nuo 0,5 μm iki 6 μm. Galima matuoti didesnes skersmens vertes, jeigu būtų naudojamas mažesnis SEM didinimas, tačiau mažesnio skersmens plaušelių skirstiniams vis labiau pasireikštų metodo apribojimai, todėl rekomenduojama naudoti matavimus TEM (elektroniniu peršvietimo mikroskopu), jei skersmens medianinė vertė yra mažesnė kaip 0,5 μm.

▼M1

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Imamas tam tikras kiekis tipinių pluoštinių audinių arba supiltų biriųjų plaušelių kerno ėminių. Biriųjų plaušelių ilgis mažinamas juos sutrupinant būdu, ir gautas tipinis antrinis ėminys disperguojamas vandenyje. Alikvotinės dalys ekstrahuojamos ir filtruojamos per 0,2 μm akutes turintį polikarbonatinį filtrą ir ruošiamos tirti rastrinio elektroninio mikroskopo (SEM) metodais. Plaušelių skersmuo matuojamas esant ×10 000 arba didesniam ekrano didinimui ([1]), taikant linijų susikirtimo metodą nepaslinktajai skersmens medianinei vertei gauti. Apskaičiuojamas apatinis 95 % pasikliovimo intervalas (pagal vienpusį kriterijų) medžiagos plaušelių skersmens geometrinio vidurkio mažiausiai vertei gauti.

1.5. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.5.1. **Saugos įspėjimai**

Turi būti kiek įmanoma sumažintas ore esančių plaušelių poveikis žmonėms, o su sausais plaušeliais turi būti dirbama tik traukos spintoje arba apsauginėje kameroje su pirštinėmis. Turi būti vykdomas periodinis personalo veikimo monitoringas kontrolės metodų efektyvumui tikrinti. Dirbant su MMMF būtina mūvėti vienkartines pirštines, kad mažiau būtų dirginama oda ir būtų išvengta kryžminio užteršimo.

1.5.2. **Aparatūra/įranga**

— Presai ir presformos (kuriose galima gauti 10 MPa);

— 0,2 μm akučių kapiliarinių akučių filtrai iš polikarbonato (25 mm skersmens);

— 5 μm akučių membraninis filtras iš celiuliozės esterių, naudojamas kaip atraminis filtras;

— stiklinis filtravimo aparatas (arba vienkartinės filtravimo sistemos), pritaikytas 25 mm skersmens filtrams (pvz., *Millipore* stiklinis mikroanalizės rinkinys, tipas Nr. XX10 025 00);

— šviežiai distiliuotas vanduo, filtruotas per 0,2 μm akučių filtrą mikroorganizmams pašalinti;

— dulkinamojo dengimo įrenginys su aukso arba aukso/paladžio taikiniu;

— rastrinis elektroninis mikroskopas, kurio skyra būtų iki 10 nm ir turėtų ×10 000 didinimą;

— įvairios priemonės: mentelės, 24 tipo skalpelis, pincetas, SEM mėgintuvėliai, grafitiniai klijai arba grafitinė lipnioji juosta, sidabriniai klijai;

— ultragarsinis zondas arba stalinė ultragarsinė vonia;

— kerno ėmiklis arba kamščių grąžtas, kerno mėginiams iš MMMF audinių lakštų imti.

([1]) Šis didinimas nurodomas 3 μm plaušeliams, 6 μm plaušeliams labiau gali tikti × 5 000 didinimas.

▼M1

1.5.3. **Bandymo eiga**

1.5.3.1. *Ėminių ėmimas*

Audiniams ir šiluminės izoliacijos lakštams naudojamas 25 mm kerno ėmiklis arba kamščių grąžtas skerspjūvio ėminiams paimti. Ėminių ėmimo vietos turi būti vienodai išdėstytos skersai nedidelio ilgio lakštų arba ėminiai imami iš atsitiktinių vietų, jei yra didelio ilgio lakštų atraižos. Tokia pačia įranga galima imti atsitiktinius biriųjų plaušelių ėminius.. Jei įmanoma, turi būti imami šeši ėminiai, siekiant įvertinti erdvinius biriosios medžiagos nukrypimus.

Šeši kerno ėminiai trupinami 50 mm skersmens presformoje esant 10 MPa. Medžiaga sumaišoma mentele ir iš naujo suspaudžiama esant 10 MPa. Medžiaga išimama iš presformos ir laikoma uždarytame stikliniame butelyje.

1.5.3.2. *Ėminių ruošimas*

Prireikus organinį rišiklį galima pašalinti, jei plaušeliai maždaug vieną valandą kaitinami 450 °C temperatūros krosnyje.

Ėminys supilamas į kūgį ir taikomas ketvirčiavimo metodas jam toliau padalyti (šis veiksmas turi būti daromas traukos spintoje).

Nedidelis ėminio kiekis (< 0,5 g) mentele įdedamas į 100 ml šviežiai distiliuoto vandens, filtruoto per 0,2 μm membraninį filtrą (galima naudoti kitus ypač švaraus vandens šaltinius, jei būtų įrodytas jų tinkamumas). Ėminys kruopščiai disperguojamas ultragarsiniu zondu, dirbančiu 100 W galia ir reguliuojamu kavitacijai gauti. (Jei zondo nėra, taikomas šis metodas: kelis kartus indas purtomas ir apverčiamas 30 s; penkias minutes veikiamas ultragarsu stalinėje ultragarsinėje vonioje; vėliau indas kelis kartus purtomas ir apverčiamas dar 30 s).

Iškart po plaušelių dispergavimo paimamos kelios alikvotinės dalys (pvz., trys 3, 6 ir 10 ml alikvotinės dalys) plačios angos pipete (2–5 ml tūrio).

Kiekviena alikvotinė dalis siurbiama vakuumu per 0,2 μm polikarbonatinį filtrą, uždėtą ant 5 μm akučių MEC atraminio filtro, naudojant cilindro formos 25 mm stiklinio filtro piltuvą. Į piltuvą įpilama maždaug 5 ml filtruoto distiliuoto vandens ir alikvotinė ėminio dalis lėtai lašinama iš pipetės į vandenį, pipetės galiuką laikant žemiau menisko. Supylus ėminį, pipetė ir filtro indas turi būti kruopščiai plaunami, nes ploni plaušeliai paprastai lieka ant paviršiaus.

Filtras atsargiai išimamas ir, prieš dedant į džiovinimo indą, atskiriamas nuo atsarginio filtro.

▼M1

Ketvirtadalis arba pusė filtro su filtruotomis nuosėdomis pjaunama 24 tipo skalpeliu, naudojant supimo veiksmą. Išpjauta dalis kruopščiai tvirtinama prie SEM stovo lipnios grafitinės juostos gabaliuku arba grafitiniais klijais. Elektriniam kontaktui pagerinti bent trijose stovo ir filtro kraštų vietose užtepama sidabrinių klijų. Išdžiūvus klijams/sidabro klijams, ant nuosėdų paviršiaus užpurškiamas maždaug 50 nm aukso arba aukso/paladžio sluoksnis.

1.5.3.3. *SEM kalibravimas ir darbas*

1.5.3.3.1. Kalibravimas

SEM kalibravimas turi būti tikrinamas bent kartą per savaitę (geriau būtų kartą per dieną) sertifikuotu kalibravimo tinkleliu. Kalibravimas turi būti tikrinamas pagal sertifikuotą etaloną ir jei išmatuota vertė (SEM) neatitinka sertifikuotosios vertės ±2 % tikslumu, SEM reikia kalibruoti ir dar kartą tikrinti.

SEM turi būti įmanoma skirti bent 0,2 μm mažiausią matomą skersmenį, naudojant tikrąją ėminio matricą esant × 2 000 didinimui.

1.5.3.3.2. Darbas

SEM turi dirbti naudojant 10 000 didinimą ([1]), esant sąlygoms, užtikrinančioms gerą skyrą ir priimtiną vaizdą, kai mažas skleidimo greitis, pvz., 5 s kadrui. Nors skirtingų SEM veikimo reikalavimai gali skirtis, paprastai geriausiam matomumui ir skyrai gauti, kai tiriamos palyginti mažos molekulinės masės medžiagos, greitinimo įtampa turi būti 5–10 keV, nustatant mažą dėmės dydį ir trumpą darbinį atstumą. Kadangi daromi linijų kirtimo matavimai, turi būti naudojamas 0^{o} polinkis perfokusavimui sumažinti arba, jei SEM turi eucentrinį staliuką, turi būti naudojamas eucentrinis darbinis atstumas. Galima naudoti mažesnį didinimą, jei medžiaga neturi mažų (mažo skersmens) plaušelių ir jei plaušelių skersmens vertės yra didelės (> 5 μm).

1.5.3.4. *Dydžio nustatymas*

1.5.3.4.1. Tyrimas ėminiui įvertinti, esant mažam didinimui

Ėminys iš pradžių turi būti tiriamas esant mažam didinimui, kad būtų galima rasti duomenų apie didelių plaušelių susikaupimą ir įvertinti plaušelių tankį. Jei susikaupimas yra per didelis, rekomenduojama ruošti naują ėminį.

Siekiant statistinio tikslumo, būtina matuoti tam tikrą mažiausią plaušelių skaičių, todėl didelis plaušelių tankis lyg ir būtų pageidautinas, kadangi tuštiems laukams tirti reikia daug laiko ir toks tyrimas nepadidina analizės duomenų. Tačiau jei filtras yra perkrautas, tampa sunku išmatuoti visus matuotinus plaušelius, ir maži plaušeliai gali likti nepastebėti, kadangi būtų paslėpti po dideliais plaušeliais.

([1]) Apie 3 μm plaušelius žr. pirmiau pateiktą pastabą.

▼M1

Gali būti poslinkis į per didelių LWGMD įverčių pusę, jei plaušelių tankis būtų didesnis kaip 150 plaušelių kertamos linijos milimetrui. Iš kitos pusės, dėl mažos plaušelių koncentracijos pailgėja analizės laikas ir dažnai labiau apsimoka paruošti ėminį, kurio plaušelių tankis būtų netoli optimalaus, nei tęsti plaušelių skaičiavimą ant filtrų su maža koncentracija. Esant optimaliam plaušelių tankiui, skaičiuotinų plaušelių vidurkis turėtų būti vienas arba du plaušeliai laukuose su 5 000 didinimu. Vis dėlto optimalus tankis priklausys nuo plaušelių dydžio (skersmens), todėl būtina, kad operatorius naudotų ekspertų įvertinimą, siekiant nuspręsti, ar plaušelių tankis yra arti optimalaus ar ne.

1.5.3.4.2. Ilgio svorinis plaušelių skersmens verčių įvertinimas

Skaičiuojami tik tie plaušeliai, kurie liečia (arba kerta) (be galo) ploną liniją SEM ekrane. Šiam tikslui per ekrano vidurį brėžiama horizontali (arba vertikali) linija.

Kitaip galima pažymėti vieną tašką ekrano centre ir pradėti nepertraukiamai judėti viena kryptimi skersai filtro. Matuojamas ir užrašomas skersmuo visų plaušelių, turinčių didesnį kaip 3:1 matmenų santykį ir liečiančių arba kertančių šį tašką.

1.5.3.4.3. Plaušelių dydžio nustatymas

Rekomenduojama matuoti ne mažiau kaip 300 plaušelių. Kiekvienas plaušelis matuojamas tik kartą susikirtimo su linija taške arba ekrane nupieštame taške (arba arti susikirtimo taško, jei plaušelio kraštų nesimato). Jei pasitaiko nevienodo skerspjūvio plaušeliai, turi būti naudojamas matmuo, atitinkantis plaušelio vidutinį skersmenį. Reikia kruopščiai nustatyti plaušelių kraštą ir matuoti trumpiausią atstumą tarp plaušelio kraštų. Dydį galima matuoti žiūrint, arba ant saugomų vaizdų arba fotografijų. Rekomenduojama naudoti pusiau automatines vaizdo matavimo sistemas, kurios tiesiogiai siunčia duomenis į elektroninę lentelę, nes taip taupomas laikas, šalinamos užrašymo klaidos ir galima automatizuoti apskaičiavimus.

Esant mažam didinimui, tikrinami ilgų plaušelių galai, siekiant įsitikinti, ar jie nesusisuka ir dar kartą neatsiduria matavimo regos lauke ir yra matuojami tik vieną kartą.

2. **DUOMENYS**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Plaušelių skersmens vertės paprastai neatitinka normaliojo skirstinio. Tačiau padarius logaritminę transformaciją galima gauti skirstinį, kuris aproksimuotų normalųjį.

Apskaičiuojamas n plaušelių skersmens (D) natūraliojo logaritmo verčių (lnD) aritmetinis vidurkis (vidutinis lnD) ir standartinis nuokrypis (SD_{lnD}).

$$\text{vidutinis ln D} = \frac{\Sigma \text{lnD}}{n} \qquad (1)$$

▼M1

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\Sigma(lnD - \text{vidutinis } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Standartinės paklaidos vertei (SE_{lnD}) gauti standartinis nuokrypis dalijamas iš matavimų skaičiaus (n) kvadratinės šaknies.

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

Geometrinio vidurkio bei dvigubos geometrinės standartinės paklaidos skirtumui gauti iš aritmetinio vidurkio vertės atimama dviguba standartinė paklaida ir apskaičiuojama šios vertės (vidurkio ir dvigubos standartinės paklaidos skirtumo) eksponentė.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{vidutinis } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **ATASKAITOS RENGIMAS**

BANDYMO ATASKAITA

Bandymų ataskaitą turi sudaryti bent ši informacija:

— LWGMD – 2SE vertė;

— visi nukrypimai, ypač galintys daryti įtaką rezultatų preciziškumui ir tikslumui, ir atitinkami duomenys jiems pagrįsti.

4. **NUORODOS**

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.

▼M4

A.23. PASISKIRSTYMO KOEFICIENTAS (1-OKTANOLIS / VANDUO). LĖTO MAIŠYMO METODAS

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka OECD „Test Guideline“ (TG) 123 (OECD bandymo gairės Nr. 123) (2006 m.). 1-oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficiento (P_{OW}) vertės, kai log P_{OW} neviršija 8,2, tiksliai nustatytos taikant lėto maišymo metodą (1). Todėl Šis bandymo metodas yra tinkamas tiesiogiai nustatyti didelio hidrofobiškumo medžiagų P_{OW}.

2. Kiti 1-oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficiento (P_{OW}) nustatymo metodai yra kratomos kolbos metodas (2) ir P_{OW} nustatymas remiantis atvirkštinės fazės HPLC sulaikymo savybėmis (3). Kratomos kolbos metodui būdingi artefaktai, susidarantys labai mažiems oktanolio lašeliams pereinant į vandeninę fazę. Didėjant P_{OW} vertėms, dėl šių lašelių buvimo vandeninėje fazėje vis labiau pervertinama bandomosios cheminės medžiagos koncentracija vandenyje. Todėl šis metodas taikytinas tik toms cheminėms medžiagoms, kurių P_{OW} vertė mažesnė nei 4. Antrasis metodas grindžiamas patikimais tiesiogiai nustatytų P_{OW} verčių duomenimis, naudojamais tiksliai nustatyti HPLC sulaikymo savybių ir išmatuotų P_{OW} verčių tarpusavio priklausomybę. Buvo paskelbtas OECD gairių, skirtų nustatyti jonizuojamųjų cheminių medžiagų 1-oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientus, projektas (4), tačiau jis nebenaudotinas.

3. Šis bandymo metodas parengtas Nyderlanduose. Čia aprašytų metodų tikslumas patvirtintas ir pagerintas per tarplaboratorinį patvirtinamąjį tyrimą, kuriame dalyvavo 15 laboratorijų (5).

PIRMINIAI ASPEKTAI

Reikšmė ir taikymas

4. Nagrinėjant inertines organines chemines medžiagas, nustatyta labai stiprių priklausomybių tarp 1-oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientų (P_{OW}) ir tų medžiagų bioakumuliacijos žuvyse. Be to, įrodyta, kad P_{OW} susijęs su toksiškumu žuvims, taip pat su cheminių medžiagų sugertimi į kietąsias medžiagas, pvz., dirvožemius ir nuosėdas. Išsami šių priklausomybių apžvalga pateikta literatūros šaltinyje (6).

5. Nustatyta didelė 1-oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficiento ir kitų cheminės medžiagos savybių, kurios yra svarbios aplinkos toksikologijai ir chemijai, tarpusavio priklausomybių įvairovė. Todėl 1-oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientas ilgainiui tapo pagrindiniu kriterijumi vertinant cheminių medžiagų keliamą pavojų aplinkai, taip pat prognozuojant cheminių medžiagų išliekamumą aplinkoje.

Taikymo sritis

6. Manoma, kad atliekant lėto maišymo bandymą sumažinamas labai mažų lašelių susidarymas iš 1-oktanolio lašelių vandeninėje fazėje. Todėl nepervertinama koncentracija vandenyje, susidaranti dėl bandomosios cheminės medžiagos molekulių, susijusių su šiais lašeliais. Dėl šios priežasties lėto maišymo metodas yra labai tinkamas nustatyti P_{OW}, susijusį su cheminėmis medžiagomis, kurių numatomos log P_{OW} vertės yra 5 arba didesnės ir kurioms taikant kratomos kolbos metodą (2) veikiausiai būtų gauti klaidingi rezultatai.

▼M4

APIBRĖŽTIS IR VIENETAI

7. Cheminės medžiagos pasiskirstymo tarp vandens ir lipofilinio tirpiklio (1-oktanolio) koeficientas rodo cheminės medžiagos pusiausvyros pasiskirstymą dviejose fazėse. Pasiskirstymo tarp vandens ir 1-oktanolio koeficientas (P_{OW}) apibrėžiamas kaip bandomosios cheminės medžiagos pusiausvyros koncentracijų 1-oktanolyje, įsotintame vandeniu (C_O), ir vandenyje, įsotintame 1-oktanoliu (C_W), santykis.

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Koncentracijų santykis yra bematis. Dažniausiai jis nurodomas kaip logaritmas pagrindu 10 (log P_{OW}). P_{OW} priklauso nuo temperatūros, todėl pateikiant duomenis turėtų būti nurodyta matavimo temperatūra.

METODO PRINCIPAS

8. Norint nustatyti pasiskirstymo koeficientą, pasiekiama vandens, 1-oktanolio ir bandomosios cheminės medžiagos tarpusavio pusiausvyra esant pastoviai temperatūrai. Tada nustatomos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos abiejose fazėse.

9. Bandymų sunkumus, susijusius su labai mažų lašelių susidarymu atliekant kratomos kolbos bandymą, galima sumažinti atliekant čia siūlomą lėto maišymo bandymą. Atliekant lėto maišymo bandymą, 1-oktanolio ir bandomosios cheminės medžiagos pusiausvyra pasiekiama termostatu kontroliuojamame maišomame reaktoriuje. Perėjimas iš vienos fazės į kitą pagreitinamas maišant. Maišant sukuriamas nedidelis sūkuriavimas, kuriuo pagerinamas perėjimas iš 1-oktanolio į vandenį (ir atvirkščiai) be labai mažų lašelių susidarymo (1).

BANDYMO TINKAMUMAS

10. Kadangi kitų cheminių medžiagų, be bandomosios, buvimas gali turėti įtakos bandomosios cheminės medžiagos aktyvumo koeficientui, bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti bandoma kaip gryna cheminė medžiaga. Per 1-oktanolio / vandens pasiskirstymo bandymą turėtų būti naudojama pati gryniausia cheminė medžiaga, kokios tik galima įsigyti rinkoje.

11. Šis metodas taikomas grynoms cheminėms medžiagoms, kurios nesiskaido ar nesijungia ir kurioms nebūdinga aktyvi sąveika. Jis gali būti taikomas nustatyti tokių cheminių medžiagų ir mišinių 1-oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientą. Jeigu metodas taikomas mišiniams, nustatytieji 1-oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientai yra sąlyginiai ir priklauso nuo cheminės bandomojo mišinio sudėties ir nuo elektrolitų, kurie naudojami kaip vandeninė fazė, sudėties. Įtraukus papildomų etapų, šis metodas taip pat gali būti taikomas besiskaidantiems arba besijungiantiems junginiams (12 skirsnis).

12. Dėl įvairios pusiausvyros vandenyje ir 1-oktanolyje, kurie naudojami per besiskaidančių cheminių medžiagų, pvz., organinių rūgščių ir fenolių, organinių bazių ir organometalinių cheminių medžiagų, pasiskirstymo procesą, 1-oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientas yra sąlyginė konstanta, labai priklausoma nuo elektrolitų sudėties (7) (8). Todėl nustatant 1-oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientą būtina bandymo metu kontroliuoti pH ir elektrolitų sudėtį ir tai nurodyti ataskaitoje. Vertinant šiuos pasiskirstymo koeficientus, būtina atsižvelgti į ekspertų nuomonę. Taikant disociacijos konstantos (-ų) vertę (-es), turi būti parinktos tinkamos pH vertės, kad pasiskirstymo koeficientas būtų nustatytas kiekvienai jonizacijos būklei. Atliekant bandymus su organometaliniais junginiais, turi būti naudojami nekompleksodariniai buferiai. Atsižvelgiant į turimas žinias apie vandens chemiją (kompleksodaros konstantas, disociacijos konstantas), Bandymo sąlygos turėtų būti parinktos taip, būtų galima įvertinti bandomosios cheminės medžiagos atmainavimą. Per visus bandymus naudojant foninį elektrolitą turėtų būti užtikrinta tokia pat joninė jėga.

▼M4

13. Atliekant bandymą gali kilti sunkumų, kai bandymas atliekamas su cheminėmis medžiagomis, kurios prastai tirpsta vandenyje arba kurių P_{OW} yra didelis, nes koncentracijos vandenyje tampa labai mažos ir sunku jas tiksliai nustatyti. Aprašant šį bandymo metodą patariama, kaip spręsti šią problemą.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

14. Cheminiai reagentai turėtų būti analizinio arba didesnio grynumo. Rekomenduojama naudoti žymėtąsias bandomąsias chemines medžiagas, kurių cheminė sudėtis yra žinoma ir kurių grynumas, pageidautina, ne mažesnis kaip 99 %, arba radioaktyviu izotopu žymėtąsias bandomąsias chemines medžiagas, kurių cheminė sudėtis ir radiocheminis grynumas yra žinomi. Jeigu naudojamos trumpo pusinio gyvavimo atsekamosios medžiagos, turėtų būti taikomos skilimo pataisos. Jeigu naudojamos radioaktyviu izotopu žymėtosios bandomosios cheminės medžiagos, turėtų būti taikomas cheminei medžiagai pritaikytas analizės metodas, kuriuo būtų užtikrinama, jog išmatuotasis radioaktyvumas būtų tiesiogiai susijęs su bandomąja chemine medžiaga.

15. Log P_{OW} įvertis gali būti gaunamas naudojant komercinę programinę įrangą, skirtą apskaičiuoti log P_{OW}, arba naudojant tirpumo abiejuose tirpikliuose santykį.

16. Prieš atliekant lėto maišymo bandymą, skirtą nustatyti P_{OW}, reikėtų gauti tokią informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą:

a) struktūrinė formulė;

b) tinkami analizės metodai, skirti nustatyti cheminės medžiagos koncentraciją vandenyje ir 1-oktanolyje;

c) jonizuojamųjų cheminių medžiagų disociacijos konstanta (-os) (OECD Guideline 112 (OECD gairės Nr. 112) (9));

d) tirpumas vandenyje (10);

e) abiotinė hidrolizė (11);

f) lengvas biologinis skaidomumas (12);

g) garų slėgis (13).

METODO APRAŠYMAS

Įranga ir aparatūra

17. Reikalinga įprasta laboratorinė įranga, pirmiausia šie dalykai:

— vandeninei fazei maišyti naudojami magnetiniai maišytuvai ir teflonu dengtos maišymo mentelės,

— analizės prietaisai, tinkami nustatyti bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją atsižvelgiant į numatomas koncentracijas,

— maišymo indas su čiaupu apačioje; atsižvelgiant į log P_{OW} įvertį ir bandomojo mišinio aptikimo ribą (AR), turi būti apsvarstyta galimybė naudoti tokių pat geometrinių savybių reaktorių, kurio talpa būtų didesnė nei vienas litras, kad cheminės medžiagos ekstrahavimo ir analizės tikslais būtų galima paimti pakankamą kiekį vandens. Taip vandens ekstrakte susidarys didesnės koncentracijos ir analitinis tyrimas bus patikimesnis. 1 priedėlyje pateikta lentelė, kurioje nurodytas mažiausias būtinas kiekis, mišinio AR, jo apskaičiuotasis log P_{OW} ir jo tirpumas vandenyje. Lentelė sudaryta remiantis log P_{OW} priklausomybe nuo tirpumo oktanolyje ir vandenyje rodiklių santykio, kaip nurodė Pinsuwan ir kiti (14):

$$\log P_{OW} = 0,\ 88 \log SR + 0,\ 41$$

▼M4

čia:

$SR = S_{oct}/S_w$ (moliais)

ir Lyman (15) nustatyta priklausomybe, skirta prognozuoti tirpumą vandenyje. Tirpumo vandenyje rodikliai, apskaičiuoti naudojant 1 priedėlyje pateiktą lygtį, turi būti laikomi pirmuoju įverčiu. Reikėtų atkreipti dėmesį, kad naudotojas gali apskaičiuoti tirpumą vandenyje ir naudodamas bet kokią kitą priklausomybę, kuri, jo nuomone, geriau apibūdina hidrofobiškumo ir tirpumo sąryšį. Pvz., prognozuojant kietųjų mišinių tirpumą, rekomenduojama atsižvelgti į lydymosi temperatūrą. Jeigu naudojama pakeista lygtis, reikėtų įsitikinti, ar lygtis taip pat tinkama skaičiuoti tirpumą oktanolyje. 2 priedėlyje pateikta stiklu gaubto maišymo indo, kurio talpa apie vieną litrą, schema. Nustatyta, kad 2 priedėlyje pavaizduoto indo proporcijos yra tinkamos ir turėtų būti išsaugotos naudojant kitokio dydžio aparatą,

— būtina turėti pastovios temperatūros išlaikymo per lėto maišymo bandymą priemonę.

18. Indai turėtų būti pagaminti iš inertinės medžiagos, kad adsorbcija į indo paviršių būtų labai maža.

Bandomųjų tirpalų ruošimas

19. P_{OW} turėtų būti nustatomas naudojant patį gryniausią 1-oktanolį, kokio tik galima įsigyti rinkoje (ne mažesnio kaip 99 % grynumo). Rekomenduojama 1-oktanolį gryninti jį ekstrahuojant rūgštimi, baze ir vandeniu, o tada išdžiovinant. Be to, 1-oktanolis gali būti gryninamas distiliavimo būdu. Išgrynintas 1-oktanolis bus naudojamas paruošti etaloninius bandomųjų cheminių medžiagų tirpalus. Nustatant P_{OW} naudojamas vanduo turi būti distiliuotas stiklu arba kvarcu arba išgautas iš gryninimo sistemos, arba turi būti naudojamas HPLC kokybės vanduo. Distiliuotas vanduo turi būti filtruojamas per 0,22 μm filtrą; siekiant patikrinti, ar koncentruotuose ekstraktuose nėra priemaišų, kurios galėtų susimaišyti su bandomąja chemine medžiaga, taip pat turėtų būti įterpiami tuštieji ėminiai. Jeigu naudojamas stiklo pluošto filtras, jis turėtų būti išvalytas ne trumpiau kaip tris valandas kaitinant 400 °C temperatūroje.

20. Prieš bandymą abu tirpikliai įsotinami vienas kitu pasiekiant jų pusiausvyrą pakankamai dideliame inde. Tai atliekama dvi paras lėtai maišant dviejų fazių sistemą.

21. Parenkama tinkama bandomosios cheminės medžiagos koncentracija ir ištirpinama 1-oktanolyje (įsotintame vandeniu). 1-oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientas turi būti nustatytas atskiestuose tirpaluose, įpiltuose į 1-oktanolį ir vandenį. Todėl bandomosios cheminės medžiagos koncentracija neturėtų viršyti 70 % jos tirpumo, susidarant ne didesnei kaip 0,1 M koncentracijai kiekvienoje fazėje (1). Per bandymą naudojami 1-oktanolio tirpalai turi būti be suspenduotos kietosios bandomosios cheminės medžiagos.

22. Tinkamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis ištirpinamas 1-oktanolyje (įsotintame vandeniu). Jeigu P_{OW} įvertis didesnis kaip penki, būtina imtis atsargumo priemonių, kad per bandymą naudojamuose 1-oktanolio tirpaluose nebūtų suspenduotos kietosios bandomosios cheminės medžiagos. Šiuo tikslu su cheminėmis medžiagomis, kurių apskaičiuotoji log P_{OW} vertė didesnė kaip 5, atliekama tokia procedūra:

— bandomoji cheminė medžiaga ištirpinama 1-oktanolyje (įsotintame vandeniu),

▼M4

— pakankamai ilgai palaukiama, kol nusės tirpale suspenduota kietoji cheminė medžiaga. Nusėdimo laikotarpiu stebima bandomosios cheminės medžiagos koncentracija,

— kai išmatuotos koncentracijos 1-oktanolio tirpale vertės tampa pastovios, pradinis tirpalas atskiedžiamas tinkamu 1-oktanolio kiekiu,

— matuojama atskiesto pradinio tirpalo koncentracija. Jeigu išmatuota koncentracija atitinka atskiedimo laipsnį, atskiestas pradinis tirpalas gali būti naudojamas per lėto maišymo bandymą.

Ėminių ekstrahavimas ir analizė

23. Bandomajai cheminei medžiagai ištirti turėtų būti taikomas patvirtintas analizės metodas. Tyrinėtojai turi pateikti įrodymų, kad koncentracijos vandeniu įsotintoje 1-oktanolio ir 1-oktanoliu įsotintoje vandeninėje fazėje per bandymą viršija metodinę taikomų analizės procedūrų kiekybinio vertinimo ribą. Tais atvejais, kai būtina taikyti ekstrahavimo metodus, prieš bandymą turi būti nustatytas analizinis bandomosios cheminės medžiagos regeneravimas iš vandeninės fazės ir iš 1-oktanolio fazės. Analizinis signalas turi būti koreguojamas atsižvelgiant į tuščiuosius ėminius, ir turėtų būti imtasi atsargumo priemonių, kad analitės nebūtų perkeltos iš vieno ėminio į kitą.

24. Atsižvelgiant į gana mažas hidrofobinių bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijas vandeninėje fazėje, prieš atliekant analizę veikiausiai reikės ekstrahuoti vandens fazę naudojant organinį tirpiklį ir paruošti parengtinę ekstrakto koncentraciją. Dėl tos pat priežasties būtina sumažinti atsitiktines tuščiąsias koncentracijas. Šiuo tikslu būtina naudoti didelio grynumo tirpiklius, pageidautina – likučių analizei naudojamus tirpiklius. Be to, naudojant iš anksto kruopščiai išvalytus (pvz., išplautus tirpikliais arba pakaitintus aukštoje temperatūroje) stiklinius indus, galima išvengti kryžminės taršos.

25. Log P_{OW} įvertį galima gauti naudojant skaičiavimo programą arba remiantis ekspertų nuomone. Jeigu vertė didesnė už šešis, būtina atidžiai stebėti su tuščiaisiais ėminiais susijusias pataisas ir analičių perkėlimą. Atitinkamai, jeigu log P_{OW} vertė didesnė už šešis, regeneravimo pataisoms privaloma taikyti pakaitinį etaloną, kad būtų galima pasiekti didelius parengtinės koncentracijos koeficientus. Rinkoje galima įsigyti įvairios programinės įrangos, skirtos apskaičiuoti log P_{OW} [1], pvz., „Clog P“ (16), „KOWWIN“ (17), „ProLogP“ (18) ir „ACD log P“ (19). Skaičiavimo principų aprašymai pateikti literatūros šaltiniuose (20–22).

26. Kiekybinio įvertinimo ribos (KĮR), taikytinos tiriant bandomąją cheminę medžiagą 1-oktanolyje ir vandenyje, nustatomos taikant patvirtintus metodus. Metodinė kiekybinio įvertinimo riba gali būti apytikriai nustatyta kaip koncentracija vandenyje arba 1-oktanolyje, kuriai esant gaunamas signalo ir triukšmo santykis, lygus dešimčiai. Turėtų būti parinktas tinkamas ekstrahavimo ir parengtinio koncentravimo metodas; be to, turėtų būti taikomas analizinis regeneravimas. Norint prieš analitinį tyrimą gauti reikiamo dydžio signalą, būtina parinkti tinkamą parengtinės koncentracijos koeficientą.

[1] Ši informacija pateikiama tik naudotojų patogumui. Gali būti naudojamos lygiavertės kompiuterinės programos, jeigu galima įrodyti, kad jas naudojant gaunami tokie pat rezultatai.

▼M4

27. Remiantis analizės metodo parametrais ir numatomomis koncentracijomis, nustatomas apytikris imties dydis, reikalingas norint tiksliai nustatyti mišinio koncentraciją. Neturėtų būti naudojami vandens ėminiai, kurie yra per maži, kad būtų galima gauti pakankamą analizinį signalą. Be to, neturėtų būti naudojami pernelyg dideli vandens ėminiai, nes gali likti per mažai vandens minimaliam reikiamų analizių skaičiui (n = 5). 1 priedėlyje nurodytas mažiausias ėminio tūris, kaip indo tūrio funkcija, bandomosios cheminės medžiagos AR ir bandomosios medžiagos tirpumas.

28. Bandomųjų cheminių medžiagų kiekybinis įvertinimas atliekamas lyginant atitinkamo mišinio kalibravimo kreives. Koncentracija analizuojamuose ėminiuose turi būti sulyginama su etaloninėmis koncentracijomis.

29. Jeigu bandomosios cheminės medžiagos log P_{OW} įvertis didesnis už šešis, prieš ekstrahavimą vandens ėminiui turi būti pritaikytas pakaitinis etalonas, kad būtų galima užregistruoti nuostolius, susidarančius vandens ėminių ekstrahavimo ir parengtinio koncentravimo metu. Kad regeneravimo pataisa būtų tiksli, pakaitalų savybės turi būti labai panašios į bandomosios cheminės medžiagos savybes arba tokios pat. Pageidautina, kad šiuo tikslu būtų naudojami (stabilūs) izotopais žymėtieji dominančių cheminių medžiagų analogai (pvz., deuterizuotieji arba žymėtieji izotopu ^{13}C). Jeigu žymėtųjų stabilių izotopų, pvz., ^{13}C arba ^{2}H, naudoti neįmanoma, remiantis patikimais literatūroje pateiktais duomenimis turėtų būti įrodyta, kad pakaitalo fizinės ir cheminės savybės labai panašios į bandomosios cheminės medžiagos savybes. Pagal skysčių ekstrahavimo skysčiais principą ekstrahuojant vandeninę fazę, gali susidaryti emulsijos. Jų susidarymą galima sumažinti įpilant druskos ir paliekant emulsiją nakčiai nusistovėti. Ataskaitoje turi būti nurodyti taikyti ėminių ekstrahavimo ir parengtinio koncentravimo metodai.

30. Iš 1-oktanolio fazės ekstrahuoti ėminiai prieš atliekant analizę prireikus gali būti atskiedžiami tinkamu tirpikliu. Be to, jeigu per cheminių medžiagų regeneravimo bandymus pastebimi dideli regeneravimo bandymų nuokrypiai (santykinis standartinis nuokrypis didesnis kaip 10 %), rekomenduojama regeneravimo pataisos tikslais naudoti pakaitinius etalonus.

31. Ataskaitoje būtina išsamiai aprašyti analizės metodą. Turėtų būti nurodytas ekstrahavimo metodas, parengtinės koncentracijos ir skiedimo koeficientai, kalibravimo tvarka, kalibravimo intervalas, bandomosios cheminės medžiagos analizinis regeneravimas iš vandens, pakaitinių etalonų naudojimas regeneravimo pataisos tikslais, tuščiosios vertės, aptikimo ribos ir kiekybinio įvertinimo ribos.

Bandymo eiga

Optimalūs 1-oktanolio / vandens kiekio santykiai

32. Parenkant vandens ir 1-oktanolio kiekius, reikėtų atsižvelgti į kiekybinio įvertinimo ribas 1-oktanolyje ir vandenyje, vandens ėminiams taikomus parengtinės koncentracijos koeficientus, imamus 1-oktanolio ir vandens kiekius ir į numatomas koncentracijas. Bandymo sumetimais 1-oktanolio kiekis lėto maišymo sistemoje turėtų būti parinktas taip, kad 1-oktanolio sluoksnis būtų gana storas (> 0,5 cm), jog 1-oktanolio fazės ėminius būtų galima imti nesuardant šio sluoksnio.

33. Tipiniai fazių santykiai, taikomi tiriant mišinius, kurių log P_{OW} vertės yra 4,5 ir didesnės, yra 20–50 ml 1-oktanolio ir 950–980 ml vandens vieno litro talpos inde.

▼M4

Bandymo sąlygos

34. Atliekant bandymą reaktorius kontroliuojamas termostatu siekiant sumažinti temperatūros kaitą iki mažiau kaip 1 °C. Tyrimas turėtų būti atliekamas 25 °C temperatūroje.

35. Bandymų sistema turėtų būti apsaugota nuo dienos šviesos, bandymą atliekant tamsioje patalpoje arba reaktorių uždengiant aliuminio folija.

36. Bandymas turėtų būti atliekamas nedulkėtoje (kiek įmanoma) aplinkoje.

37. 1-oktanolio ir vandens sistema maišoma, kol pasiekiama pusiausvyra. Per bandomąjį eksperimentą, atliekant lėto maišymo eksperimentą ir periodiškai imant vandens ir 1-oktanolio ėminius, įvertinamas pusiausvirinimo laikotarpis. Minimalus ėminių ėmimo laiko intervalas – penkios valandos.

38. Kiekvienas P_{OW} turėtų būti nustatomas atliekant ne mažiau kaip tris atskirus lėto maišymo bandymus.

Pusiausvirinimo laikotarpio nustatymas

39. Daroma prielaida, kad pusiausvyra pasiekiama tada, kai koncentracijų 1-oktanolyje ir vandenyje santykio priklausomybės nuo laiko kreivės nuolydis laikotarpiu, apimančiu keturis laiko momentus, įgyja beveik nulinę vertę, kai p reikšmė lygi 0,05. Trumpiausias pusiausvirinimo laikotarpis – viena para iki galimos ėminių ėmimo pradžios. Ėminių ėmimas iš cheminių medžiagų, kurių log P_{OW} įvertis mažesnis nei penki, apytikriai gali būti atliekamas antrąją ir trečiąją paromis. Kai tiriamos didesnio hidrofobiškumo medžiagos, pusiausvirinimo laikotarpis gali būti ilgesnis. Jeigu mišinio log P_{OW} vertė lygi 8,23 (dekachlorobifenilas), pusiausvyrai nusistovėti pakanka 144 valandų. Pusiausvyra įvertinama pakartotinai imant ėminius iš vieno indo.

Bandymo pradžia

40. Pradedant bandymą reaktorius pripildomas 1-oktanoliu įsotinto vandens. Turėtų būti skiriama pakankamai laiko, kol bus pasiekta termostatu reguliuojama temperatūra.

41. Pageidaujamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis (ištirpintas reikiamame vandeniu įsotinto 1-oktanolio kiekyje) atsargiai įdedamas į reaktorių. Tai labai svarbus bandymo etapas, nes būtina išvengti sūkurinio dviejų fazių maišymosi. Šiuo tikslu 1-oktanolio fazė gali būti lėtai lašinama pipete ant bandymų indo sienelės nedideliu atstumu nuo vandens paviršiaus. Tada ji nutekės stiklo sienele ir sudarys ploną sluoksnį virš vandeninės fazės. Visada reikėtų vengti tiesiogiai filtruoti 1-oktanolį į kolbą; 1-oktanolio lašeliams neturėtų būti leidžiama tiesiogiai kristi į vandenį.

42. Pradėjus maišyti, maišymo greitis turėtų būti pamažu didinamas. Jeigu maišymo greičio negalima tinkamai sureguliuoti, turėtų būti apsvarstyta galimybė naudoti transformatorių. Maišymo greitis turėtų būti sureguliuotas taip, kad ties vandens ir 1-oktanolio sąlyčio vieta susidarytų 0,5–2,5 cm gylio sūkurys. Sūkurio gyliui viršijus 2,5 cm, maišymo greitis turėtų būti sumažintas; kitaip iš 1-oktanolio lašelių vandeninėje fazėje gali susidaryti labai maži lašeliai, o dėl to gali būti pervertinta bandomosios cheminės medžiagos koncentracija vandenyje. Ne didesnį kaip 2,5 cm gylį atitinkantis maišymas rekomenduojamas atsižvelgiant į tarplaboratorinio patvirtinamojo tyrimo rezultatus (5). Tai greito pusiausvyros pasiekimo ir labai mažų 1-oktanolio lašelių susidarymo ribojimo kompromisas.

▼M4

Ėminių ėmimas ir apdorojimas

43. Prieš imant ėminius maišytuvas turėtų būti išjungtas, ir reikėtų palaukti, kol skysčiai nustos judėti. Baigus imti ėminius, maišytuvas vėl iš lėto paleidžiamas, kaip aprašyta pirmiau, ir pamažu didinamas maišymo greitis.

44. Vandeninės fazės ėminiai imami iš čiaupo, įrengto reaktoriaus apačioje. Visada atmeskite nenaudingą vandens kiekį, susikaupusį čiaupuose (2 priedėlyje parodytame inde – apie 5 ml). Čiaupuose susikaupęs vanduo nemaišomas, todėl nepasiekiama jo pusiausvyra su pagrindine mase. Užsirašykite vandens ėminių tūrį ir pasirūpinkite, kad nustatant masių balansą būtų atsižvelgta į bandomosios cheminės medžiagos kiekį atmestame vandenyje. Garavimo nuostoliai turėtų būti sumažinti leidžiant vandeniui inertiškai tekėti į skirstomąjį piltuvą, kad nebūtų drumsčiamas vandens ir 1-oktanolio sluoksnis.

45. 1-oktanolio ėminiai gaunami 100 mikrolitrų švirkštu, pagamintu tik iš stiklo ir metalo, paimant mažą (apie 100 µl) 1-oktanolio sluoksnio alikvotinę dalį. Turėtų būti imamasi atsargumo priemonių, kad nebūtų suardyta riba. Užregistruojamas paimto skysčio tūris. Pakanka paimti mažą alikvotinę tirpalo dalį, nes 1-oktanolio ėminys bus atskiestas.

46. Turėtų būti vengiama nebūtinų ėminio perkėlimo veiksmų. Šiuo tikslu ėminio tūris turėtų būti nustatomas gravimetriniu būdu. Imant vandens ėminius tai galima užtikrinti vandens ėminį imant skirstomajame piltuve, kuriame jau yra reikiamas tirpiklio kiekis.

DUOMENYS IR ATASKAITOS

47. Pagal šį bandymo metodą P_{OW} nustatomas vienodomis sąlygomis atliekant tris lėto maišymo bandymus (tris atskirus bandymus) su tiriamu mišiniu. Regresija, naudojama įrodyti pusiausvyros pasiekimą, turėtų būti grindžiama bent keturių C_O/C_W santykių nustatymo nuosekliais laiko momentais rezultatais. Tai suteikia galimybę apskaičiuoti dispersiją, kuria išreiškiamas per kiekvieną atskirą bandymą gautos vidutinės vertės neapibrėžtis.

48. P_{OW} vertė gali būti apibūdinama duomenų, gautų per kiekvieną atskirą bandymą, dispersija. Ši informacija naudojama apskaičiuoti P_{OW}, kaip svertinį atskirų bandymų rezultatų vidurkį. Šiuo tikslu kaip svoris naudojamas atskirų bandymų rezultatų dispersijai atvirkštinis dydis. Todėl duomenys, kuriems būdingas didelis nuokrypis (išreikštas dispersija) ir atitinkamai mažesnis patikimumas, rezultatui turės mažiau įtakos nei duomenys, kuriems būdinga maža dispersija.

49. Lygiai taip pat apskaičiuojamas svertinis standartinis nuokrypis. Juo apibūdinamas P_{OW} matavimų pakartojamumas. Maža svertinio standartinio nuokrypio vertė reiškia, kad toje pačioje laboratorijoje gautiems P_{OW} nustatymo rezultatams būdingas labai aukštas pakartojamumas. Toliau aprašytas formalus statistinis duomenų apdorojimas.

▼M4

Rezultatų apdorojimas

Pusiausvyros pasiekimo įrodymas

50. Kiekvienam ėminių ėmimo laiko momentui apskaičiuojamas bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų 1-oktanolyje ir vandenyje santykio logaritmas (log (C_O/C_w)). Cheminės pusiausvyros pasiekimas įrodomas nubrėžiant šio santykio, kaip laiko funkcijos, kreivę. Šios kreivės plokščioji dalis, pagrįsta ne mažiau kaip keturiais nuosekliais laiko momentais, rodo, kad buvo pasiekta pusiausvyra ir kad mišinys iš tikrųjų ištirpo 1-oktanolyje. Priešingu atveju bandymas turi būti tęsiamas tol, kol remiantis keturiais nuosekliais laiko momentais negaunama kreivės nuolydžio, kurio vertė beveik nesiskiria nuo nulio, kai p reikšmė lygi 0,05, t. y. reiškiantis, kad log C_o/C_w vertė nepriklauso nuo laiko.

Log P_{OW} apskaičiavimas

51. Atskiro bandymo log P_{OW} vertė apskaičiuojama kaip svertinė vidutinė log C_o/C_w vertė, pagrįsta log C_o/C_w kreivės, kaip laiko funkcijos, dalimi, kurioje įrodytas pusiausvyros susidarymas. Svertinis vidurkis apskaičiuojamas duomenims taikant svorius, išreikštus dispersijai atvirkštiniu dydžiu, kad duomenų įtaka galutiniam rezultatui būtų atvirkščiai proporcinga duomenų neapibrėžčiai.

Log P_{OW} vidurkis

52. Vidutinė atskirų bandymų log P_{OW} vertė apskaičiuojama kaip atskirų bandymų rezultatų, kuriems buvo pritaikyti jų atitinkamomis dispersijomis pagrįsti svoriai, vidurkis.

Skaičiuojama taip:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

čia:

$\log P_{OW,i}$ = atskiro bandymo i log P_{OW} vertė;

$\log P_{OW,Av}$ = atskirų log P_{OW} įverčių svertinis vidurkis;

w_i = statistinis svoris, priskirtas atskiro bandymo i log P_{OW} vertei.

Atvirkštinis log $P_{OW,i}$ dispersijai dydis yra w_i ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$).

53. Log P_{OW} vidurkio paklaida apskaičiuojama kaip log C_o/C_w, nustatyto atskirų bandymų pusiausvirinimo etapu, pakartojamumas. Jis išreiškiamas kaip log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log\ Pow,Av}$) svertinis standartinis nuokrypis, kuris savo ruožtu yra log $P_{OW,Av}$ paklaidos matas. Svertinis standartinis nuokrypis gali būti skaičiuojamas remiantis svertine dispersija ($var_{\log\ Pow,Av}$):

$$\text{var}_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (\text{var}_{\log Pow,Av})^{0.5}$$

Simbolis n reiškia atskirų bandymų skaičių.

▼M4

Bandymo ataskaita

54. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikta toliau nurodyta informacija.

Bandomoji cheminė medžiaga:

— įprastas pavadinimas, cheminis pavadinimas, CAS numeris, struktūrinė formulė (rodanti žymėtojo atomo padėtį, jeigu naudojama radioaktyviu izotopu žymėtoji cheminė medžiaga) ir atitinkamos fizinės bei cheminės savybės (žr. 17 skirsnį),

— bandomosios cheminės medžiagos grynumas (priemaišos),

— radiocheminis žymėtųjų cheminių medžiagų grynumas ir molinis aktyvumas (jeigu tinka),

— išankstinis log P_{ow} įvertis, taip pat vertės apskaičiavimo metodas.

Bandymo sąlygos:

— tyrimų datos,

— bandymo temperatūra,

— 1-oktanolio ir vandens tūriai bandymo pradžioje,

— paimtų 1-oktanolio ir vandens ėminių tūriai,

— bandymo induose likę 1-oktanolio ir vandens tūriai,

— naudotų bandymo indų ir taikytų maišymo sąlygų aprašas (maišymo mentelių ir bandymo indo geometrinės savybės, sūkurio gylis milimetrais, ir, jeigu žinoma, maišymo greitis),

— analizės metodai, taikyti įvertinti bandomąją cheminę medžiagą ir metodinę kiekybinio įverčio ribą,

— ėminių ėmimo laikas,

— vandeninės fazės pH ir naudoti buferiai, kai pH koreguojamas atsižvelgiant į jonizuojamąsias molekules,

— kartojimų skaičius.

Rezultatai:

— taikytų analizės metodų pakartojamumas ir jautris,

— nustatytos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos 1-oktanolyje ir vandenyje, kaip laiko funkcija,

— masių balanso įrodymas,

— temperatūra ir standartinis nuokrypis arba temperatūros intervalas bandymo metu,

— koncentracijų santykio regresija, kaip laiko funkcija,

— vidutinė log $P_{ow,Av}$ vertė ir jos standartinė paklaida,

— rezultatų aptarimas ir paaiškinimas,

▼M4

— tipinės analizės pirminių duomenų rodiklių pavyzdžiai (visi pirminiai duomenys turi būti saugomi pagal GLP reikalavimus), nurodant pakaitalų regeneravimą, kalibruojant taikytų lygių skaičių (nurodant kalibravimo kreivės koreliacijos koeficiento kriterijus) ir kokybės užtikrinimo ir (arba) kokybės kontrolės (KU/KK) rezultatus,

— jeigu yra – tyrimo procedūros patvirtinimo ataskaita (turi būti nurodyta kaip literatūros šaltinis).

LITERATŪRA

1. De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the „slow-stirring“ method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499–512.

2. Šio priedo A.8 skyrius. Pasiskirstymo koeficientas.

3. Šio priedo A.8 skyrius. Pasiskirstymo koeficientas.

4. OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.

5. Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

6. Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

7. Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

8. Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596–2602.

9. OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paris.

10. Šio priedo A.6 skyrius. Tirpumas vandenyje.

11. Šio priedo C.7 skyrius. Skaidymas. Abiotinis skaidymas. Hidrolizė kaip pH funkcija.

12. Šio priedo C.4 skyrius. II–VII dalys (A–F metodai). „Lengvo“ biologinio skaidomumo matavimas.

13. Šio priedo A.4 skyrius. Garų slėgis.

14. Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623–626.

15. Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2–1 to 2–52.

16. Leo A, Weininger D (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

17. Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

18. Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.

19. ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

20. Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.

21. Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479–488.

22. Jübermann O (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386–390.

▼M4

1 priedėlis

Mažiausio vandens tūrio, reikalingo aptikti bandomąsias chemines medžiagas su įvairiomis log P_{OW} vertėmis vandeninėje fazėje, skaičiuoklė

Prielaidos:

— mažiausias atskirų alikvotinių tirpalo dalių tūris – 10 % viso tūrio, penkių alikvotinių tirpalo dalių – 50 % viso tūrio,

— bandomuju cheminiu medžiagu koncentracija = 0,7 × tirpumas kiekvienoje fazeje. Esant mažesnėms koncentracijoms, gali reikėti didesnio tūrio,

— tūris, reikalingas norint nustatyti aptikimo ribą (AR): 100 ml,

— log P_{ow}/log S_w ir log P_{ow}/SR (S_{oct}/S_w) yra patikimos bandomosioms cheminėms medžiagoms taikytinų tarpusavio priklausomybių išraiškos.

S_w įvertis

log P_{ow}	Lygtis	log S_w	S_w (mg/l)
4	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,035	1,084E+00
5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 0,426	3,750E-01
5,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 0,887	1,297E-01
6	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 1,348	4,487E-02
6,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 1,809	1,552E-02
7	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 2,270	5,370E-03
7,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 2,731	1,858E-03
8	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 3,192	6,427E-04

$S_{okt.}$ įvertis

log P_{ow}	Lygtis	S_{oct} (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,49$	2,710E+05

▼**M4**

Bendra bandomosios cheminės medžiagos masė (mg)	$Masė_{okt.}/Masė_{vand.}$	$Masė_{H2O}$ (mg)	$Konc._{H2O}$ (mg/l)	$Masė_{okt.}$ (mg)	$Konc._{okt.}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Tūrio apskaičiavimas

Mažiausias tūris, reikalingas H_2O fazei pagal kiekvieną AR koncentraciją

$\log K_{ow}$	AR (μg/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Tūris, naudojamas norint nustatyti AR (I)	0,1					

Skaičiavimų paaiškinimai:

Sudaro mažiau kaip 10 % viso vandeninės fazės tūrio, naudojant 1 litro talpos pusiausvirinimo indą.

Sudaro mažiau kaip 10 % viso vandeninės fazės tūrio, naudojant 2 litrų talpos pusiausvirinimo indą.

Sudaro mažiau kaip 10 % viso vandeninės fazės tūrio, naudojant 5 litrų talpos pusiausvirinimo indą.

Sudaro mažiau kaip 10 % viso vandeninės fazės tūrio, naudojant 10 litrų talpos pusiausvirinimo indą.

Daugiau kaip 10 % naudojant net 10 litrų talpos pusiausvirinimo indą.

▼M4

Reikalingų tūrių, kaip tirpumo vandenyje ir log P_{OW} funkcijos, apžvalga

Mažiausias tūris, reikalingas H_2O fazei pagal kiekvieną AR koncentraciją (ml)

log P_{ow}	S_w (mg/l)	AR (μg/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

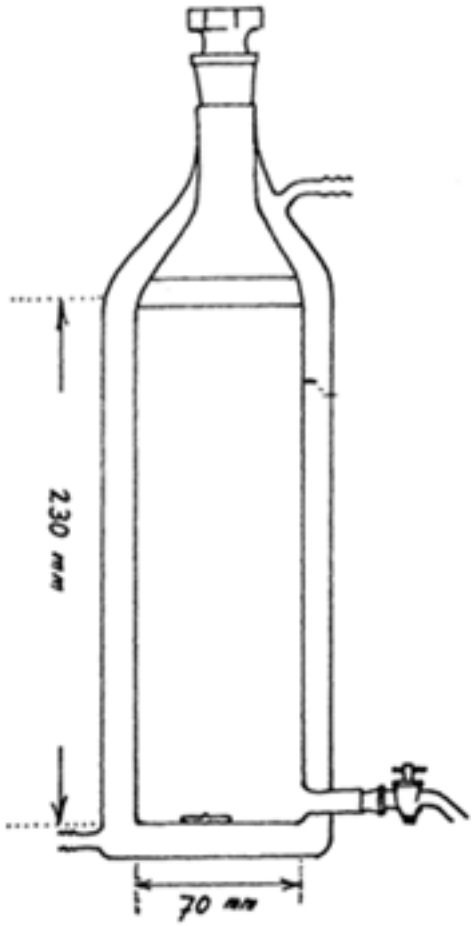
▼**M4**

log P_{ow}	S_w (mg/l)	AR (μg/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Tūris, naudojamas norint nustatyti AR (I)		0,1					

▼M4

2 priedėlis

Per lėto maišymo bandymą, skirtą nustatyti P_{OW}, naudojamo stiklu gaubto bandymų indo pavyzdys



▼M6

A.24. PASISKIRSTYMO (N-OKTANOLIO / VANDENS) KOEFICIENTAS. DIDELIO SLĖGIO SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJOS (HPLC) METODAS

ĮVADAS

Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 117 (2004).

1. Pasiskirstymo koeficientas (P) apibrėžiamas kaip medžiagos, ištirpintos dvifazėje dviejų iš esmės nesimaišančių tirpiklių sistemoje, pusiausvyros koncentracijų tuose tirpikliuose santykis. Jeigu pasirinkti tirpikliai yra n-oktanolis ir vanduo, tai:

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{oktanolis}}{C_{\text{vanduo}}}$$

Kadangi pasiskirstymo koeficientas yra dviejų koncentracijos verčių dalmuo, jis yra nedimensinis dydis, paprastai išreiškiamas dešimtainiu logaritmu.

2. Tiriant cheminių medžiagų išlikimą aplinkoje, P_{ow} yra vienas svarbiausių tyrimo parametrų. Įrodyta, kad tarp nejonizuotos formos medžiagų P_{ow} ir jų biologinio kaupimosi žuvyse esama labai svarbaus ryšio. Taip pat įrodyta, kad P_{ow} parametrą pravartu žinoti prognozuojant medžiagų įgertį į dirvožemį bei dugnines nuosėdas ir nustatant kiekybinius medžiagų struktūros ir savybių ryšius, svarbius tiriant labai įvairų biologinį jų poveikį.

3. Taikyti šį bandymo metodą iš pradžių pasiūlyta remiantis C. V. Eadsforth ir P. Moser straipsniu (1). Šio bandymo metodo kūrimą ir EBPO tarplaboratorinį lyginamąjį bandymą 1986 m. koordinavo Vokietijos Federacinės Respublikos aplinkos apsaugos agentūra *Umweltbundesamt* (2).

PRADINIAI SVARSTYMAI

4. Intervale nuo – 2 iki 4 (kai kada iki 5 ar daugiau) esančios *log* P_{ow} vertės [1] gali būti nustatomos atliekant bandymą pagal kratomos kolbos metodą (šio priedo A.8 skyrius, EBPO bandymo gairės Nr. 107). Taikant HPLC metodą *log* P_{ow} intervalas yra nuo 0 iki 6 (1), (2), (3), (4), (5). Pagal pastarąjį metodą gali reikėti apskaičiuoti P_{ow} įvertį, kad būtų galima parinkti tinkamas etalonines medžiagas ir patvirtinti bet kokias iš bandymo duomenų padarytas išvadas. Apskaičiavimo metodai trumpai aptarti šio bandymo metodo aprašymo priedėlyje. Didelio slėgio skysčių chromatografija (HPLC) atliekama izokratiniu būdu.

5. P_{ow} vertės priklauso nuo tokių aplinkos sąlygų kaip temperatūra, pH, joninė jėga ir t. t., todėl, siekiant teisingai aiškinti P_{ow} duomenis, šios sąlygos turėtų būti nustatytos atliekant bandymą. Galbūt bus sukurtas kitas metodas jonizuojamoms medžiagoms (žr., pvz., EBPO gairių dėl pH matavimo metodo taikymo jonizuotoms medžiagoms projektą (6)), kurį būtų galima taikyti kaip alternatyvų metodą. Nors šių EBPO gairių projektu gali būti tinkama remtis nustatant tokių jonizuojamų medžiagų P_{ow}, kai kuriais atvejais labiau tinka taikyti HPLC metodą, pasirinkus aplinkai būdingą pH lygį (žr. 9 skirsnį).

[1] Viršutinė riba nurodyta todėl, kad patikslinus pasiskirstymo pusiausvyrą, prieš imant pavyzdžius analiziniams nustatymams, abu sluoksniai turi visiškai atsiskirti vienas nuo kito. Dirbant kruopščiai, P_{ow} verčių viršutinė riba gali būti dar aukštesnė.

▼M6

METODO PRINCIPAS

6. Atvirkštinių fazių HPLC atliekama naudojant analizės kolonėles, įkrautas rinkoje parduodamomis kietosiomis fazėmis su ilgomis angliavandenių grandinėmis (pvz., C8, C18), chemiškai sujungtomis su silicio dioksidu.

7. Į tokią kolonėlę įšvirkšta cheminė medžiaga, pernešama judančiosios fazės, kolonėlėje pasiskirsto tarp judančiosios tirpiklio fazės ir nuostoviosios angliavandenių fazės. Šiose fazėse medžiagos sulaikomos proporcingai jų pasiskirstymo angliavandenių terpėje ir vandenyje koeficientui: pirmiausia eliuuojamos hidrofilinės, paskiausia – lipofilinės medžiagos. Medžiagų sulaikymo trukmė apibūdinama sulaikymo gebos koeficientu *k*, kuris išreiškiamas formule

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

kurioje t_R yra bandomosios medžiagos sulaikymo trukmė, o t_0 – laukimo trukmė, t. y. kiek laiko vidutiniškai reikia tirpiklio molekulei prasiskverbti per kolonėlę. Kiekybinių analizės metodų taikyti nebūtina – tereikia nustatyti sulaikymo trukmę.

8. Bandomosios medžiagos oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientą galima apskaičiuoti bandymu nustatant jos sulaikymo gebos koeficientą *k* ir įrašant *k* į lygtį

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

kurioje

a ir *b* yra tiesinės regresijos koeficientai.

Šią lygtį galima sudaryti taikant tiesinę regresiją etaloninių medžiagų oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientų logaritmams tų etaloninių medžiagų sulaikymo gebos koeficientų logaritmų atžvilgiu.

9. Taikant atvirkštinių fazių HPLC metodą galima gauti pasiskirstymo koeficientų *log* P_{ow} įverčius intervale nuo 0 iki 6, tačiau išimtiniais atvejais *log* P_{ow} gali siekti ir nuo 6 iki 10, todėl gali reikėti pakeisti judančiąją fazę (3). Šis metodas netinka stiprioms rūgštims ir bazėms, kompleksiniams metalų junginiams, su eliuentu reaguojančioms medžiagoms ar paviršinio aktyvumo medžiagoms. Nejonizuotos formos jonizuojamų medžiagų (laisvųjų rūgščių arba laisvųjų bazių) matavimus galima atlikti tik naudojant tinkamą buferinį tirpalą, kurio pH lygis nesiektų pK_a (laisvosios rūgšties) arba viršytų pK_a (laisvosios bazės). Taip pat galbūt bus sukurtas jonizuojamų medžiagų bandymo pH-metrinis metodas (6), kurį būtų galima taikyti kaip alternatyvų metodą (6). Jeigu *log* P_{ow} vertė nustatoma siekiant klasifikuoti aplinkai gresiančius pavojus ar vertinti riziką aplinkai, bandymo pH intervalas turėtų būti toks pat, kaip gamtinėje aplinkoje, t. y. nuo 5,0 iki 9.

10. Kartais gautų rezultatų aiškinimas gali būti sudėtingas dėl priemaišų, dėl kurių sunku grafike tinkamai priskirti smailes. Jeigu tiriant mišinį gauti rezultatai sudaro neišskaidytą juostą, ataskaitoje reikėtų nurodyti viršutinę ir žemutinę *log* P_{ow} ribas ir kiekvienos *log* P_{ow} smailės procentinį plotą. Homologinės grupės mišinių atveju taip pat reikėtų nurodyti svertinį *log* P_{ow} vidurkį (7), apskaičiuotą pagal atskiras P_{ow} vertes ir atitinkamų smailių ploto procentines vertes (8). Skaičiuojant reikėtų atsižvelgti į visas smailes, kurios užima 5 % arba daugiau bendro visų smailių ploto (9):

▼**M6**

$$\log\ P_{ow}\ svertinis\ vidurkis = \frac{\sum_i(\log\ P_{owi})(\%\ ploto)}{bendras\ smailių\ plotas\ \%} = \frac{\sum(log\ P_{owi})(\%_i ploto)}{\sum_i \%\ ploto}$$

Svertinį *log* P_{ow} vidurkį tinka naudoti tik tada, kai cheminės medžiagos arba mišiniai (pvz., talo alyvos) priklauso homologinei eilei, kaip antai alkanų grupei. Atliekant mišinių matavimus, patikimus rezultatus galima gauti naudojant analitinį detektorių, jei jis vienodai jautriai reaguoja į visas mišinio sudėtyje esančias medžiagas ir jei jas būtų galima tinkamai atskirti.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

11. Prieš taikant šį metodą reikėtų žinoti bandomosios medžiagos disociacijos konstantą, struktūrinę formulę ir tirpumą judančiojoje fazėje. Taip pat naudinga turėti informacijos apie jos hidrolizę.

KOKYBĖS KRITERIJAI

12. Kad matavimai būtų patikimesni, reikiami nustatymai turi būti atliekami po du kartus.

— Pakartojamumas. Kartojant matavimus vienodomis sąlygomis ir naudojant tas pačias etalonines medžiagas, gautos *log* P_{ow} vertės turėtų sutapti ± 0,1 *log* vieneto tikslumu.

— Atkuriamumas. Jeigu kartojant matavimus naudojamos kitos etaloninės medžiagos, galima gauti skirtingus rezultatus. Pasirinktų bandomųjų medžiagų log k ir log Pow santykio koreliacijos koeficientas R paprastai yra apie 0,9 ir atitinka oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientą log Pow + 0,5 log vieneto tikslumu.

13. Per tarplaboratorinį lyginamąjį bandymą nustatyta, kad taikant HPLC metodą galima gauti *log* P_{ow} vertes, ± 0,5 vieneto besiskiriančias nuo pagal kratomos kolbos metodą gaunamų verčių (2). Daugiau palyginimų galima rasti literatūros šaltiniuose (4), (5), (10), (11), (12). Tiksliausi rezultatai gaunami iš koreliacijos grafikų, sudarytų naudojant struktūriškai susijusias etalonines medžiagas (13).

ETALONINĖS MEDŽIAGOS

14. Siekiant susieti išmatuotą cheminės medžiagos sulaikymo gebos koeficientą *k* su jos P_{ow} reikia nubrėžti bent 6 taškų kalibracinę kreivę (žr. 24 skirsnį). Tinkamas etalonines medžiagas parenka naudotojas. Bandomosios medžiagos *log* P_{ow} turėtų patekti į etaloninių medžiagų *log* P_{ow} verčių intervalą, t. y. bent vienos etaloninės medžiagos P_{ow} turėtų būti didesnis, o kitos – mažesnis negu bandomosios medžiagos P_{ow}. Ekstrapoliavimą reikėtų taikyti tik išimtiniais atvejais. Patartina naudoti bandomajai medžiagai struktūriškai artimas etalonines medžiagas. Etaloninių medžiagų *log* P_{ow} vertės kalibravimui turėtų būti gautos iš patikimų bandymų duomenų, tačiau kai medžiagoms būdingos didelės (paprastai viršijančios 4) *log* P_{ow} vertės, o patikimų bandymų duomenų nėra, galima naudoti apskaičiuotas vertes. Jeigu naudojamos ekstrapoliuotos vertės, reikėtų nurodyti ribinę vertę.

15. Yra paskelbti daugelio cheminių medžiagų grupių *log* P_{ow} verčių išsamūs sąrašai (14) (15). Jeigu nėra duomenų apie struktūriškai artimų medžiagų pasiskirstymo koeficientus, galima atlikti daugiau bendro pobūdžio kalibravimą naudojant kitas etalonines medžiagas. Rekomenduojamos etaloninės medžiagos ir jų P_{ow} vertės išvardytos 1 lentelėje. Jonizuojamų medžiagų atveju joje nurodytos nejonizuotos formos vertės. Šių verčių patikimumas ir kokybė patikrinti per tarplaboratorinį lyginamąjį bandymą.

▼**M6**

1 lentelė.

Rekomenduojamos etaloninės medžiagos

	CAS Nr.	Etaloninė medžiaga	log P_{ow}	pKa
1	78-93-3	2-butanonas (metiletilketonas)	0,3	
2	1122-54-9	4-acetilpiridinas	0,5	
3	62-53-3	Anilinas	0,9	
4	103-84-4	Acetanilidas	1,0	
5	100-51-6	Benzilo alkoholis	1,1	
6	150-76-5	4-metoksifenolis	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Fenoksiacto rūgštis	1,4	pKa = 3,12
8	108-95-2	Fenolis	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-dinitrofenolis	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Benznitrilas	1,6	
11	140-29-4	Fenilacetonitrilas	1,6	
12	589-18-4	4-metilbenzilo alkoholis	1,6	
13	98-86-2	Acetofenonas	1,7	
14	88-75-5	2-nitrofenolis	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	3-nitrobenzenkarboninė rūgštis	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-chloranilinas	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitrobenzenas	1,9	
18	104-54-1	Cinamilo alkoholis (stirolis)	1,9	
19	65-85-0	Benzenkarboksirūgštis	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-krezolis	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	Cinamono rūgštis	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	Anizolas	2,1	
23	93-58-3	Metilbenzenkarboksilatas	2,1	
24	71-43-2	Benzenas	2,1	
25	99-04-7	3-metilbenzenkarboninė rūgštis	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-chlorfenolis	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Trichloretilenas	2,4	
28	1912-24-9	Atrazinas	2,6	
29	93-89-0	Etilbenzenkarboksilatas	2,6	

▼**M6**

	CAS Nr.	Etaloninė medžiaga	log P_{ow}	pKa
30	1194-65-6	2,6-dichlorbenznitrilas	2,6	
31	535-80-8	3-chlorbenzenkarboninė rūgštis	2,7	pKa = 3,82
32	108-88-3	Toluenas	2,7	
33	90-15-3	1-naftolis	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-dichloranilinas	2,8	
35	108-90-7	Chlorbenzenas	2,8	
36	1746-13-0	Alilfenileteris	2,9	
37	108-86-1	Brombenzenas	3,0	
38	100-41-4	Etilbenzenas	3,2	
39	119-61-9	Benzofenonas	3,2	
40	92-69-3	4-fenilfenolis	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Timolis	3,3	
42	106-46-7	1,4-dichlorbenzenas	3,4	
43	122-39-4	Difenilaminas	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naftalenas	3,6	
45	93-99-2	Fenilo benzoatas	3,6	
46	98-82-8	Izopropilbenzenas	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-trichlorfenolis	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Bifenilas	4,0	
49	120-51-4	Benzilbenzenkarboksilatas	4,0	
50	88-85-7	2,4-dinitro-6-(antr- butil)-fenolis	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-trichlorbenzenas	4,2	
52	143-07-7	Dodekano rūgštis	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Difenileteris	4,2	
54	85-01-8	Fenantrenas	4,5	
55	104-51-8	n-butilbenzenas	4,6	
56	103-29-7	Dibenzilas	4,8	
57	3558-69-8	2,6-difenilpiridinas	4,9	
58	206-44-0	Fluorantenas	5,1	
59	603-34-9	Trifenilaminas	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

▼M6

METODO APRAŠYMAS

Pasiskirstymo koeficiento išankstinis įvertis

16. Jei būtina nustatyti apytikrį bandomosios medžiagos pasiskirstymo koeficientą, geriausia tai daryti taikant apskaičiavimo metodą (žr. priedėlį) arba, kai tinka, naudojant bandomosios medžiagos tirpumo grynuose tirpikliuose santykį.

Aparatūra

17. Bandymui atlikti reikalingas skystafazis chromatografas su mažai pulsuojančiu siurbliu ir tinkama aptikimo sistema. Daugelio įvairių grupių cheminėms medžiagoms tinka naudoti 210 nm bangų ilgio UV detektorių arba lūžio rodiklio (RI) detektorių. Nuostoviojoje fazėje esančios polinės grupės gali labai sutrikdyti HPLC kolonėlės veikimą, todėl polinių grupių procentas nuostoviosiose fazėse turėtų būti minimalus (16). Galima naudoti rinkoje parduodamas mikrodalelių atvirkštinių fazių įkrovas arba jau įkrautas kolonėles. Tarp įšvirkštimo sistemos ir analizės kolonėlės gali būti įdėta apsauginė kolonėlė.

Judančioji fazė

18. Eliuentinis tirpiklis ruošiamas iš HPLC tinkamo metanolio ir distiliuoto arba dejonizuoto vandens ir prieš naudojant nudujinamas. Eliuavimas turėtų būti izokratinis. Metanolio ir vandens santykis turėtų būti toks, kad vandens būtų ne mažiau kaip 25 %. Medžiagoms, kurių *log* P = 6, eliuuoti per valandą, esant 1 ml/min. debitui, paprastai pakanka, kad metanolio ir vandens santykis mišinyje būtų 3:1 (tūriniais procentais). Kai medžiagos *log* P viršija 6, eliuavimo (taip pat ir etaloninių medžiagų) trukmę gali reikėti sutrumpinti sumažinant judančiosios fazės poliškumą arba sutrumpinant kolonėlę.

19. Bandomoji ir etaloninės medžiagos turi būti tirpios judančiojoje fazėje ir pakankamos koncentracijos, kad jas būtų galima aptikti. Į metanolio ir vandens mišinį priedų galima dėti tik išimtiniais atvejais, nes jie keičia kolonėlės savybes. Tokiais atvejais būtina įsitikinti, kad naudojami priedai nekeičia bandomosios medžiagos ir etaloninių medžiagų sulaikymo trukmės. Jeigu metanolio ir vandens mišinys netinka, galima naudoti kito organinio tirpiklio ir vandens (pvz., etanolio ir vandens, acetonitrilo ir vandens arba izopropilo alkoholio (2-propanolio) ir vandens) mišinius.

20. Eliuento pH vertė yra itin svarbi jonizuojamoms medžiagoms. Ji turėtų patekti į kolonėlei eksploatuoti tinkamų pH verčių intervalą (paprastai 2–8). Patartina naudoti buferinius tirpalus. Naudojant kai kuriuos organinės fazės ir buferinio tirpalo mišinius reikia saugotis, kad nesusidarytų druskų nuosėdų, ir nesugadinti kolonėlės. Paprastai nepatartina naudoti kvarcinių nuostoviųjų fazių HPLC matavimams tada, kai pH viršija 8, nes dėl naudojamos šarminės judančiosios fazės gali greitai pablogėti kolonėlės veikimas.

Tirpiniai

21. Bandomosios ir etaloninės medžiagos turi būti pakankamai grynos, kad chromatogramose būtų galima priskirti smailes atitinkamoms medžiagoms. Bandymui arba kalibravimui naudojamos medžiagos, kai įmanoma, ištirpinamos judančiojoje fazėje. Jeigu bandomoji ir etaloninės medžiagos tirpinamos ne judančiojoje fazėje, o kitame tirpiklyje, judančiąją fazę reikėtų naudoti galutiniam atskiedimui prieš įšvirkščiant į kolonėlę.

Bandymo sąlygos

22. Temperatūra atliekant matavimą neturėtų svyruoti daugiau kaip ± 1 °C.

▼M6

Laukimo trukmės t_o nustatymas

23. Laukimo trukmę t_0 galima nustatyti naudojant tokias organines medžiagas, kurios nėra sulaikomos (pvz., tiokarbamidą arba formamidą). Laukimo trukmę tiksliau nustatyti galima pagal išmatuotą sulaikymo trukmę arba naudojant maždaug septynis homologinės eilės narius (pvz., n-alkilmetilketonus) (17). Sulaikymo trukmė t_R (n_C+ 1) grafike pavaizduojama kaip t_R (n_C) funkcija; n_C yra anglies atomų skaičius. Gaunama tiesė t_R (n_C + 1) = A t_R (n_C) + (1 – A) t_0; A šiuo atveju yra k(n_C + 1)/k(n_C) atitinkanti konstanta. Laukimo trukmė t_0 nustatoma iš atkarpos (1 – A)t_0 ir krypties koeficiento A.

Regresijos lygtis

24. Tada sudaromas tinkamų etaloninių medžiagų, kurių *log* P vertės yra artimos numatomai bandomosios medžiagos *log* P vertei, *log* k ir *log* P santykio koreliacijos grafikas. Praktikoje vienu kartu įšvirkščiama 6–10 etaloninių medžiagų ir nustatoma jų sulaikymo trukmė (geriausia tai padaryti įrašančiuoju integratoriumi, sujungtu su aptikimo sistema). Atitinkami sulaikymo gebos koeficientų logaritmai *log* k grafike pavaizduojami kaip *log* P funkcija. Siekiant atsižvelgti į galimus kolonėlės veikimo pokyčius, regresijos lygtis sudaroma reguliariais laiko intervalais, ne rečiau kaip kartą per dieną.

BANDOMOSIOS MEDŽIAGOS P_{OW} NUSTATYMAS

25. Įšvirkščiamas kuo mažesnis bandomosios medžiagos kiekis – tik tiek, kad ją būtų įmanoma aptikti. Jos sulaikymo trukmė nustatoma matuojant du kartus. Bandomosios medžiagos pasiskirstymo koeficientas gaunamas interpoliuojant apskaičiuotą sulaikymo gebos koeficientą kalibracinėje kreivėje. Kai pasiskirstymo koeficientai yra labai maži arba labai dideli, būtina atlikti ekstrapoliaciją. Tokiais atvejais ypač svarbu atkreipti dėmesį į regresijos tiesės pasikliovimo ribas. Jeigu ėminio sulaikymo trukmė nepatenka į nustatytą standartinių etaloninių medžiagų sulaikymo trukmės verčių intervalą, reikėtų nurodyti ribinę vertę.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Bandymo ataskaita

26. Ataskaitoje turi būti nurodyta:

— (jei nustatytas) preliminarus pasiskirstymo koeficiento įvertis, apskaičiuotos vertės ir pasirinktas metodas;

— jei taikytas apskaičiavimo metodas – išsamus jo aprašymas, be kita ko, nurodant naudotą duomenų bazę ir pateikiant išsamią informaciją apie fragmentų pasirinkimą;

— bandomoji medžiaga ir etaloninės medžiagos: jų grynumas, struktūrinė formulė ir CAS numeris;

— naudotos įrangos ir darbo sąlygų aprašymas: analizės kolonėlė, apsauginė kolonėlė, judančioji fazė, aptikimo priemonės, temperatūros intervalas, pH;

— eliuavimo profiliai (chromatogramos);

— laukimo trukmė ir kaip ji nustatyta;

— kalibravimui naudotų etaloninių medžiagų sulaikymo duomenys ir iš literatūros šaltinių gautos jų *log* P_{ow} vertės;

— pritaikytos regresijos tiesės (*log* k pagal *log* P_{ow}) duomenys ir jos koreliacijos koeficientas, įskaitant pasikliautinuosius intervalus;

▼**M6**

— vidutiniai bandomosios medžiagos sulaikymo duomenys ir interpoliuota *log* P_{ow} vertė;

— mišinio atveju – eliuavimo profilio chromatograma su nurodytomis ribomis;

— *log* P_{ow} vertės pagal *log* P_{ow} smailės procentinį plotą;

— apskaičiavimas naudojant regresijos tiesę;

— apskaičiuotas svertinis *log* P_{ow} verčių vidurkis, jei jis buvo apskaičiuotas.

NUORODOS

(1) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. Chemosphere. 12, 1459.

(2) W. Klein, W. Körde1, M. Weiss and H.J. Poremski. (1988). Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method. Chemosphere. 17, 361.

(3) C.V. Eadsforth. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. Pesticide Science. 17, 311.

(4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. Pesticide. Science. 12, 219.

(5) B. McDuffie (1981). Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. Chemosphere. 10, 73.

(6) OECD (2000). Guideline for Testing of Chemicals – Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances. Draft Guideline, November 2000.

(7) OSPAR (1995). „Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995“, Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20–24 February 1995.

(8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez and C. C. Karman. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3. August.

(9) E. A. Vik, S. Bakke and K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. Environmental Modelling & Software Vol. 13, pp. 529-537.

(10) L.O. Renberg, S.G. Sundstroem and K. Sundh-Nygård. (1980). Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes. Chemosphere. 9, 683.

(11) W.E. Hammers, G.J.Meurs and C.L. De-Ligny. (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. J. Chromatography 247, 1.

(12) J.E. Haky and A.M. Young. (1984). Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. J. Liq. Chromatography. 7, 675.

(13) S. Fujisawa and E. Masuhara. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography. Journal of Biomedical Materials Research. 15, 787.

▼**M6**

(14) C. Hansch and A. J. Leo. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Willey, New York.

(15) C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir. (1982). Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity – Available from Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.

(16) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ther. 14, 479.

(17) G.E. Berendsen, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony, and J. Inczédy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. J. Liq. Chromato. 3, 1669.

▼M6

Priedėlis

P_{OW} apskaičiavimo metodai

ĮVADAS

1. Šiame priedėlyje pateiktas trumpas įvadas, kaip apskaičiuoti P_{ow}. Daugiau informacijos ieškokite literatūroje (1), (2).

2. Apskaičiuotos P_{ow} vertės naudojamos:

— sprendžiant, kurį bandymo metodą taikyti: kai *log* P_{ow} yra nuo – 2 iki 4, taikomas kratomos kolbos metodas, o kai *log* P_{ow} yra nuo 0 iki 6 – HPLC metodas;

— nustatant, kokiomis sąlygomis reikėtų atlikti HPLC (etalonines medžiagas, metanolio ir vandens santykį);

— tikrinant bandymo metodais gautų verčių patikimumą;

— kai bandymo metodai netaikytini, tinkamam įverčiui nustatyti.

Apskaičiavimo metodų esmė

3. Šiame priedėlyje siūlomi apskaičiavimo metodai pagrįsti teoriniu molekulės dalijimu į atitinkamas mažesnes struktūras – fragmentus, kurių patikimi *log* P_{ow} dydžiai yra žinomi; *log* P_{ow} gaunamas sudedant tų fragmentų vertes ir intramolekulinių sąveikų pataisos dėmenis. Molekulių fragmentų konstantų ir pataisos dėmenų sąrašai paskelbti literatūroje (1), (2), (3), (4), (5), (6). Kai kurie iš jų reguliariai atnaujinami (3).

Apskaičiuotų verčių patikimumas

4. Apskritai kuo sudėtingesnė medžiaga tiriama, tuo mažiau galima pasikliauti apskaičiavimo metodais. Nesudėtingų, mažos molekulinės masės, tik vieną ar dvi funkcines grupes turinčių molekulių atveju tarp įvairiais fragmentavimo metodais gautų rezultatų ir matavimais nustatytų verčių galima tikėtis 0,1–0,3 *log* P_{ow} vieneto nuokrypio. Paklaidos dydis priklausys nuo taikomų fragmentų konstantų patikimumo, gebėjimo atpažinti intramolekulines sąveikas (pvz., vandenilio jungtis) ir tinkamo pataisos dėmenų naudojimo. Jonizuojamų medžiagų atveju būtina atsižvelgti į jonų krūvį ir jonizacijos laipsnį (10).

Fujita-Hansch π metodas

5. Fujita *et al.* (7) nustatyta hidrofobinio pakaito darinio konstanta π apibrėžiama taip:

$$^{\pi}X = \log P_{ow}\,(PhX) - \log P_{ow}\,(PhH)$$

Šioje formulėje PhX yra aromatinis darinys, o PhH – pradinė medžiaga,

$$\text{pvz.:}\quad ^{\pi}Cl = \log P_{ow}\,(C6H5Cl) - \log P_{ow}\,(C6H6)$$
$$= 2{,}84 - 2{,}13$$
$$= 0{,}71$$

Šis π metodas visų pirma taikomas aromatinėms medžiagoms. Daugelio pakaitų π vertės pateiktos literatūroje (4), (5).

Rekker metodas

6. Pagal Rekker metodą (8) *log* P_{ow} vertė apskaičiuojama taip:

$$Log\ P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{sąveikosdėmenys})$$

▼M6

Šioje formulėje a_i yra tam tikro fragmento pasikartojimų molekulėje skaičius, o f_i – to fragmento *log* P_{ow} inkrementinis dydis. Sąveikos dėmenys gali būti išreiškiami kaip vienos atskiros konstantos C_m (vadinamosios „magiškosios konstantos“) sveikasis kartotinis. Fragmentų konstantos f_i ir C_m nustatytos iš 1 054 eksperimentinių P_{ow} verčių (825 medžiagų) sąrašo, atlikus daugianarę regresinę analizę (6), (8). Sąveikos dėmenys nustatomi pagal konkrečias taisykles (6), (8), (9).

Hansch-Leo metodas

7. Pagal Hansch ir Leo metodą (4) *log* P_{ow} vertė apskaičiuojama taip:

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

Šioje formulėje f_i yra fragmento konstanta, F_j – pataisos dėmuo (faktorius), a_i ir b_j – atitinkamas kartojimosi dažnis. Atomų ir grupių fragmentinių verčių ir pataisos dėmenų F_j sąrašai sudaryti pagal bandymų ir klaidų metodą naudojant eksperimentines P_{ow} vertes. Pataisos dėmenys suskirstyti į kelias klases (1), (4). Sukurta speciali programinė įranga padeda dirbant atsižvelgti į visas taisykles ir pataisos dėmenis (3).

MIŠRUSIS METODAS

8. Sudėtingų molekulių *log* P_{ow} galima kur kas tiksliau apskaičiuoti dalijant molekulę į didesnes struktūrines dalis, kurių patikimos *log* P_{ow} vertės yra nurodytos lentelėse (3), (4) arba nustatytos matavimais. Tada tokių fragmentų (pvz., heterociklų, antrachinono, azobenzeno) vertes galima derinti su vertėmis, gautomis pagal Hansch π metodą, arba su Rekker ar Leo metodo fragmentų konstantomis.

Pastabos

i) Apskaičiavimo metodai taikytini tik iš dalies arba visiškai jonizuotoms medžiagoms, atsižvelgiant į būtinus pataisos faktorius.

ii) Jei galima tikėtis esant intramolekulinių vandenilinių jungčių, būtina pridėti atitinkamus pataisos dėmenis (maždaug nuo +0,6 iki +1,0 *log* P_{ow} vieneto) (1). Tokių jungčių buvimą galima nustatyti naudojant erdvinius modelius arba spektroskopinius duomenis.

iii) Jeigu yra kelios galimos tautomerinės formos, skaičiavimus reikėtų atlikti naudojant labiausiai tikėtiną formą.

iv) Reikėtų atidžiai sekti fragmentų konstantų sąrašų keitimus.

NUORODOS APIE APSKAIČIAVIMO METODUS

(1) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982).

(2) W.J. Dunn, J.H. Block and R.S. Pearlman (ed.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) and Oxford (1986).

(3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(4) C. Hansch and A.J. Leo. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).

▼**M6**

(5) Leo, C. Hansch and D. Elkins. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical. Reviews*. 71, 525.

(6) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem*. – *Chim. Ther.* 14, 479.

(7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa & Corwin Hansch (1964). A New Substituent Constant, π, Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc*. 86, 5175.

(8) R.F. Rekker. The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Vol. 1, Elsevier, New York (1977).

(9) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere.* 12, 1459.

(10) R.A. Scherrer. ACS – Symposium Series 255, p. 225, American Chemical Society, Washington, D.C. (1984).

▼M7

A.25. DISOCIACIJOS VANDENYJE KONSTANTOS (TITRAVIMO METODAS. SPEKTROFOTOMETRINIS METODAS. KONDUKTOMETRINIS METODAS)

ĮVADAS

Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) 112 (1981 m.).

Būtinos sąlygos

— Tinkamas analizės metodas

— Tirpumas vandenyje

Nurodomoji informacija

— Struktūrinė formulė

— Elektrinis laidis taikant konduktometrinį metodą

Tikslinamieji pareiškimai

— Visus bandymo metodus galima atlikti naudojant grynas ar techninio grynumo medžiagas. Reikėtų atsižvelgti į galimą priemaišų poveikį rezultatams.

— Titravimo metodas netinka mažai tirpioms medžiagoms (žr. toliau *Bandymo tirpalai*).

— Spektrofotometrinis metodas tinka tik toms medžiagoms, kurių disocijuotos ir nedisocijuotos formų UV/VIS absorbcijos spektrai žymiai skiriasi. Šis metodas taip pat gali tikti mažai tirpioms medžiagoms ir vykstant ne rūgštinei / bazinei disociacijai, pvz., susidarant kompleksams.

— Jei galioja Onzagerio lygtis, galima taikyti konduktometrinį metodą, netgi esant gana mažai koncentracijai ir netgi nesant rūgštinės / bazinės pusiausvyros.

Tipiniai dokumentai

Šis bandymo metodas pagrįstas metodais, pateiktais skirsnyje *Literatūra* išvardytose nuorodose ir EPA priešgamybinio pranešimo preliminariniame vadovo projekte, 1978 m. rugpjūčio 18 d.

METODAS. BANDYMO ĮVADAS, TIKSLAS, TAIKYMO SRITIS, SVARBA, TAIKYMAS IR RIBOS

Cheminės medžiagos disociacija vandenyje yra svarbi vertinant jos poveikį aplinkai. Ji daro įtaką medžiagos formai, kuri savo ruožtu lemia jos elgseną ir transportavimą. Ji gali veikti cheminės medžiagos adsorbciją dirvožemyje ir nuosėdose bei jos absorbciją į biologines ląsteles.

Apibrėžtys ir vienetai

Disociacija yra grįžtamasis skilimas į dvi ar daugiau cheminių dalelių, kurios gali būti joninės. Procesas paprastai žymimas taip:

$$RX \rightleftharpoons R^{+} + X^{-}$$

reakciją apibūdinanti koncentracijos pusiausvyros konstanta yra:

$$K = \frac{[R^{+}][X^{-}]}{[RX]}$$

pavyzdžiui, konkrečiu atveju, kai R yra vandenilis (medžiaga yra rūgštis), konstanta yra

▼M7

$$K_\alpha = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

arba

$$pK_\alpha = pH - \log\frac{[X^-]}{[HX]}$$

Etaloninės medžiagos

Šias etalonines medžiagas nebūtina naudoti kiekvienu atveju, kai tiriama nauja cheminė medžiaga. Jos pirmiausia pateiktos tam, kad retkarčiais būtų galima atlikti metodo kalibravimą ir būtų galimybė palyginti rezultatus, jei taikomas kitas metodas.

	pK_a ([1])	Temp. °C
p-nitrofenolis	7,15	25 ([1])
Benzenkarboksirūgštis	4,12	20
p-chloranilinas	3,93	20

([1]) Nėra vertės, nustatytos esant 20 °C, bet galima daryti prielaidą, kad matavimo rezultatų kintamumas yra didesnis palyginti su tikėtina priklausomybe nuo temperatūros.

Būtų naudinga turėti kelias pK vertes turinčią cheminę medžiagą, kaip toliau nurodyta skirsnyje *Bandymo metodo principas*. Tokia medžiaga galėtų būti:

Citrinų rūgštis	pK_a (8)	Temperatūra °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Bandymo metodo principas

Aprašytas cheminis procesas paprastai tik šiek tiek priklauso nuo temperatūros aplinkai būdingame temperatūros intervale. Reikia išmatuoti cheminės medžiagos disocijavusios ir nedisocijavusios formų koncentraciją, kad būtų galima nustatyti disociacijos konstantą. Žinant *Apibrėžčių ir vienetų* skyriuje nurodytos disociacijos reakcijos stechiometriją, galima nustatyti atitinkamą konstantą. Šiame bandymo metode aprašytu konkrečiu atveju cheminė medžiaga elgiasi kaip rūgštis ar bazė, todėl patogiausias nustatymo būdas – jonizuotos ir nejonizuotos formų santykinės koncentracijos ir tirpalo pH nustatymas. Santykis tarp šių pK_a lygties narių pateiktas pirmiau *Apibrėžčių ir vienetų* skirsnyje. Kai kurios cheminės medžiagos turi daugiau kaip vieną disociacijos konstantą ir galima sukurti panašias lygtis. Kai kurie iš čia aprašytų metodų taip pat tinka vykstant nerūgštinei / bazinei disociacijai.

Kokybės kriterijai

Pakartojamumas

Reikėtų atlikti kartotinį disociacijos konstantos nustatymą (ne mažiau kaip tris kartus) ± 0,1 log vienetų tikslumu.

BANDYMO PROCEDŪRŲ APRAŠYMAS

Yra du pagrindiniai pK_a nustatymo būdai. Taikant vieną, žinomas cheminės medžiagos kiekis titruojamas etaloniniu rūgšties arba bazės tirpalu; pagal kitą nustatoma jonizuotos ir nejonizuotos formų santykinė koncentracija ir jų priklausomybė nuo pH.

▼M7

Parengiamieji darbai

Šiais principais pagrįsti metodai gali būti klasifikuojami kaip titravimo, spektrofotometrinės ir konduktometrinės procedūros.

Bandymo tirpalai

Taikant titravimo ir konduktometrinį metodą, cheminė medžiaga turėtų būti ištirpinta distiliuotame vandenyje. Taikant spektrofotometrinį ir kitus metodus, naudojami buferiniai tirpalai. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracija neturėtų būti didesnė nei 0,01 mol/l arba viena antroji soties koncentracijos, jei ši mažesnė, o tirpalams ruošti turėtų būti naudojama gryniausia turima medžiagos forma. Jei medžiagos tirpumas vidutinis, ją galima ištirpinti mažame tūryje su vandeniu maišaus tirpiklio prieš padidinant iki pirmiau nurodytų koncentracijos verčių.

Tirpalus reikėtų tikrinti dėl emulsijos susidarymo naudojant Tindalio šviesos pluoštą, ypač jei buvo naudojamas kitas tirpiklis tirpumui padidinti. Jei naudojami buferiniai tirpalai, jų koncentracija neturėtų būti didesnė kaip 0,05 mol/l.

Bandymo sąlygos

Temperatūra

Temperatūra turėtų būti kontroliuojama bent ± 1°C tikslumu. Nustatymą pageidautina atlikti 20 °C temperatūroje.

Jei yra įtarimų dėl reikšmingos priklausomybės nuo temperatūros, nustatymą reikėtų atlikti esant mažiausiai dar dviem temperatūros vertėms. Šiuo atveju temperatūros intervalai turėtų būti 10 °C, o temperatūra kontroliuojama ± 0,1 °C tikslumu.

Analizės

Dėl metodo bus sprendžiama atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos tipą. Jis turi būti pakankamai jautrus, kad būtų galima nustatyti skirtingas daleles esant kiekvienai bandymo tirpalo koncentracijai.

Bandymo eiga

Titravimo metodas

Bandymo tirpalas matuojamas titruojant reikiamu etaloniniu bazės ar rūgšties tirpalu ir matuojant pH po kiekvieno titranto pridėjimo. Iki ekvivalentinio taško titrantą reikėtų įpilti ne mažiau kaip per 10 kartų. Jei pusiausvyra pasiekiama pakankamai greitai, galima naudoti savirašį potenciometrą. Taikant šį metodą nebūtina tiksliai žinoti suminį medžiagos kiekį ir jos koncentraciją. Turi būti imtasi priemonių anglies dioksidui pašalinti. Daugiau informacijos apie procedūrą, atsargumo priemones ir skaičiavimą pateikta tipinių bandymų aprašymuose, pvz., (1), (2), (3), (4) nuorodos.

Spektrofotometrinis metodas

Nustatomas bangos ilgis, kuriam esant cheminės medžiagos jonizuotos ir nejonizuotos formų ekstinkcijos koeficientai žymiai skiriasi. Gaunamas pastovios koncentracijos tirpalų UV/VIS absorbcijos spektras, esant pH vertei, kai medžiaga yra iš esmės nejonizuota ir visiškai jonizuota bei kelioms tarpinėms pH vertėms. Tai galima atlikti nedidelius koncentruotos rūgšties (bazės) kiekius dedant į palyginti didelį cheminės medžiagos daugiakomponenčio buferinio tirpalo tūrį, iš pradžių esant didelei (mažai) pH vertei (nuor. 5), arba pridedant vienodus cheminės medžiagos pradinio tirpalo, pvz., vandenyje, metanolyje, tūrius į pastovius tūrius įvairių buferinių tirpalų, apimančių reikiamą pH intervalą. Pagal pH ir optinio tankio vertes, esant pasirinktam bangos ilgiui, apskaičiuojamas pakankamas pK_a verčių skaičius, naudojant duomenis, gautus bent penkioms pH vertėms, kai cheminė medžiaga yra ne mažiau kaip 10 procentų ir mažiau kaip 90 procentų jonizuota. Papildomi bandymų duomenys ir skaičiavimo metodas pateikti (1) nuorodoje.

▼M7

Konduktometrinis metodas

Naudojant žinomos mažos konstantos celę, matuojamas maždaug 0,1 mol/l cheminės medžiagos tirpalo laidžiui matuoti skirtame vandenyje laidis. Taip pat matuojamos kelių šio tirpalo tiksliai praskiestų tirpalų laidžio vertės. Kiekvieną kartą koncentracija mažinama pusiau, o tirpalų serija turi aprėpti bent vieną koncentracijos dydžių eilę. Ribinis laidis esant begaliniam praskiedimui nustatomas atliekant panašų bandymą su Na druska ir ekstrapoliuojant. Taikant Onzagerio lygtį, pagal kiekvieno tirpalo laidį galima apskaičiuoti disociacijos laipsnį, taigi taikant Ostvaldo praskiedimo dėsnį galima apskaičiuoti disociacijos konstantą kaip $K = \alpha^2C/(1 - \alpha)$, kai C yra koncentracija moliais litre, o α – disociacijos laipsnis. Turi būti imtasi priemonių CO_2 pašalinti. Daugiau informacijos apie bandymo duomenis ir skaičiavimą pateikta tipinių bandymų aprašymuose ir (1), (6) bei (7) nuorodose.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

Titravimo metodas

pK_a apskaičiuojamas 10 matavimo taškų titravimo kreivėje. Apskaičiuojamas tokių pK_a verčių vidurkis ir standartinis nuokrypis. Reikėtų įtraukti pH priklausomybės nuo etaloninio bazės ar rūgšties tirpalo tūrio grafiką ir duomenis lentelių pavidalu.

Spektrofotometriniai metodai

Į lenteles įrašomos kiekvienam spektrui gautos optinio tankio ir pH vertės. Pagal tarpinius spektrinių duomenų taškus apskaičiuojamos ne mažiau kaip penkios pK_a vertės, taip pat apskaičiuojamas šių rezultatų vidurkis ir standartinis nuokrypis.

Konduktometrinis metodas

Ekvivalentinis laidis Λ apskaičiuojamas kiekvienai rūgšties koncentracijai ir kiekvienai mišinio, sudaryto iš vieno ekvivalento rūgšties ir 0,98 ekvivalento karbonato neturinčio natrio hidroksido, koncentracijai. Rūgšties perteklius imamas tam, kad nebūtų OH^- pertekliaus dėl hidrolizės. Gaunamas $1/\Lambda$ kaip $\sqrt{C}$ funkcijos grafikas, o druskos Λ_o gali būti nustatytas atliekant ekstrapoliavimą į nulinę koncentraciją.

Rūgšties Λ_o gali būti apskaičiuotas, naudojant literatūroje pateiktas H^+ ir Na^+ vertes. Kiekvienos koncentracijos pK_a gali būti apskaičiuota pagal $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_o$ ir $K_a = \alpha^2C/(1 - \alpha)$. Tikslesnės K_a vertės gali būti gautos darant judrumo ir aktyvumo pataisas. Reikėtų apskaičiuoti pK_a verčių vidurkį ir standartinius nuokrypius.

Bandymo ataskaita

Reikėtų pateikti visus neapdorotus duomenis, apskaičiuotas pK_a vertes kartu su skaičiavimo metodu (pageidautina lentelės pavidalu, koks siūlomas nuor. 1), taip pat pirmiau aprašytus statistinius parametrus. Jei taikomi titravimo metodai, reikėtų pateikti titrantų standartizavimo duomenis.

Jei taikomas spektrofotometrinis metodas, reikėtų pateikti visus spektrus. Jei taikomas konduktometrinis metodas, ataskaitoje reikėtų pateikti celės konstantos nustatymo duomenis. Reikėtų pateikti informaciją apie naudojamą įrangą, analizės metodus ir visų naudotų buferinių tirpalų tipą.

Reikėtų pateikti bandymo temperatūros vertę (-es).

LITERATŪRA

(1) Albert, A. & Sergeant, E.P.: *Ionization Constants of Acids and Bases,* Wiley, Inc., New York, 1962.

▼**M7**

(2) Nelson, N.H. & Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, Env. Sci. Tech. 3, II, pp. 1186-1188 (1969).

(3) ASTM D 1293 – Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

(4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.

(5) Clark, J. & Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. Chem. Ind. (London) 281, (March 1973).

(6) ASTM D 1125 – Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

(7) Standard Method 205 – APHA/AWWA/NPCF (žr. pirmiau).

(8) *Handbook of Chemistry and Physics,* 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).

▼C1

B DALIS. TOKSIŠKUMO IR KITO POVEIKIO SVEIKATAI NUSTATYMO METODAI

TURINYS

	BENDRASIS ĮVADAS
B.1 bis.	ŪMUS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ. FIKSUOTŲJŲ DOZIŲ METODAS
B.1 tris.	ŪMUS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ. ŪMAUS TOKSIŠKUMO KLASĖS METODAS
B.2.	ŪMUS TOKSIŠKUMAS ĮKVĖPUS
B.3.	ŪMUS TOKSIŠKUMAS (PER ODĄ)
B.4.	ŪMUS TOKSIŠKUMAS. ODOS DIRGINIMAS AR ĖSDINIMAS
B.5.	ŪMUS AKIŲ DIRGINIMAS IR (ARBA) ĖSDINIMAS
B.6.	ODOS JAUTRINIMAS
B.7.	28 DIENŲ GRAUŽIKŲ KARTOTINĖS DOZĖS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ
B.8.	POŪMIS TOKSIŠKUMAS ĮKVĖPUS. 28 DIENŲ TYRIMAS
B.9.	KARTOTINIŲ DOZIŲ (28 DIENŲ) TOKSIŠKUMAS (PER ODĄ)
B.10.	ŽINDUOLIŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJŲ IN VITRO BANDYMAS
B.11.	ŽINDUOLIŲ KAULŲ ČIULPŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJŲ BANDYMAS
B.12.	ŽINDUOLIŲ ERITROCITŲ MIKROBRANDUOLIŲ BANDYMAS
B.13/14.	MUTAGENIŠKUMAS – BAKTERIJŲ GRĮŽTAMŲJŲ MUTACIJŲ BANDYMAS
B.17.	MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ LĄSTELIŲ GENŲ MUTACIJŲ BANDYMAS *IN VITRO*
B.21.	ŽINDUOLIŲ LĄSTELIŲ TRANSFORMACIJOS BANDYMAI *IN VITRO*
B.22.	GRAUŽIKŲ DOMINANTINIS LETALIŠKUMO BANDYMAS

▼C1

B.23.	ŽINDUOLIŲ SPERMATOGONIJŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJOS BANDYMAS
B.25.	PELIŲ PAVELDĖTA TRANSLOKACIJA
B.26.	POŪMIS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ. 90 DIENŲ KARTOTINIŲ DOZIŲ TOKSIŠKUMO GRAUŽIKAMS BANDYMAS
B.27.	POŪMIS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ. 90 DIENŲ KARTOTINIŲ DOZIŲ TOKSIŠKUMO NE GRAUŽIKAMS BANDYMAS
B.28.	POŪMIS TOKSIŠKUMAS PER ODĄ. 90 DIENŲ KARTOTINIŲ DOZIŲ TOKSIŠKUMO GRAUŽIKAMS BANDYMAS
B.29.	PUSIAU LĖTINIS TOKSIŠKUMAS ĮKVĖPUS. 90 DIENŲ TYRIMAS
B.30.	LĖTINIO TOKSIŠKUMO TYRIMAI
B.31.	TOKSIŠKUMO PRENATALINIAM VYSTYMUISI BANDYMAS
B.32.	KANCEROGENIŠKUMO TYRIMAI
B.33.	JUNGTINIAI LĖTINIO TOKSIŠKUMO IR KANCEROGENIŠKUMO TYRIMAI
B.34.	TOKSIŠKUMO VIENOS KARTOS DAUGINIMUISI BANDYMAS
B.35.	TOKSIŠKUMO DVIEJŲ KARTŲ DAUGINIMUISI BANDYMAS
B.36.	TOKSIKOKINETIKA
B.37.	ORGANINIŲ FOSFORO JUNGINIŲ SUKELTO UŽDELSTO NEUROTOKSIŠKUMO PO ŪMAUS VEIKIMO MEDŽIAGA BANDYMAS
B.38.	ORGANINIŲ FOSFORO JUNGINIŲ SUKELTO UŽDELSTO NEUROTOKSIŠKUMO 28 DIENŲ BANDYMAS
B.39.	NENUMATYTOS DNR SINTEZĖS (NDS) ŽINDUOLIŲ KEPENŲ LĄSTELĖSE BANDYMAS *IN VIVO*
B.40.	ODOS SUARDYMAS *IN VITRO*. ODOS SLUOKSNIO ELEKTRINĖS VARŽOS (OSEV) BANDYMAS
B.40 bis.	ODOS SUARDYMAS *IN VITRO*. ŽMOGAUS ODOS MODELIO BANDYMAS
B.41.	3T3 NRU FOTOTOKSIŠKUMO *IN VITRO* BANDYMAS
B.42.	ODOS JAUTRINIMAS. VIETINIO LIMFMAZGIO BANDYMAS

▼C1

B.43. NEUROTOKSIŠKUMO GRAUŽIKAMS BANDYMAS

B.44. SUGERTIS PER ODĄ. *IN VIVO* METODAS

B.45. SUGERTIS PER ODĄ. *IN VITRO* METODAS

B.46. *IN VITRO* ODOS DIRGINIMAS. REKONSTRUOTO ŽMOGAUS EPIDERMIO BANDYMO METODAS

B.47. GALVIJŲ RAGENOS DRUMSTUMO IR PRALAIDUMO BANDYMO METODAS, SKIRTAS IDENTIFIKUOTI I) CHEMINES MEDŽIAGAS, SUKELIANČIAS SMARKŲ AKIŲ PAŽEIDIMĄ, IR II) CHEMINES MEDŽIAGAS, KURIŲ NEREIKIA KLASIFIKUOTI KAIP DIRGINANČIAS AKIS AR SUKELIANČIAS SMARKŲ AKIŲ PAŽEIDIMĄ

B.48. ATSKIRTŲ VIŠČIUKŲ AKIŲ BANDYMO METODAS, SKIRTAS IDENTIFIKUOTI I) CHEMINES MEDŽIAGAS, SUKELIANČIAS SMARKIUS AKIŲ PAŽEIDIMUS, IR II) CHEMINES MEDŽIAGAS, KURIŲ NEREIKIA KLASIFIKUOTI DĖL AKIŲ DIRGINIMO AR SMARKAUS AKIŲ PAŽEIDIMO

B.49. ATSKIRTŲ VIŠČIUKŲ AKIŲ BANDYMO METODAS, SKIRTAS IDENTIFIKUOTI I) CHEMINES MEDŽIAGAS, SUKELIANČIAS SMARKIUS AKIŲ PAŽEIDIMUS, IR II) CHEMINES MEDŽIAGAS, KURIŲ NEREIKIA KLASIFIKUOTI DĖL AKIŲ DIRGINIMO AR SMARKAUS AKIŲ PAŽEIDIMO

B.50. ODOS JAUTRINIMAS. VIETINIO LIMFMAZGIO BANDYMAS. DA

B.51. ODOS JAUTRINIMAS. VIETINIO LIMFMAZGIO BANDYMAS. BrdU-ELISA

B.52. ŪMUS TOKSIŠKUMAS ĮKVĖPUS. ŪMAUS TOKSIŠKUMO KLASĖS NUSTATYMO METODAS

B.53. TOKSINIO POVEIKIO NERVŲ SISTEMOS VYSTYMUISI TYRIMAS

B.54. POVEIKIU GRAUŽIKŲ GIMDAI PAGRĮSTA BIOANALIZĖ. TRUMPALAIKIS ESTROGENINIŲ SAVYBIŲ ATRANKOS BANDYMAS

B.55. ŽIURKIŲ HERSHBERGER BIOANALIZĖ: TRUMPALAIKĖ (ANTI)ANDROGENINIŲ SAVYBIŲ ATRANKOS ANALIZĖ

B.56. IŠPLĖSTINIS TOKSIŠKUMO VIENOS KARTOS DAUGINIMUISI BANDYMAS

B.57. H295R STEROIDOGENEZĖS ANALIZĖ

B.58. GRAUŽIKŲ SOMATINIŲ IR EMBRIONINIŲ LĄSTELIŲ TARPGENINIŲ MUTACIJŲ ANALIZĖ

B.59. ODOS JAUTRINIMAS IN CHEMICO. TIESIOGINIO PEPTIDŲ REAKTYVUMO BANDYMAS

B.60. ODOS JAUTRINIMAS IN VITRO. ARE-NRF2 LIUCIFERAZĖS BANDYMŲ METODAS

B.61. FLUORESCEINO NUOTĖKIO BANDYMŲ METODAS AKIS ĖSDINANČIOMS IR STIPRIAI DIRGINANČIOMS MEDŽIAGOMS IDENTIFIKUOTI

B.62. ŽINDUOLIŲ LĄSTELIŲ BANDYMAS IN VIVO KOMETŲ METODU ŠARMINĖMIS SĄLYGOMIS

▼C1

BENDRASIS ĮVADAS

A. **BANDOMOSIOS MEDŽIAGOS APIBŪDINIMAS**

Bandomosios medžiagos sudėtį, taip pat ir pagrindines priemaišas, bei jos svarbiausias fizikines ir chemines savybes, tarp jų stabilumą, reikėtų žinoti dar prieš bet kokio toksikologinio bandymo planavimą.

Bandomosios medžiagos fizikinės ir cheminės savybės yra svarbi informacija renkantis veikimo medžiaga būdą, planuojant kiekvieną konkretų bandymą ir elgimąsi su medžiaga bei jos laikymą.

Bandomosios medžiagos (jeigu įmanoma ir pagrindinių priemaišų) dozuojamoje terpėje ar biologinėje medžiagoje nustatymo kokybinius ir kiekybinius analitinius metodus reikėtų parengti dar prieš bandymą.

Visą informaciją, susijusią su medžiagos nustatymu, fizikinėmis ir cheminėmis jos savybėmis, grynumu, bandomosios medžiagos elgsena, reikėtų įtraukti į bandymo ataskaitą.

B. **GYVŪNŲ PRIEŽIŪRA**

Atliekant toksikologinį bandymą, būtina griežta aplinkos sąlygų kontrolė ir tinkama gyvūnų priežiūra.

i) *Laikymo sąlygos*

Eksperimentinių gyvūnų patalpų ar aptvarų aplinkos sąlygos turėtų būti tinkamos bandomosioms rūšims. Žiurkėms, pelėms ir jūrų kiaulytėms kambario temperatūra turėtų būti 22 °C ± 3 °C, santykinis oro drėgnis nuo 30 iki 70 %; triušiams temperatūra turėtų būti 20 ± 3 °C, santykinis oro drėgnis nuo 30 iki 70 %.

Tam tikrų eksperimentinių metodų atveju labai svarbi temperatūra, todėl tokiais atvejais bandymo metodo aprašyme nurodomos tinkamos sąlygos. Visuose toksiškumo bandymuose temperatūra ir drėgnis turėtų būti stebimi, registruojami ir įtraukiami į baigiamąją bandymo ataskaitą.

Apšvietimas turi būti dirbtinis, šviesos režimas – 12 valandų šviesos ir 12 valandų tamsos. Apšvietimo duomenys turėtų būti registruojami ir įtraukiami į baigiamąją bandymo ataskaitą.

Jei metode kitaip nenurodoma, gyvūnai gali būti laikomi po vieną arba tos pačios lyties individų grupėmis, tačiau viename narve neturėtų būti daugiau negu penki gyvūnai.

Eksperimentų su gyvūnais ataskaitose svarbu nurodyti gyvūnų laikymo būdą bei jų skaičių viename narve medžiagos eksperimento bei vėlesniu stebėjimo periodu.

▼C1

ii) *Šėrimas*

Bandymo metu gyvūnams duodami pašarai turi atitikti visus tos gyvūnų rūšies mitybos reikalavimus. Tais atvejais, kai bandomoji medžiaga dedama į pašarus, jų maistinė vertė gali sumažėti dėl bandomosios medžiagos sąveikos su pašaru. Į tokios sąveikos galimybę turėtų būti atsižvelgiama aiškinant bandymo rezultatus. Standartiniai laboratorinių gyvūnų pašarai gali būti naudojami neribojant geriamo vandens kiekio. Jei bandomoji medžiaga duodama su pašarais, juos renkantis turi būti užtikrinama, kad bandomąją medžiagą būtų galima tinkamai su jais sumaišyti. Maisto teršalai, kurie turi įtakos toksiniam poveikiui, neturėtų viršyti koncentracijų, dėl kurių rezultatai gali būti iškreipti.

C. **ALTERNATYVUS BANDYMAS**

Europos Sąjunga siekia vystyti ir tvirtinti alternatyvius metodus, kuriais galima gauti panašią informaciją kaip ir įprastais bandymais su gyvūnais, tačiau kuriems būtų naudojama mažiau gyvūnų, jiems būtų sukeliama mažiau skausmo arba būtų galima visiškai jų nenaudoti.

Kai tik tokie metodai įsigalioja, būtina apsvarstyti jų taikymą siekiant nustatyti medžiagų pavojingumą, jas vėliau klasifikuojant bei ženklinant ir vertinant medžiagos cheminę saugą.

D. **ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS**

Vertinant ir aiškinant gyvūnų ir *in vitro* bandymų rezultatus, reikia atsižvelgti į jų tiesioginės ekstrapoliacijos žmogui ribotumą, todėl gavus įrodymą apie medžiagos neigiamą poveikį žmonėms, jo turėtų pakakti bandymų su gyvūnais rezultatams patvirtinti.

E. **LITERATŪROS ŠALTINIAI**

Dauguma šių metodų sukurti vykdant OECD bandymų gairių programą ir turėtų būti atliekami pagal Geros laboratorinės praktikos principus, kad būtų užtikrintas kuo didesnis abipusis duomenų pripažinimas.

Papildomos informacijos galima rasti OECD gairėse nurodytuose šaltiniuose ir kitoje publikuotoje literatūroje.

▼C1

B.1 bis. **ŪMUS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ. FIKSUOTŲJŲ DOZIŲ METODAS**

1. **METODAS**

Šis bandymų metodas atitinka OECD TG 420 (2001).

1.1. ĮVADAS

Taikant tradicinius metodus ūmus toksiškumas įvertinamas pagal gyvūno žūtį. Britų toksikologų draugija (*British Toxicology Society*) 1984 m. pasiūlė naują ūmaus toksiškumo bandymo būdą, pagrįstą kelių fiksuoto dydžio dozių davimu (1). Taikant šį būdą poveikio įrodymas nebėra tik gyvūnų žūtis; metodas pagrįstas aiškių toksiškumo požymių, kurie pasireiškia nuo kurios nors fiksuoto dydžio dozės iš dozių serijos, stebėjimu. Pasibaigus JK (2) ir tarptautinio (3) tinkamumo patvirtinimo bandymui *in vivo*, 1992 m. ši procedūra buvo patvirtinta kaip bandymo metodas. Vėliau, taikant matematinius modelius, daugelyje bandymų buvo įvertintos statistinės fiksuotų dozių metodikos savybės (4)(5)(6). Be to, atlikti *in vivo* ir modeliavimo bandymai įrodė metodikos atkuriamumą ir kad ją taikant naudojama mažiau gyvūnų, jiems sukeliamos mažesnės kančios nei taikant tradicinius metodus ir pagal ją galima suklasifikuoti medžiagas panašiai, kaip tai būtų padaryta taikant kitus ūmaus toksiškumo bandymo metodus.

Rekomendacijas dėl nurodytam tikslui tinkamiausio bandymų metodo pasirinkimo galima rasti Ūmaus toksiškumo per virškinamąjį traktą bandymo rekomendaciniame dokumente (7). Be to, šiame rekomendaciniame dokumente yra papildomos informacijos apie B.1 bis bandymo metodo taikymą ir aiškinimą.

Metodo esmę sudaro tai, kad atliekant pagrindinį bandymą skiriamos vidutinio toksiškumo dozės ir išvengiama dozių, kurios sukeltų žūtį. Be to, nereikia skirti dozių, kurios, kaip žinoma, sukelia didelį skausmą ir kančią dėl ėsdinančio arba stipriai dirginančio poveikio. Gaištantys gyvūnai arba gyvūnai, kurie akivaizdžiai patiria skausmą arba kuriems pasireiškia didelės ir ilgalaikės kančios požymiai, turi būti humaniškai numarinami ir interpretuojant bandymo rezultatus laikomi atliekant bandymą žuvusiais gyvūnais. Sprendimo numarinti gaištantį arba stipriai kenčiantį gyvūną priėmimo kriterijai ir numatomos arba neišvengiamos žūties nustatymo rekomendacijos yra atskiro rekomendacinio dokumento objektas (8).

Taikant metodą gaunama informacijos apie medžiagos pavojingas savybes, todėl ją galima įvertinti ir klasifikuoti pagal Visuotinai suderintą ūmų toksinį poveikį sukeliančių cheminių medžiagų klasifikavimo sistemą (*Globally Harmonised System (GHS) for the classification of chemicals which cause acute toxicity*) (9).

Prieš bandymo pradžią bandymų laboratorija išnagrinėja visą turimą informaciją apie bandomąją medžiagą. Tokią informaciją sudaro medžiagos tapatumas ir cheminė struktūra, jos fizikinės ir cheminės savybės, visų kitų *in vitro* arba *in vivo* medžiagos toksiškumo bandymų rezultatai, gimininges struktūros medžiagų toksikologiniai duomenys ir numatomas (-i) medžiagos naudojimo būdas (-ai). Ši informacija yra būtina norint įtikinti visus, kurie priima sprendimus dėl bandymo reikalingumo žmonių sveikatai apsaugoti, ir padėti pasirinkti tinkamą pradinę dozę.

▼C1

1.2. APIBRĖŽTYS

Ūmus toksiškumas per virškinamąjį traktą – neigiamas poveikis, kuris atsiranda gavus per virškinamąjį traktą vieną medžiagos dozę arba kelias dozes per 24 h.

Uždelsta žūtis – kai gyvūnas nenugaišta arba nepradeda gaišti per 48 h, bet nugaišta vėliau per 14 parų stebėjimo laikotarpį.

Dozė – gyvūnui duotas bandomosios medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama bandomosios medžiagos mase bandomojo gyvūno masės vienetui (pvz., mg/kg).

Akivaizdus toksiškumas – bendrasis terminas, kuriuo apibūdinami tokie aiškūs toksiškumo požymiai, atsiradę gyvūnui (-ams) davus bandomosios medžiagos (pavyzdžiai pateikti (3)), kad galima numatyti, jog gyvūnui (-ams) davus kitą didžiausią fiksuotą dozę didesnei daliai gyvūnų pasireikš didelio skausmo ir ilgalaikių didelių kančių požymiai, gaišimo būsenos požymiai (kriterijai pateikti rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (8)), arba tikėtina, kad jie nugaiš.

GHS – visuotinai suderinta cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo sistema (*Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures*). Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacijos (OECD) (žmonių sveikata ir aplinka), JT pavojingų prekių gabenimo ekspertų komiteto (fizikinės ir cheminės savybės) ir Tarptautinės darbo organizacijos (ILO) (pranešimas apie pavojus) bendra veikla, koordinuojama pagal Bendrą organizacijų tinkamo cheminių medžiagų valdymo programą (*Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals* (IOMC)).

Neišvengiama žūtis – kai gaišimo būsena arba žūtis numatoma anksčiau negu nustatytas kito planinio stebėjimo momentas. Graužikams šios būsenos požymiai galėtų būti traukuliai, gulėjimas ant šono, gulėjimas horizontaliai ir drebulys. (Daugiau informacijos pateikta rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (8)).

LD_{50} (vidutinė mirtina dozė) – statistiškai apskaičiuota per virškinamąjį traktą duodama medžiagos dozė, nuo kurios tikėtinai gali žūti 50 % gyvūnų. LD_{50} vertė išreiškiama bandomosios medžiagos mase bandomojo gyvūno masės vienetui (mg/kg).

Ribinė dozė – dozė, atitinkanti viršutinę bandymo dozės ribą (2 000 arba 5 000 mg/kg).

Gaišimo būsena – būsena prieš žūtį arba neišvengiamos žūties, net jei gyvūnas gydomas, būsena. (Daugiau informacijos pateikta rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (8)).

Numatoma žūtis – klinikinių požymių, rodančių žūtį žinomu ateities momentu prieš eksperimento pabaigą, pvz., nesugebėjimas pasiekti vandens arba pašaro, buvimas. (Daugiau informacijos pateikta rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (8)).

▼C1

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Vienos lyties gyvūnų grupėms nuosekliai duodamos fiksuotos 5, 50, 300 ir 2 000 mg/kg dozės (išskirtiniu atveju galima apsvarstyti galimybę duoti papildomą fiksuotą 5 000 mg/kg dozę, žr. 1.6.2 skirsnį). Atsižvelgiant į orientacinį bandymą pasirenkama tokia pradinė dozė, kuri galėtų sukelti kai kuriuos toksiškumo požymius, bet kuri nebūtų sunkaus toksinio poveikio arba žūties priežastimi. Klinikiniai požymiai ir sąlygos, susijusios su skausmu, kančia ir neišvengiama žūtimi, išsamiai aprašytos atskirame OECD rekomendaciniame dokumente (8). Kitoms gyvūnų grupėms gali būti duodamos didesnės arba mažesnės fiksuotos dozės, atsižvelgiant į toksiškumo arba gaištamumo požymių buvimą arba nebuvimą. Ši procedūra tęsiama tol, kol nustatoma dozė, sukelianti akivaizdų toksiškumą arba ne daugiau kaip vieno gyvūno žūtį, arba kol nustatoma, kad net didžiausia dozė nesukelia jokio poveikio arba gyvūnai žūsta net nuo mažiausios dozės.

1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.4.1. **Gyvūnų rūšies pasirinkimas**

Tinkamiausia graužikų rūšis yra žiurkės, nors galima naudoti ir kitus graužikus. Paprastai naudojamos patelės (7). Taip yra todėl, kad literatūros apie tipinius LD_{50} bandymus analizė rodo, kad jautrumo skirtumai tarp lyčių yra maži, bet tais atvejais, kai jie yra, patelės dažniausiai yra šiek tiek jautresnės (10). Tačiau, jei giminingos struktūros cheminių junginių toksikologinės arba toksikokinetinės savybės rodo, kad jautresni gali būti patinai, turėtų būti naudojama ši lytis. Kai bandymai daromi su patinais, pateikiamas tinkamas pagrindimas.

Bandomi sveiki, jauni, bet suaugę plačiai naudojamų laboratorinių rūšių gyvūnai. Patelės turi būti dar neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos. Kiekvieno gyvūno amžius prieš duodant dozę turi būti nuo 8 iki 12 savaičių, o masė ± 20 % tikslumu turi atitikti anksčiau dozę gavusių gyvūnų vidutinę masę.

1.4.2. **Laikymo ir šėrimo sąlygos**

Bandomų gyvūnų patalpos temperatūra turi būti 22 °C (± 3 °C). Nors santykinė oro drėgmė turėtų būti mažiausiai 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikėtų siekti, kad ji būtų 50–60 %. Apšvietimas turi būti dirbtinis ir jo seka: 12 h šviesos ir 12 h tamsos. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorinių gyvūnų pašaras, geriamojo vandens kiekis neribojamas. Gyvūnai gali būti laikomi grupėmis narveliuose, į grupes skirstant pagal jų gaunamą dozę, tačiau gyvūnų skaičius narvelyje neturi trukdyti aiškiai stebėti kiekvieną gyvūną.

1.4.3. **Gyvūnų ruošimas**

Gyvūnai atrenkami atsitiktinai, ženklinami, kad būtų įmanoma identifikuoti kiekvieną gyvūną, ir prieš dozių davimo pradžią laikomi narveliuose mažiausiai 5 paras, kad galėtų priprasti prie laboratorijos sąlygų.

▼C1

1.4.4. **Dozių ruošimas**

Paprastai bandomoji medžiaga duodama tokio paties tūrio dozėmis, keičiama tik dozės preparato koncentracija. Tačiau jei reikia bandyti skystą galutinį produktą arba mišinį, paskesniam šios bandomosios medžiagos rizikos įvertinimui galbūt labiau tiktų neskiesta, t. y. pastovios koncentracijos, bandomoji medžiaga, to reikalauja ir kai kurios reglamentuojančios institucijos. Bet kuriuo atveju didžiausias duodamos dozės tūris neturi būti viršytas. Didžiausias skysčio tūris, kurį galima duoti vienu metu, priklauso nuo bandomo gyvūno dydžio. Graužikams šis tūris paprastai turi būti ne didesnis kaip 1ml/100g kūno masės, tačiau vandeninių tirpalų atveju galima duoti 2 ml/100g kūno masės. Kalbant apie dozuojamo preparato sudėtį, rekomenduojama naudoti, jei įmanoma, vandeninį tirpalą (suspensiją, emulsiją), toliau pirmenybė teikiama aliejiniam tirpalui (emulsijai, suspensijai) (pvz., kukurūzų aliejaus) ir tik po jų galimi kitų nešiklių tirpalai. Jei nešiklis ne vanduo, turi būti žinomos jo toksikologinės charakteristikos. Dozės turi būti ruošiamos prieš pat davimą, išskyrus kai preparato stabilumas naudojimo laikotarpiu yra žinomas ir laikomas priimtinu.

1.5. BANDYMO EIGA

1.5.1. **Dozavimas**

Bandomoji medžiaga duodama kaip vienetinė dozė per skrandžio zondą arba tinkamą intubacinį vamzdelį. Esant neįprastoms aplinkybėms, kai neįmanoma duoti vienetinės dozės, ji gali būti duodama mažesnėmis dalimis ne ilgiau kaip per 24 h.

Prieš duodant dozę gyvūnai nešeriami (pvz., žiurkės negauna pašaro, išskyrus vandenį, per naktį; pelės negauna pašaro, išskyrus vandenį, 3–4 h). Pasibaigus badavimo laikotarpiui, gyvūnai pasveriami ir duodama bandomoji medžiaga. Gavusios bandomosios medžiagos žiurkės gali būti nešeriamos dar 3–4 h, pelės nešeriamos 1–2 h. Jei dozė duodama dalimis tam tikrą laikotarpį, gyvūnus gali tekti šerti ir girdyti atsižvelgiant į laikotarpio trukmę.

1.5.2. **Orientacinis bandymas**

Orientacinio bandymo tikslas – nustatyti tinkamą pradinę pagrindinio bandymo dozę. Bandomoji medžiaga nuosekliai duodama atskiriems gyvūnams pagal 1 priedėlio diagramą. Orientacinis bandymas baigiamas, kai galima priimti sprendimą dėl pagrindinio bandymo pradinės dozės (arba jei gyvūnas žūsta esant mažiausiai fiksuotai dozei).

Orientacinio bandymo pradinė dozė pasirenkama iš 5, 50, 300 ir 2 000 mg/kg dozių kaip dozė, nuo kurios turėtų pasireikšti akivaizdus toksiškumas. Ji turi būti pagrįsta, jei įmanoma, *in vivo* ir *in vitro* duomenimis apie tą pačią cheminę medžiagą ir struktūriniu požiūriu giminingas chemines medžiagas. Neturint tokios informacijos, pradinė dozė yra 300 mg/kg.

Kiekvienam gyvūnui dozės duodamos ne dažniau kaip kas 24 h. Visi gyvūnai turėtų būti stebimi mažiausiai 14 parų.

▼C1

Išimtiniais atvejais ir tik jei tai pagrįsta tam tikrais reguliavimo sumetimais, galima spręsti, ar skirti papildomą viršutinės ribos fiksuotą 5 000 mg/kg dydžio dozę (žr. 3 priedėlį). Dėl gyvūnų gerovės priežasčių neskatinama daryti bandymo taikant GHS 5 kategorijos intervalus (2 000–5 000 mg/kg) ir apie tokio bandymo būtinybę turėtų būti sprendžiama, kai yra didelė tikimybė, kad jo rezultatai yra tiesiogiai sietini su žmonių ar gyvūnų sveikatos arba aplinkos apsauga.

Tais atvejais, kai darant orientacinį bandymą žūsta gyvūnas, gavęs mažiausią fiksuotą dozę (5 mg/kg), įprasta bandymą nutraukti ir medžiagą priskirti GHS 1 kategorijai (kaip nurodyta 1 priedėlyje). Tačiau jei reikalingas tolesnis klasifikavimo patvirtinimas, gali būti atliekama tokia neprivaloma papildoma procedūra: 5 mg/kg dozė duodama antram gyvūnui. Jei šis antras gyvūnas žūsta, GHS 1 kategorija patvirtinama ir bandymas iš karto nutraukiamas. Jei antras gyvūnas išgyvena, 5 mg/kg dozę gauna ne daugiau kaip trys papildomi gyvūnai. Kadangi yra didelė žūties rizika, gyvūnų gerovei apsaugoti jie turi gauti šią dozę paeiliui. Laiko tarpo tarp dozės davimo kiekvienam gyvūnui turi pakakti nustatyti, ar pirmiau dozę gavęs gyvūnas turi galimybę išgyventi. Jei žūsta antras gyvūnas, dozių davimas iš karto nutraukiamas ir nei vienas papildomas gyvūnas dozės nebegauna. Kadangi žuvus antram gyvūnui (neatsižvelgiant į bandymo nutraukimo momentu panaudotų gyvūnų skaičių) rezultatas yra A (2 arba daugiau žūčių), taikoma 2 priedėlio klasifikavimo taisyklė esant 5 mg/kg fiksuotai dozei (1 kategorija, jei žuvo 2 arba daugiau gyvūnų, 2 kategorija, jei žuvo ne daugiau kaip 1 gyvūnas). Be to, 4 priedėlyje pateiktas klasifikavimo metodas pagal ES sistemą, taikytinas iki bus įgyvendinta nauja GHS.

1.5.3. **Pagrindinis bandymas**

1.5.3.1. *Gyvūnų skaičius ir dozių dydis*

Veiksmai, kurių turi būti imamasi po bandymo su pradine doze, nurodyti 2 priedėlyje pateiktose schemose. Yra trys būdai: nutraukti bandymą ir priskirti medžiagą atitinkamai pavojaus klasei, bandyti esant didesnei fiksuotai dozei arba bandyti esant mažesnei fiksuotai dozei. Tačiau siekiant apsaugoti gyvūnus, darant pagrindinį bandymą nebus kartojama dozė, sukėlusi žūtį darant orientacinį bandymą (žr. 2 priedėlį). Patirtis rodo, kad labiausiai tikėtina, jog davus pradinę dozę medžiagą galima suklasifikuoti ir tolesnio bandymo nebereikia.

Kiekvienai bandomai dozei paprastai bus naudojama iš viso po penkis vienos lyties gyvūnus. Penkis gyvūnus sudaro vienas gyvūnas iš orientacinio bandymo, gavusio pasirinktą dozę, ir keturi papildomi gyvūnai (išskyrus neįprastus atvejus, kai pagrindinio bandymo dozė nebuvo įtraukta į orientacinį bandymą).

Laiko tarpą tarp kiekvieno dydžio dozių skyrimo lemia toksiškumo požymių atsiradimo pradžia, trukmė ir sunkumas. Kitos dozės davimas gyvūnams atidedamas tol, kol bus įsitikinta, kad išgyveno anksčiau dozę gavę gyvūnai. Rekomenduojamas 3 arba 4 parų laikotarpis tarp kiekvieno dydžio dozės, jei prireikia, uždelstam toksiniam poveikiui stebėti. Laiko tarpas prireikus gali būti keičiamas, pvz., jei gaunama reakcija, dėl kurios sunku priimti sprendimą.

▼C1

Kai sprendžiama, ar skirti didžiausią fiksuotą 5 000 mg/kg dozę, reikėtų laikytis 3 priedėlyje aprašyto metodo (taip pat žr. 1.6.2 skirsnį).

1.5.3.2. *Ribinis bandymas*

Ribinis bandymas visų pirma atliekamas tais atvejais, kai bandytojas turi informacijos, rodančios, kad bandomoji medžiaga greičiausiai yra netoksiška, t. y. toksiškumas pasireiškia esant didesnėms nei reglamentuojamos ribinėms dozėms. Informacijos apie bandomosios medžiagos toksiškumą galima gauti pasinaudojus žiniomis apie panašius bandytus junginius arba panašius bandytus mišinius arba produktus, atsižvelgiant į toksikologiškai reikšmingų komponentų tapatumą ir procentinę dalį. Tais atvejais, kai informacijos apie medžiagos toksiškumą yra mažai arba jos išvis nėra, arba kai ta informacija leidžia manyti, kad bandomoji medžiaga yra toksiška, turi būti atliekamas pagrindinis bandymas.

Paprastai šioje rekomendacijoje ribiniu bandymu laikomas orientacinis bandymas esant 2 000 mg/kg (arba išimtinais atvejais 5 000 mg/kg), po kurio keturiems papildomiems gyvūnams būtų skirta tokio pat dydžio dozė.

1.6. STEBĖJIMAI

Kiekvienas dozę gavęs gyvūnas stebimas bent vieną kartą per pirmąsias 30 min. ir periodiškai per pirmąsias 24 h, skiriant ypatingą dėmesį pirmosioms keturioms valandoms, o vėliau kartą per dieną visas 14 parų, išskyrus atvejus, kai gyvūnams reikia nutraukti bandymą ir humaniškai numarinti dėl gyvūnų gerovės priežasčių arba kai jie nugaišta. Tačiau stebėjimo trukmė neturi būti griežtai fiksuojama. Ji nustatoma pagal toksines reakcijas, sveikimo laikotarpio pradžią ir trukmę, taigi prireikus ji gali būti pratęsta. Svarbus yra toksiškumo požymių atsiradimo ir išnykimo momentas, ypač jei uždelsto toksiškumo požymių atsiradimo tendencija (11). Visi stebėjimai sistemingai užrašomi, apie kiekvieną gyvūną atskirai.

Jei gyvūnams ir toliau pasireiškia toksiškumo požymiai, reikia stebėti papildomai. Reikia stebėti odos ir kailio, akių ir gleivinės pasikeitimus, be to kvėpavimo, kraujo, autonominės ir centrinės nervų sistemų, somatomotorinio aktyvumo ir elgesio pasikeitimus. Ypač reikia stebėti, ar nepasireiškia drebulys, traukuliai, viduriavimas, mieguistumas, miego ir komos būsenos, ar neteka seilės. Reikėtų atsižvelgti į principus ir kriterijus, apibendrintus Rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (8). Gaištantys gyvūnai ir gyvūnai, kurie patiria didelius skausmus arba kuriems pasireiškia ilgalaikiai sunkių kančių požymiai, turėtų būti humaniškai numarinti. Kai gyvūnai numarinami dėl gyvūnų gerovės priežasčių arba randami negyvi, žūties laikas užrašomas kuo tiksliau.

1.6.1. **Kūno masė**

Kiekvieno gyvūno masė nustatoma prieš pat bandomosios medžiagos davimą ir vėliau – mažiausiai kas savaitę. Turi būti apskaičiuotas ir užrašytas masės pokytis. Pasibaigus bandymui, išlikę gyvūnai pasveriami ir humaniškai numarinami.

▼C1

1.6.2. **Patologija**

Visiems bandomiesiems gyvūnams (įskaitant nugaišusius per bandymą arba pašalintus iš bandymo dėl gyvūnų gerovės priežasčių) daroma bendroji nekroskopija. Aprašomi visi dideli kiekvieno gyvūno patologiniai pokyčiai. Gyvūnams, kurie po dozės gavimo išgyveno 24 h arba ilgiau, galima būtų daryti mikroskopinį organų, turinčių akivaizdžių patologinių pokyčių, tyrimą, kadangi jis gali suteikti naudingos informacijos.

2. **DUOMENYS**

Turi būti pateikiami atskiri duomenys apie kiekvieną gyvūną. Be to, visi duomenys apibendrinami lentelėse, kuriose nurodomas kiekvienos bandymo grupės gyvūnų skaičius, toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičius, darant bandymą žuvusių arba dėl gyvūnų gerovės priežasčių numarintų gyvūnų skaičius, atskirų gyvūnų žūties laikas, toksinio poveikio aprašymas ir eiga, grįžtamumas, nekroskopijos duomenys.

3. **ATASKAITOS RENGIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija, jei taikoma:

Bandomoji medžiaga:

— fizinė būsena, grynumas ir, jei svarbu, fizikinės ir cheminės savybės (įskaitant izomerizavimą),

— tapatumas, įskaitant CAS numerį.

Nešiklis (jei taikoma):

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei tai ne vanduo.

Bandomieji gyvūnai:

— naudota rūšis ir veislė,

— mikrobiologinė gyvūno būsena, jei žinoma,

— gyvūnų skaičius, amžius ir lytis (įskaitant, jei taikoma, patinų vietoj patelių naudojimo pagrindimą),

— šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.

Bandymo sąlygos:

— išsami informacija apie bandomosios medžiagos sudėtį, įskaitant duodamos medžiagos fizikinį pavidalą,

— išsami informacija apie bandomosios medžiagos davimą, įskaitant dozės tūrį ir davimo laiką,

— išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę (įskaitant pašaro tipą (šaltinį), vandens šaltinį),

— pradinės dozės pasirinkimo pagrindimas.

▼C1

Rezultatai:

— kiekvieno gyvūno reakcijos duomenų ir dozės dydžio lentelės (t. y. gyvūnų, kuriems pasireiškia toksiškumo požymiai, įskaitant nugaišimą, poveikio tipą, sunkumą ir trukmę),

— kūno masės ir jos kitimo lentelės,

— kiekvieno gyvūno masė dozės davimo dieną, vėliau kas savaitę ir žūties arba numarinimo dieną,

— žūties data ir laikas, jei tai įvyksta prieš planinį numarinimą,

— toksiškumo požymių kiekvienam gyvūnui atsiradimas ir jų eiga, taip pat grįžtamumas kiekvieno gyvūno atveju,

— kiekvieno gyvūno nekroskopijos ir histopatologiniai duomenys, jei yra.

Rezultatų aptarimas ir aiškinimas.

Išvados.

4. **NUORODOS**

1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, p. 85–92.

2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D.and Shillaker, R.O., (1987) Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, p. 279–291.

3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P., (1990) The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test. Fd. Chem. Toxicol. 28, p. 469–482.

4) Whitehead, A. and Curnow, R.N., (1992) Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, p. 313–324.

5) Stallard, N. and Whitehead, A., (1995) Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, p. 315–323.

6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P., (2002) Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. Hum. Exp. Toxicol., 21, p. 183–196.

7) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment No 24. Paris.

8) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in SAFEty Evaluation. Environmental Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assesment No 19.

▼C1

9) OECD (1998) Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521–14-no-24-no-0,FF.html].

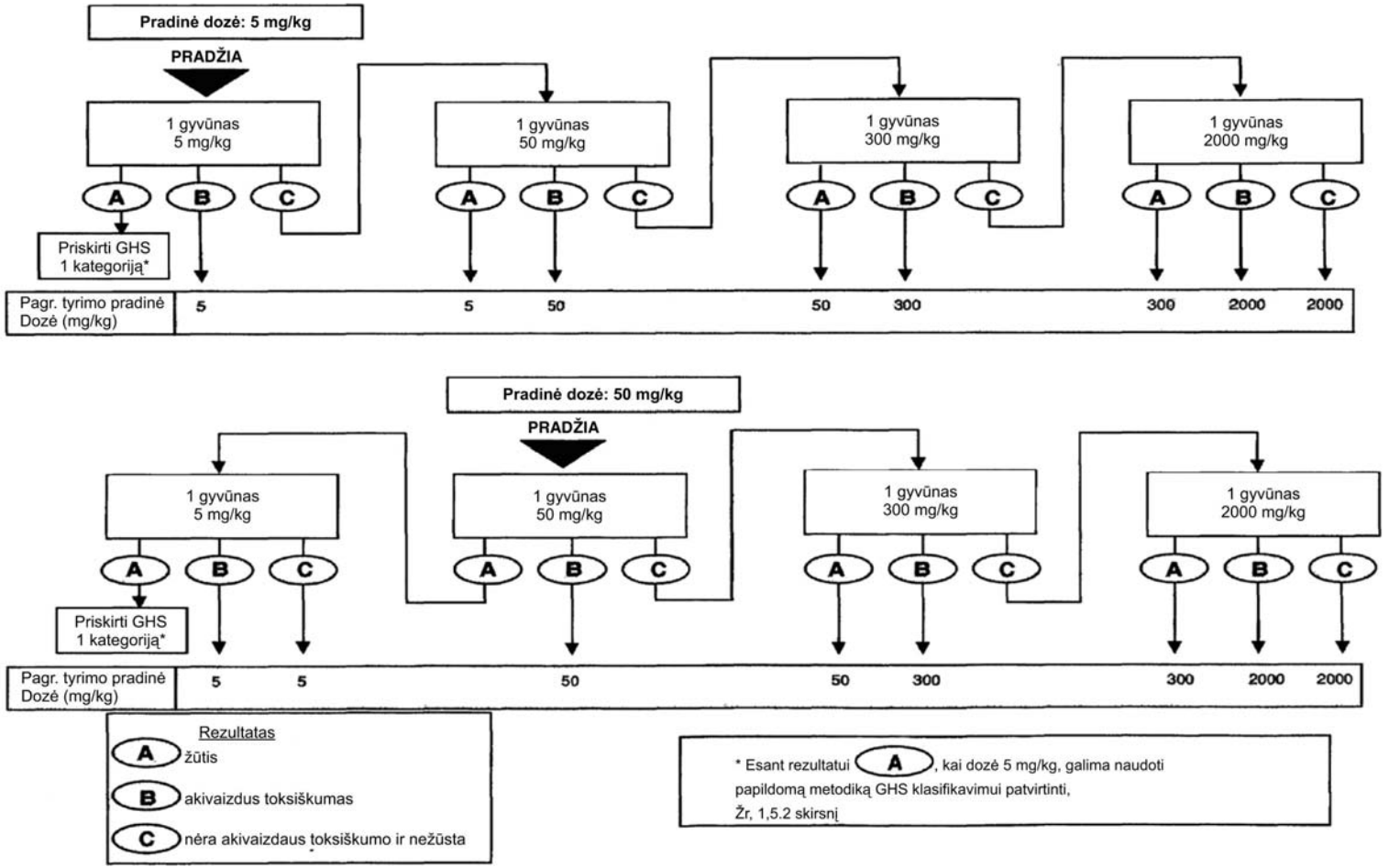
10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C., (1995) Comparison of the Up-and- Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, p. 223–231.

11) Chan, P.K and Hayes, A.W., (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press Ltd. New York, USA.

▼C1

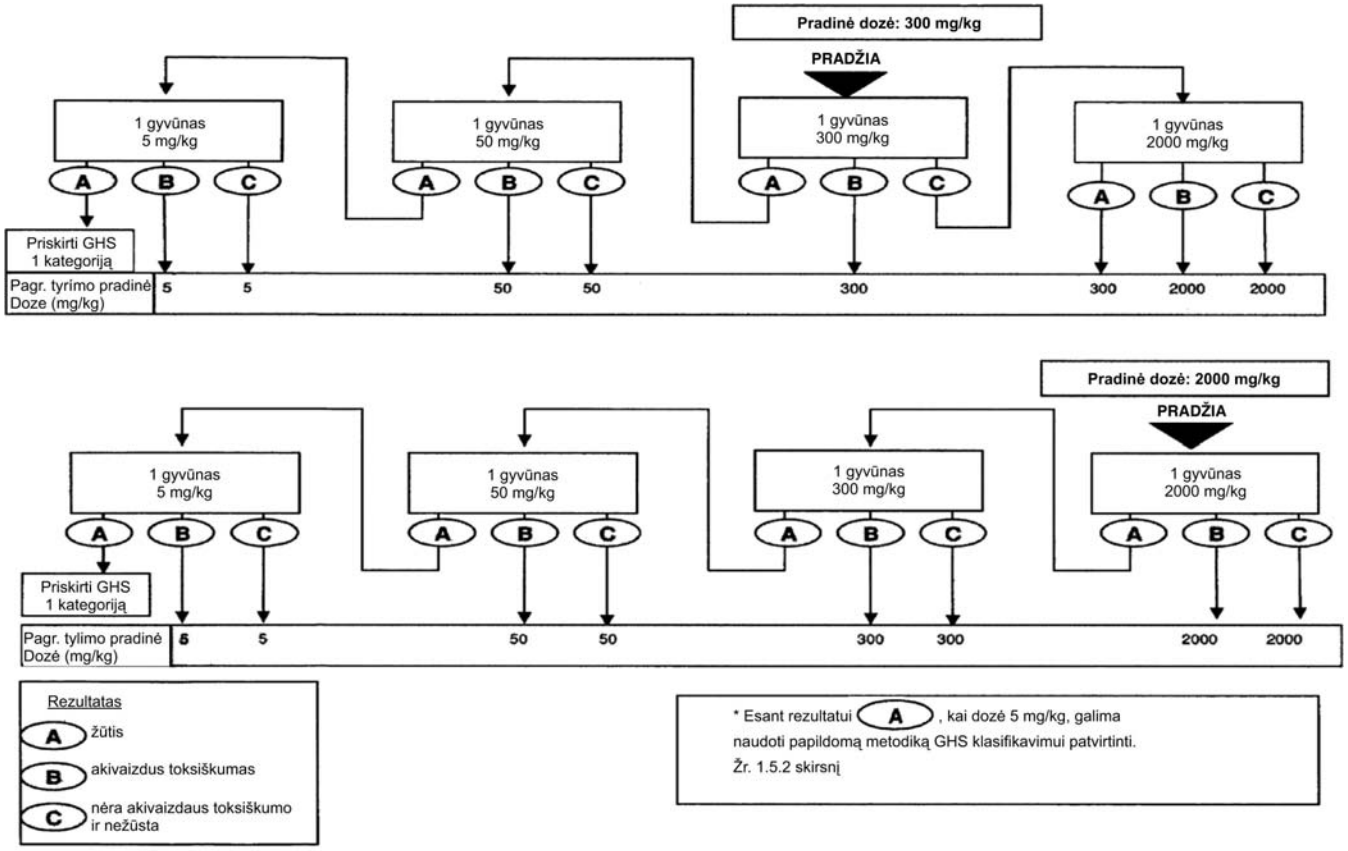
1 PRIEDĖLIS

ORIENTACINIO BANDYMO SCHEMA



02008R0440 — LT — 18.05.2017 — 007.001 — 208

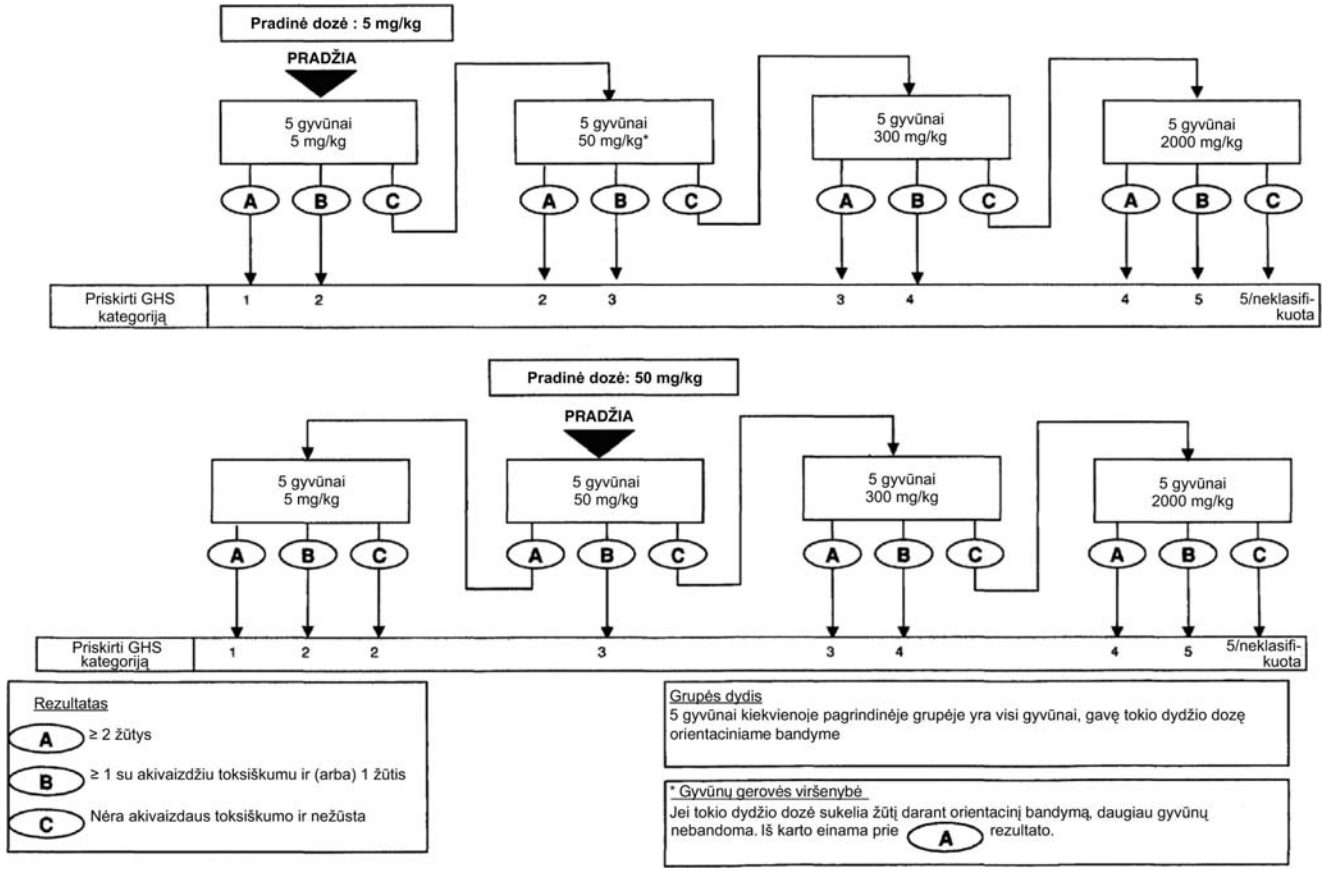
▼C1


Pradinė dozė: 300 mg/kg
PRADŽIA
1 gyvūnas 5 mg/kg
1 gyvūnas 50 mg/kg
1 gyvūnas 300 mg/kg
1 gyvūnas 2000 mg/kg
A B C
Priskirti GHS 1 kategoriją
Pagr. tyrimo pradinė Doze (mg/kg)
5 5 50 50 300 300 2000 2000
Pradinė dozė: 2000 mg/kg
PRADŽIA
1 gyvūnas 5 mg/kg
1 gyvūnas 50 mg/kg
1 gyvūnas 300 mg/kg
1 gyvūnas 2000 mg/kg
A B C
Priskirti GHS 1 kategoriją
Pagr. tylimo pradinė Dozė (mg/kg)
5 5 50 50 300 300 2000 2000
Rezultatas
A žūtis
B akivaizdus toksiškumas
C nėra akivaizdaus toksiškumo ir nežūsta
* Esant rezultatui A, kai dozė 5 mg/kg, galima naudoti papildomą metodiką GHS klasifikavimui patvirtinti.
Žr. 1.5.2 skirsnį

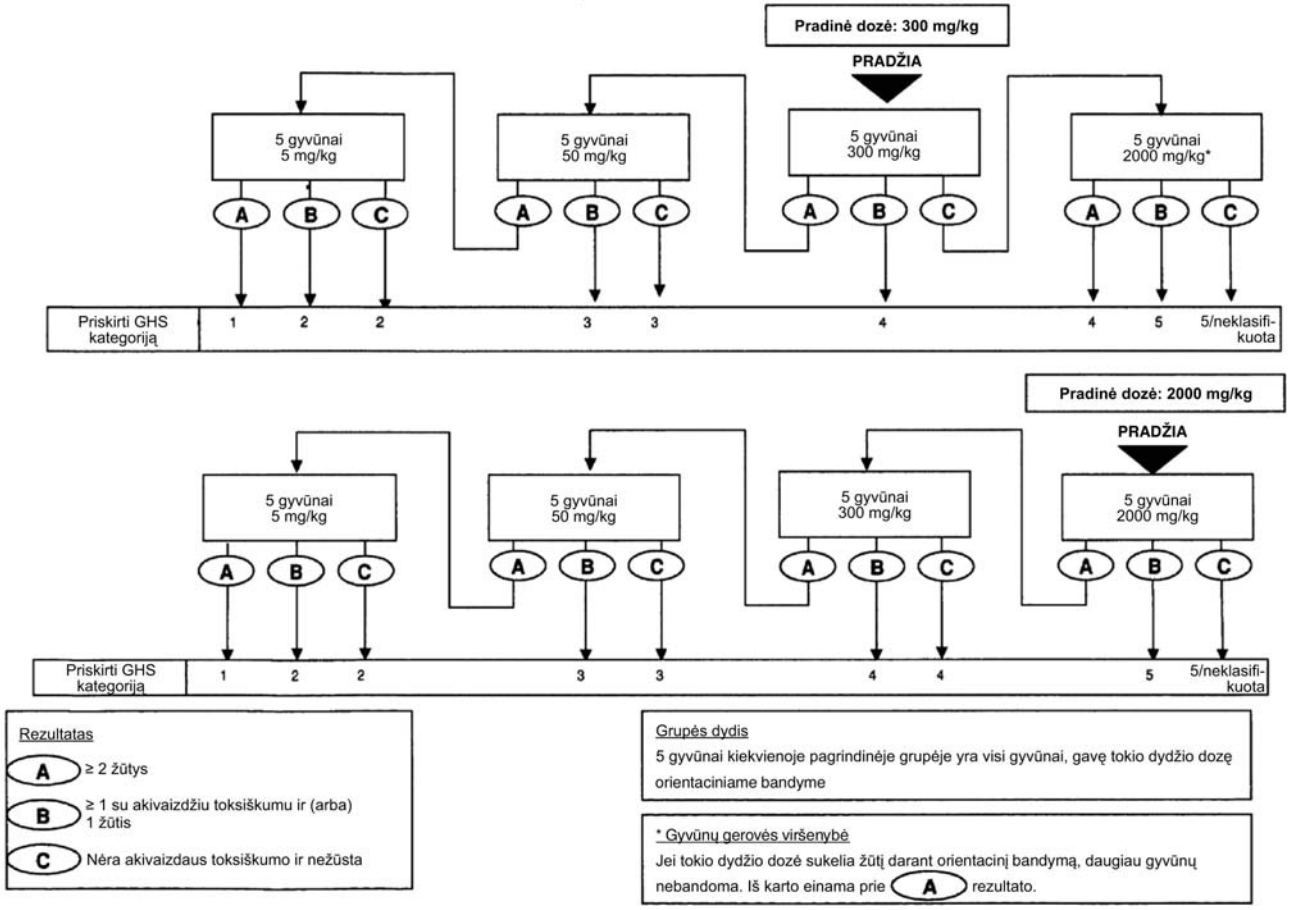
▼C1

2 PRIEDĖLIS

PAGRINDINIO BANDYMO SCHEMA



▼C1


Pradinė dozė: 300 mg/kg
PRADŽIA
5 gyvūnai 5 mg/kg
5 gyvūnai 50 mg/kg
5 gyvūnai 300 mg/kg
5 gyvūnai 2000 mg/kg*
A B C
Priskirti GHS kategoriją
1 2 2 3 3 4 4 5 5/neklasifikuota
Pradinė dozė: 2000 mg/kg
PRADŽIA
5 gyvūnai 5 mg/kg
5 gyvūnai 50 mg/kg
5 gyvūnai 300 mg/kg
5 gyvūnai 2000 mg/kg
A B C
Priskirti GHS kategoriją
1 2 2 3 3 4 4 5 5/neklasifikuota
Rezultatas
A ≥ 2 žūtys
B ≥ 1 su akivaizdžiu toksiškumu ir (arba) 1 žūtis
C Nėra akivaizdaus toksiškumo ir nežūsta
Grupės dydis
5 gyvūnai kiekvienoje pagrindinėje grupėje yra visi gyvūnai, gavę tokio dydžio dozę orientaciniame bandyme
* Gyvūnų gerovės viršenybė
Jei tokio dydžio dozė sukelia žūtį darant orientacinį bandymą, daugiau gyvūnų nebandoma. Iš karto einama prie A rezultato.

▼C1

3 PRIEDĖLIS

BANDOMŲJŲ MEDŽIAGŲ, KURIŲ TIKĖTINOS LD_{50} VERTĖS YRA DIDESNĖS NEGU 2 000 MG/KG, KLASIFIKAVIMO KRITERIJAI NEDARANT BANDYMO

5 pavojaus kategorijos kriterijai yra apibrėžti, kad būtų galima identifikuoti bandomąsias medžiagas, kurių ūmaus toksiškumo pavojus yra palyginti mažas, tačiau kurios esant tam tikroms aplinkybėms gali būti pavojingos pažeidžiamoms populiacijoms. Tikėtina, kad šių medžiagų LD_{50} per virškinimo traktą arba odą yra 2 000–5 000 mg/kg arba ekvivalentinė dozė, kai medžiagos patenka kitais būdais. Bandomosios medžiagos galėtų būti priskirtos pavojaus kategorijai, apibrėžtai 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (5 kategorija pagal GHS), šiais atvejais:

a) jei būtų priskirtos šiai kategorijai pagal kurią nors iš 2 priedėlio bandymo schemų, remiantis gaištamumo dažnumu;

b) jei jau yra patikimų duomenų, rodančių, kad LD_{50} yra 5 kategorijos verčių intervale, arba kiti bandymai su gyvūnais arba toksinis poveikis žmonėms rodo ūmaus tipo poveikį žmonių sveikatai;

c) gaunant duomenis ekstrapoliavimo, įvertinimo arba matavimo būdu, jei priskyrimas didesnio pavojaus klasei nepagrįstas ir

— yra patikimos informacijos, rodančios didelį toksinį poveikį žmonėms, arba

— pastebimas tam tikras gaištamumas, kai bandymas atliekamas duodant dozes per virškinimo traktą, siekiančias 4 kategorijos vertes, arba

— jei tęsiant bandymus iki 4 kategorijos verčių, ekspertų sprendimu patvirtinami reikšmingi klinikiniai toksiškumo požymiai, išskyrus viduriavimą, pasišiaušusius plaukus arba nesveiko gyvūno išvaizdą, arba

— jei ekspertų sprendimu patvirtinama patikima informacija, rodanti galimą reikšmingą ūmų poveikį darant kitus bandymus su gyvūnais.

BANDYMAS ESANT DIDESNĖMS NEGU 2 000 MG/KG DOZĖMS

Išimtiniais atvejais, ir tik norint įvykdyti konkrečius kontrolės institucijų reikalavimus, galima spręsti, ar skirti papildomą viršutinės ribos fiksuotą 5 000 mg/kg dydžio dozę. Pripažįstant būtinumą apsaugoti gyvūnų gerovę, bandymas skiriant 5 000 mg/kg neskatinamas ir apie tokio bandymo būtinybę turėtų būti sprendžiama, kai yra didelė tikimybė, kad jo rezultatai yra tiesiogiai sietini su žmonių arba gyvūnų sveikatos apsauga (9).

Orientacinis bandymas

Sprendimo priėmimo taisyklės, taikomos 1 priedėlyje pateiktai nuosekliai procedūrai, išplečiamos, kad būtų galima įtraukti 5 000 mg/kg dozę. Taigi kai skiriama orientacinio bandymo pradinė 5 000 mg/kg dozė, gavus A rezultatą (žūtis), reikės daryti bandymą su antru gyvūnu, jam skiriant 2 000 mg/kg; gavus B ir C rezultatus (akivaizdus toksiškumas arba jokio toksiškumo), pradinė pagrindinio bandymo dozė gali būti 5 000 mg/kg. Panašiai, jei skiriama kita nei 5 000 mg/kg pradinė dozė, bandymas bus tęsiamas iki 5 000 mg/kg, jei esant 2 000 mg/kg dozei gaunti B arba C rezultatai; jei esant 5 000 mg/kg gautas A rezultatas, pagrindinio bandymo pradinė dozė yra 2 000 mg/kg, o gavus B ir C rezultatus, pagrindinio bandymo pradinė dozė yra 5 000 mg/kg.

▼C1

Pagrindinis bandymas

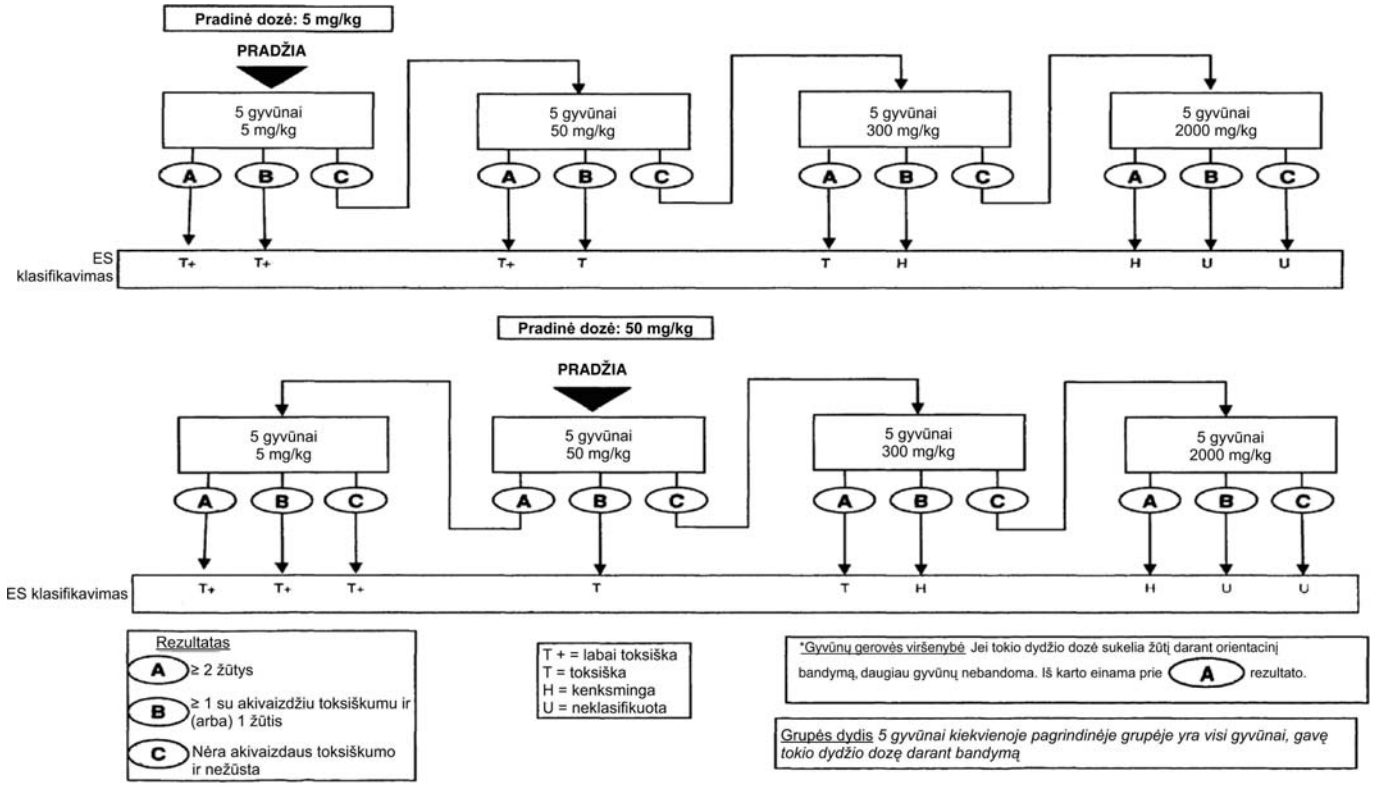
Sprendimo priėmimo taisyklės, taikomos 2 priedėlyje pateiktai nuosekliai procedūrai, išplečiamos, kad būtų galima įtraukti 5 000 mg/kg dozę. Taigi kai skiriama pagrindinio bandymo pradinė 5 000 mg/kg dozė, gavus A rezultatą (≥ 2 žūtys) reikės daryti 2 grupės bandymą, jai skiriant 2 000 mg/kg; gavus B rezultatą (akivaizdus toksiškumas ir (arba) ≤ 1 žūtis) arba C (jokio toksiškumo), medžiaga nebus klasifikuojama pagal GHS. Panašiai, jei naudojama kita nei 5 000 mg/kg pradinė dozė, bandymas bus tęsiamas iki 5 000 mg/kg, jei esant 2 000 mg/kg dozei gaunamas C rezultatas; jei esant 5 000 mg/kg dozei gaunamas A rezultatas, medžiaga priskiriama GHS 5 kategorijai, o gavus B arba C rezultatus, medžiaga pagal GHS neklasifikuojama.

▼C1

4 PRIEDĖLIS

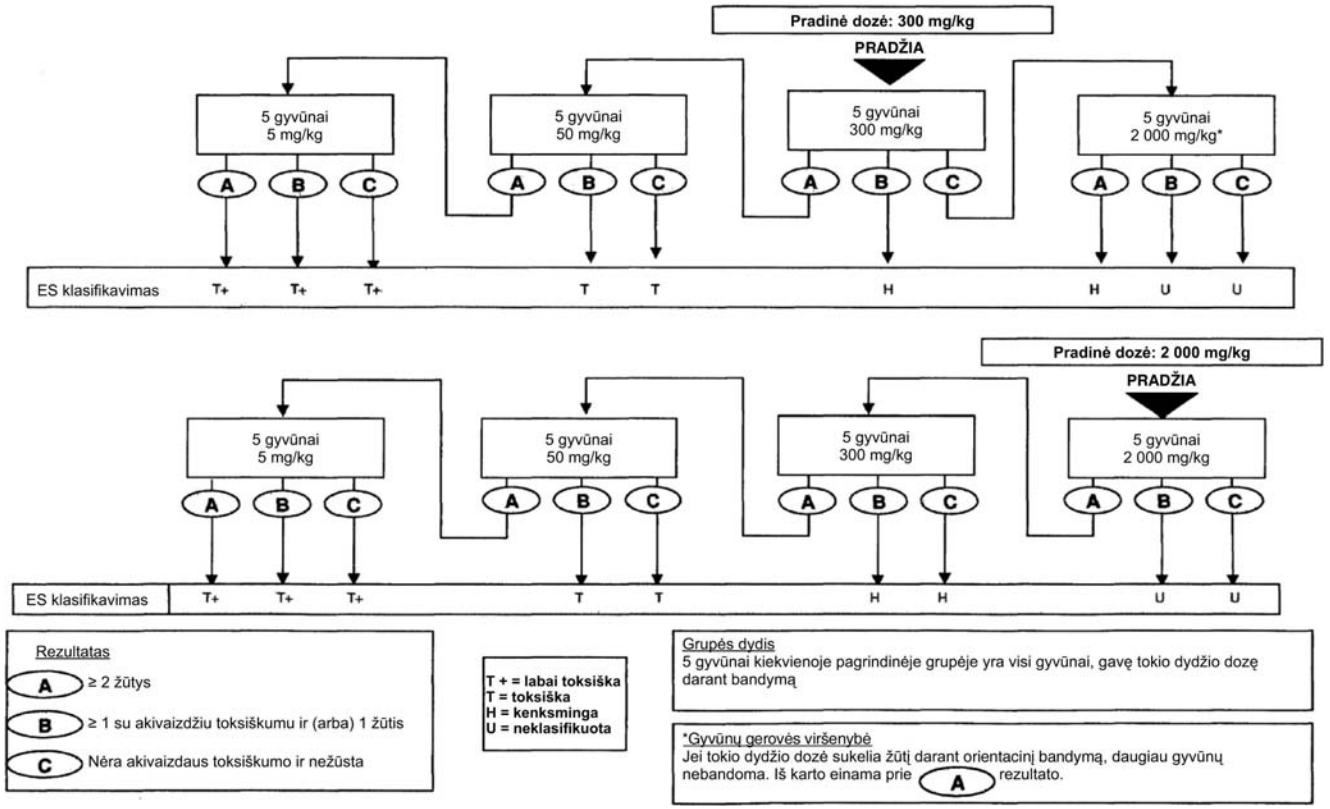
BANDYMŲ METODAS B.1 bis.

Klasifikavimo pagal ES schemą rekomendacijos, taikomos pareinamajam laikotarpiui iki visiško visuotinai suderintos klasifikavimo sistemos (GHS) įgyvendinimo (paimta iš (8) nuorodos)



02008R0440 — LT — 18.05.2017 — 007.001 — 214

▼C1


Pradinė dozė: 300 mg/kg
PRADŽIA
5 gyvūnai 5 mg/kg
5 gyvūnai 50 mg/kg
5 gyvūnai 300 mg/kg
5 gyvūnai 2 000 mg/kg*
A B C
ES klasifikavimas
T+ T+ T+ T T H H U U
Pradinė dozė: 2 000 mg/kg
PRADŽIA
5 gyvūnai 5 mg/kg
5 gyvūnai 50 mg/kg
5 gyvūnai 300 mg/kg
5 gyvūnai 2 000 mg/kg
ES klasifikavimas
T+ T+ T+ T T H H U U
Rezultatas
A ≥ 2 žūtys
B ≥ 1 su akivaizdžiu toksiškumu ir (arba) 1 žūtis
C Nėra akivaizdaus toksiškumo ir nežūsta
T + = labai toksiška
T = toksiška
H = kenksminga
U = neklasifikuota
Grupės dydis
5 gyvūnai kiekvienoje pagrindinėje grupėje yra visi gyvūnai, gavę tokio dydžio dozę darant bandymą
*Gyvūnų gerovės viršenybė
Jei tokio dydžio dozė sukelia žūtį darant orientacinį bandymą, daugiau gyvūnų nebandoma. Iš karto einama prie A rezultato.

▼C1

B.1 tris. **ŪMUS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ. ŪMAUS TOKSIŠKUMO KLASĖS METODAS**

1. **METODAS**

Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 423 (2001)

1.1. ĮVADAS

Šiame bandyme taikomas ūmaus toksiškumo klasės metodas (1) – tai nuosekli procedūra, pagal kurią vienai pakopai naudojami 3 vienos lyties gyvūnai. Atsižvelgiant į gaištamumą ir (arba) gyvūno gaišimo būseną, vidutiniškai gali prireikti 2–4 pakopų, kad būtų galima spręsti apie bandomosios medžiagos ūmų toksiškumą. Ši metodika yra atkuriama, ją taikant naudojama daug mažiau gyvūnų ir ji leidžia suskirstyti medžiagas panašiai, kaip tai būtų padaryta taikant kitus ūmaus toksiškumo bandymo metodus. Ūmaus toksiškumo klasės metodas pagrįstas biometriniais įvertinimais (2) (3) (4) (5), naudojant fiksuotas dozes, kurios pakankamai skiriasi, kad medžiagą būtų galima suklasifikuoti ir įvertinti jos pavojingumą. 1996 m. priimto metodo tinkamumas buvo plačiai patvirtintas nacionaliniu (6) ir tarptautiniu mastu (7) darant *in vivo* bandymus ir lyginant su literatūroje pateiktais LD_{50} duomenimis.

Rekomendacijas dėl nurodytam tikslui tinkamiausio bandymų metodo pasirinkimo galima rasti Ūmaus toksiškumo per virškinamąjį traktą bandymo rekomendaciniame dokumente (8). Be to, šiame rekomendaciniame dokumente yra papildomos informacijos apie B.l tris bandymo metodo taikymą ir aiškinimą.

Nereikia duoti dozių, jei žinoma, kad jos sukelia didelį skausmą ir kančią dėl ėsdinančio arba stipriai dirginančio poveikio. Gaištantys gyvūnai arba gyvūnai, kurie akivaizdžiai patiria skausmą arba kuriems pasireiškia didelės ir ilgalaikės kančios požymiai, turi būti humaniškai numarinami ir interpretuojant bandymo rezultatus laikomi darant bandymą žuvusiais gyvūnais. Sprendimo numarinti gaištantį arba stipriai kenčiantį gyvūną priėmimo kriterijai ir numatomos arba neišvengiamos žūties nustatymo rekomendacijos yra atskiro rekomendacinio dokumento objektas (9).

Metode naudojamos iš anksto nustatyto dydžio dozės, o rezultatai leidžia medžiagą įvertinti ir ją suklasifikuoti pagal Visuotinai suderintą ūmų toksinį poveikį sukeliančių cheminių medžiagų klasifikavimo sistemą (*Globally Harmonised System (GHS) for the classification of chemicals which cause acute toxicity*) (10).

Iš esmės šis metodas nėra skirtas tikslioms LD_{50} vertėms apskaičiuoti, bet juo galima nustatyti apibrėžtus žūtį sukeliančių dozių intervalus, kadangi tokio bandymo tikslas ir yra nustatyti, ar dalis gyvūnų žūsta. Šiuo metodu galima nustatyti LD_{50} vertę tik tais atvejais, kai mažiausiai dviejų dozių sukeliamas gaištamumas yra didesnis kaip 0 % ir mažesnis kaip 100 %. Kai skiriamos iš anksto pasirinkto dydžio dozės neatsižvelgiant į bandomąją medžiagą, o klasifikavimas tiesiogiai siejamas su stebimų skirtingos būsenos gyvūnų skaičiumi, laboratorijoms didėja galimybė pasiekti suderinamų ir atkartojamų rezultatų.

▼C1

Prieš bandymo pradžią bandymų laboratorija išnagrinėja visą turimą informaciją apie bandomąją medžiagą. Tokią informaciją sudaro medžiagos tapatumas ir cheminė struktūra, jos fizikinės ir cheminės savybės, visų kitų *in vitro* arba *in vivo* medžiagos toksiškumo bandymų rezultatai, giminingos struktūros medžiagų toksikologiniai duomenys ir numatomas (-i) medžiagos naudojimo būdas (-ai). Ši informacija yra būtina siekiant įsitikinti, kad bandymas reikalingas žmonių sveikatos apsaugos tikslais, ir padeda pasirinkti tinkamą pradinę dozę.

1.2. APIBRĖŽTYS

Ūmus TOKSIŠKUMAS PER virškinamąjį traktą – neigiamas poveikis, kuris atsiranda gavus per virškinamąjį traktą vieną medžiagos dozę arba kelias dozes per 24 h.

Uždelsta žūtis – kai gyvūnas nenugaišta arba nepradeda gaišti per 48 h, bet nugaišta vėliau per 14 parų stebėjimo laikotarpį.

Dozė – gyvūnui duotas bandomosios medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama bandomosios medžiagos mase bandomojo gyvūno masės vienetui (pvz., mg/kg)

GHS – visuotinai suderinta cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo sistema (*Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures*). Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacijos (OECD) (žmonių sveikata ir aplinka), JT pavojingų prekių gabenimo ekspertų komiteto (fizikinės ir cheminės savybės) ir Tarptautinės darbo organizacijos (ILO) (pranešimas apie pavojus) bendra veikla, koordinuojama pagal Bendrą organizacijų tinkamo cheminių medžiagų valdymo programą (*Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals* (IOMC))

Neišvengiama žūtis – kai gaišimo būsena arba žūtis numatoma anksčiau negu nustatytas kito planinio stebėjimo momentas. Graužikams šios būsenos požymiai galėtų būti traukuliai, gulėjimas ant šono, gulėjimas horizontaliai ir drebulys. (Daugiau informacijos pateikta rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (9)).

LD_{50} (vidutinė mirtina dozė) – statistiškai apskaičiuota per virškinamąjį traktą duodama medžiagos dozė, nuo kurios tikėtinai gali žūti 50 % gyvūnų. LD_{50} vertė išreiškiama bandomosios medžiagos mase bandomojo gyvūno masės vienetui (mg/kg).

Ribinė dozė – dozė, atitinkanti viršutinę bandymo dozės ribą (2 000 arba 5 000 mg/kg).

Gaišimo būsena – būsena prieš žūtį arba neišvengiamos žūties, net jei gyvūnas gydomas, būsena. (Daugiau informacijos pateikta rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (9)).

Numatoma žūtis – klinikinių požymių, rodančių žūtį žinomu ateities momentu prieš eksperimento pabaigą, pvz., nesugebėjimas pasiekti vandens arba pašaro, buvimas. (Daugiau informacijos pateikta rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (9)).

▼C1

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Šio bandymo esmę sudaro nuoseklusis metodas, pagal kurį vienai pakopai naudojant mažiausią įmanomą gyvūnų skaičių gaunama pakankamai informacijos apie bandomosios medžiagos ūmų toksiškumą, kad būtų galimą ją klasifikuoti. Bandymo gyvūnų grupė per virškinamąjį traktą gauna vieną iš nustatytų bandomosios medžiagos dozių. Medžiaga bandoma taikant nuoseklųjį metodą, kiekvienai pakopai naudojant po tris vienos lyties gyvūnus (paprastai pateles). Tai, ar junginio dozę gavę gyvūnai nugaišta per vieną pakopą, lemia, kokia yra tolesnė pakopa, t. y.:

— toliau bandyti nereikia,

— duoti tokią pat dozę dar trims gyvūnams,

— trims papildomiems gyvūnams duoti kitą didesnę arba mažesnę dozę.

Bandymo metodika išsamiai aprašyta 1 priedėlyje. Metodas leidžia spręsti, ar bandomąją medžiagą priskirti vienai iš toksiškumo klasių, apibrėžtų fiksuotomis LD_{50} intervalo ribinėmis vertėmis.

1.4. METODO APRAŠYMAS

1.4.1. **Gyvūnų rūšies pasirinkimas**

Tinkamiausia graužikų rūšis yra žiurkės, nors galima naudoti ir kitus graužikus. Paprastai naudojamos patelės (9). Taip yra todėl, kad literatūros apie tipinius LD_{50} bandymus analizė rodo, kad jautrumo skirtumai tarp lyčių yra maži, bet tais atvejais, kai jie yra, patelės dažniausiai yra šiek tiek jautresnės (11). Tačiau jei giminingos struktūros cheminių junginių toksikologinės arba toksikokinetinės savybės rodo, kad jautresni gali būti patinai, turėtų būti naudojama ši lytis. Kai bandymai daromi su patinais, turėtų būti pateiktas atitinkamas pagrindimas.

Bandomi sveiki, jauni, bet suaugę plačiai naudojamų laboratorinių rūšių gyvūnai. Patelės turi būti neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos. Kiekvieno gyvūno amžius prieš skiriant dozę turėtų būti nuo 8 iki 12 savaičių, o masė ± 20 % tikslumu turi atitikti anksčiau dozę gavusių gyvūnų vidutinę masę.

1.4.2. **Laikymo ir šėrimo sąlygos**

Bandomų gyvūnų patalpos temperatūra turi būti 22 °C (± 3 °C). Nors santykinė oro drėgmė turėtų būti mažiausiai 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikėtų siekti, kad ji būtų 50–60 %. Apšvietimas turi būti dirbtinis ir jo seka: 12 h šviesos ir 12 h tamsos. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorinių gyvūnų pašaras, geriamojo vandens kiekis neribojamas. Gyvūnai gali būti laikomi grupėmis narveliuose, į grupes skirstant pagal jų gaunamą dozę, tačiau gyvūnų skaičius narvelyje neturi trukdyti aiškiai stebėti kiekvieną gyvūną.

▼C1

1.4.3. **Gyvūnų ruošimas**

Gyvūnai atrenkami atsitiktinai, ženklinami, kad būtų įmanoma identifikuoti kiekvieną gyvūną, ir prieš dozių davimo pradžią laikomi narveliuose mažiausiai 5 paras, kad priprastų prie laboratorijos sąlygų.

1.4.4. **Dozių ruošimas**

Paprastai bandomoji medžiaga duodama tokio paties tūrio dozėmis, keičiama tik preparato koncentracija. Tačiau jei reikia bandyti skystą galutinį produktą arba mišinį, paskesniam šios bandomosios medžiagos rizikos įvertinimui galbūt labiau tiktų neskiesta, t. y. pastovios koncentracijos, bandomoji medžiaga, to reikalauja ir kai kurios reglamentuojančios institucijos. Bet kuriuo atveju didžiausias skiriamos dozės tūris neturi būti viršytas. Didžiausias skysčio tūris, kurį galima duoti vienu metu, priklauso nuo bandomo gyvūno dydžio. Graužikams šis tūris paprastai turi būti ne didesnis kaip 1ml/100g kūno masės, tačiau vandeninių tirpalų atveju galima duoti 2 ml/100g kūno masės. Kalbant apie dozuojamo preparato sudėtį, rekomenduojama naudoti, jei įmanoma, vandeninį tirpalą (suspensiją, emulsiją), toliau pirmenybė teikiama aliejiniam tirpalui (emulsijai, suspensijai) (pvz., kukurūzų aliejaus) ir tik po jų galimi kitų nešiklių tirpalai. Jei nešiklis yra ne vanduo, turi būti žinomos jo toksikologinės charakteristikos. Dozės turi būti ruošiamos prieš pat davimą, išskyrus kai preparato stabilumas naudojimo laikotarpiu yra žinomas ir laikomas priimtinu.

1.5. BANDYMO EIGA

1.5.1. **Dozavimas**

Bandomoji medžiaga duodama kaip vienetinė dozė per skrandžio zondą arba tinkamą intubacinį vamzdelį. Esant neįprastoms aplinkybėms, kai neįmanoma duoti vienetinės dozės, ji gali būti duodama mažesnėmis dalimis ne ilgiau kaip per 24 h.

Prieš duodant dozę gyvūnai nešeriami (pvz., žiurkės negauna pašaro, išskyrus vandenį, per naktį; pelės negauna pašaro, išskyrus vandenį, 3–4 h). Pasibaigus badavimo laikotarpiui, gyvūnai pasveriami ir duodama bandomoji medžiaga. Gavusios bandomosios medžiagos žiurkės gali būti nešeriamos dar 3–4 h, pelės nešeriamos 1–2 h. Jei dozė duodama dalimis per tam tikrą laikotarpį, gyvūnus gali tekti šerti ir girdyti atsižvelgiant į laikotarpio trukmę.

1.5.2. **Gyvūnų skaičius ir dozių dydis**

Kiekvienai pakopai naudojami trys gyvūnai. Dozė, kuri turi būti naudojama kaip pradinė dozė, pasirenkama iš keturių fiksuotų dydžių: 5, 50, 300 ir 2 000 mg/kg kūno masės. Kaip pradinė turėtų būti pasirinkta tokia dozė, nuo kurios tikrai nugaištų kai kurie dozę gavę gyvūnai. Schemose, pateiktose 1 priedėlyje, aprašyta procedūra, kurią reikėtų taikyti kiekvienai pradinei dozei. Be to, 4 priedėlyje pateiktas klasifikavimo metodas pagal ES sistemą, taikytinas iki bus įgyvendinta nauja GHS.

▼C1

Kai turima informacija leidžia manyti, kad gyvūnai neturėtų nugaišti nuo didžiausios pradinės dozės (2 000 mg/kg kūno masės), reikėtų daryti ribinį bandymą. Jei informacijos apie bandomąją medžiagą nėra, dėl gyvūnų gerovės priežasčių pradine doze reikėtų pasirinkti 300 mg/kg kūno masės.

Laiko tarpą tarp kiekvieno dydžio dozių davimo lemia toksiškumo požymių atsiradimo pradžia, trukmė ir sunkumas. Kitos dozės davimas gyvūnams atidedamas tol, kol bus įsitikinta, kad išgyveno anksčiau dozę gavę gyvūnai.

Išimtiniais atvejais ir tik jei tai pagrįsta tam tikrais reguliavimo sumetimais, galima spręsti, ar skirti papildomą viršutinės ribos fiksuotą 5 000 mg/kg dydžio dozę (žr. 2 priedėlį). Dėl gyvūnų gerovės priežasčių neskatinama atlikti bandymo taikant GHS 5 kategorijos intervalą (2 000–5 000 mg/kg) ir apie tokio bandymo reikalingumą turėtų būti sprendžiama, kai yra didelė tikimybė, kad jo rezultatai yra tiesiogiai sietini su žmonių arba gyvūnų sveikatos arba aplinkos apsauga.

1.5.3. **Ribinis bandymas**

Ribinis bandymas visų pirma atliekamas tais atvejais, kai bandytojas turi informacijos, rodančios, kad bandomoji medžiaga greičiausiai yra netoksiška, t. y. toksiškumas pasireiškia esant didesnėms nei reglamentuojamos ribinėms dozėms. Apie bandomosios medžiagos toksiškumą galima sužinoti remiantis informacija apie panašius bandytus junginius arba panašius bandytus mišinius ar produktus, atsižvelgiant į toksikologiškai reikšmingų komponentų tapatumą ir procentinę dalį. Tais atvejais, kai informacijos apie medžiagos toksiškumą yra mažai arba jos išvis nėra, arba kai ta informacija leidžia manyti, kad bandomoji medžiaga yra toksiška, turi būti atliekamas pagrindinis bandymas.

Kai skiriama viena 2 000 mg/kg kūno masės dozė, ribiniam bandymui galima imti šešis gyvūnus (po tris vienai pakopai). Išimtiniais atvejais, kai skiriama viena 5 000 mg/kg dozė, ribiniam bandymui galima naudoti tris gyvūnus (žr. 2 priedėlį). Jei pastebimas su medžiaga siejamas gaišimas, gali tekti daryti bandymą esant gretimai mažesnei dozei.

1.6. STEBĖJIMAI

Kiekvienas dozę gavęs gyvūnas stebimas bent vieną kartą per pirmąsias 30 min. ir periodiškai per pirmąsias 24 h, skiriant ypatingą dėmesį pirmosioms keturioms valandoms, o vėliau kartą per dieną visas 14 parų, išskyrus atvejus, kai gyvūnams reikia nutraukti bandymą ir humaniškai numarinti dėl gyvūnų gerovės priežasčių arba kai jie nugaišta. Tačiau stebėjimo trukmė neturi būti griežtai fiksuojama. Ji nustatoma pagal toksines reakcijas, sveikimo laikotarpio pradžią ir trukmę, taigi prireikus ji gali būti pratęsta. Svarbus yra toksiškumo požymių atsiradimo ir išnykimo momentas, ypač jei yra uždelsto toksiškumo tendencija (12). Visi stebėjimai sistemingai užrašomi, apie kiekvieną gyvūną atskirai.

▼C1

Jei gyvūnams ir toliau pasireiškia toksiškumo požymiai, reikia stebėti papildomai. Reikia stebėti odos ir kailio, akių ir gleivinės pasikeitimus, be to kvėpavimo, kraujo, autonominės ir centrinės nervų sistemų, somatomotorinio aktyvumo ir elgesio pasikeitimus. Ypač reikia stebėti, ar nepasireiškia drebulys, traukuliai, viduriavimas, mieguistumas, miego ir komos būsenos, ar neteka seilės. Reikėtų atsižvelgti į principus ir kriterijus, apibendrintus Rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (9). Gaištantys gyvūnai ir gyvūnai, kurie patiria didelius skausmus arba kuriems pasireiškia ilgalaikiai sunkių kančių požymiai, turėtų būti humaniškai numarinami. Kai gyvūnai numarinami dėl gyvūnų gerovės priežasčių arba randami negyvi, žūties laikas užrašomas kuo tiksliau.

1.6.1. **Kūno masė**

Kiekvieno gyvūno masė turi būti nustatoma prieš pat bandomosios medžiagos davimą ir vėliau mažiausiai kas savaitę. Turi būti apskaičiuotas ir užrašytas masės pokytis. Pasibaigus bandymui, išlikę gyvūnai pasveriami ir humaniškai numarinami.

1.6.2. **Patologija**

Visiems bandomiesiems gyvūnams (įskaitant nugaišusius per bandymą arba pašalintus iš bandymo dėl gyvūnų gerovės priežasčių) daroma bendroji nekroskopija. Turėtų būti aprašomi visi dideli kiekvieno gyvūno patologiniai pokyčiai. Gyvūnams, kurie išgyveno 24 h arba ilgiau, galima būtų atlikti mikroskopinį organų, turinčių akivaizdžių patologinių pokyčių, tyrimą, kadangi jis gali suteikti naudingos informacijos.

2. **DUOMENYS**

Turėtų būti pateikiami atskiri duomenys apie kiekvieną gyvūną. Be to, visi duomenys apibendrinami lentelėse, kuriose nurodomas kiekvienos bandymo grupės gyvūnų skaičius, toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičius, darant bandymą žuvusių arba dėl gyvūnų gerovės priežasčių numarintų gyvūnų skaičius, atskirų gyvūnų žūties laikas, toksinio poveikio aprašymas ir eiga, grįžtamumas, nekroskopijos duomenys.

3. **ATASKAITOS RENGIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija, jei taikoma:

Bandomoji medžiaga:

— fizikinė būsena, grynumas ir, jei svarbu, fizikinės ir cheminės savybės (įskaitant izomerizavimą),

— tapatumas, įskaitant CAS numerį.

Nešiklis (jei taikoma):

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei tai ne vanduo.

Bandomieji gyvūnai:

— naudota rūšis ir veislė,

▼C1

— mikrobiologinė gyvūno būsena, jei žinoma,

— gyvūnų skaičius, amžius ir lytis (įskaitant, jei taikoma, patinų vietoj patelių naudojimo pagrindimą),

— šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.

Bandymo sąlygos:

— išsami informacija apie bandomosios medžiagos sudėtį, įskaitant duodamos medžiagos fizikinį pavidalą,

— išsami informacija apie bandomosios medžiagos davimą, įskaitant dozės tūrį ir davimo laiką,

— išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę (įskaitant pašaro tipą (šaltinį), vandens šaltinį),

— pradinės dozės pasirinkimo pagrindimas.

Rezultatai:

— kiekvieno gyvūno reakcijos duomenų ir dozės dydžio lentelės (t. y. gyvūnų, kuriems pasireiškia toksiškumo požymiai, įskaitant nugaišimą, poveikio tipą, sunkumą ir trukmę),

— kūno masės ir jos kitimo lentelės,

— kiekvieno gyvūno masė dozės davimo dieną, vėliau kas savaitę ir žūties arba numarinimo dieną,

— žūties data ir laikas, jei tai įvyksta prieš planinį numarinimą,

— toksiškumo požymių kiekvienam gyvūnui atsiradimas ir jų eiga, taip pat grįžtamumas kiekvieno gyvūno atveju,

— kiekvieno gyvūno nekroskopijos ir histopatologiniai duomenys, jei yra.

Rezultatų aptarimas ir aiškinimas.

Išvados.

4. **NUORODOS**

1) Roll R., Hofer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, p. 86

2) Roll R., Riebschlager M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizitat von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, p. 336–341.

3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, p. 559–610

4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, p. 729–734.

5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, p. 129–134

6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method – An Alternative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, p. 455–470.

▼C1

7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, p. 659–670.

8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in SAFEty Evaluation. Environmental Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521–14-no-24-no-0,FF.html].

11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, p. 223–231.

12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼C1

1 PRIEDĖLIS

PROCEDŪRA, TAIKOMA NAUDOJANT KIEKVIENĄ PRADINĘ DOZĘ

BENDROSIOS PASTABOS

Į šį priedą įtrauktose atitinkamose bandymo schemose aprašoma kiekvienos pradinės dozės procedūra, kurios reikia laikytis.

— 1 A priedėlis: pradinė dozė 5 mg/kg kūno masės

— 1 B priedėlis: pradinė dozė 50 mg/kg kūno masės

— 1 C priedėlis: pradinė dozė 300 mg/kg kūno masės

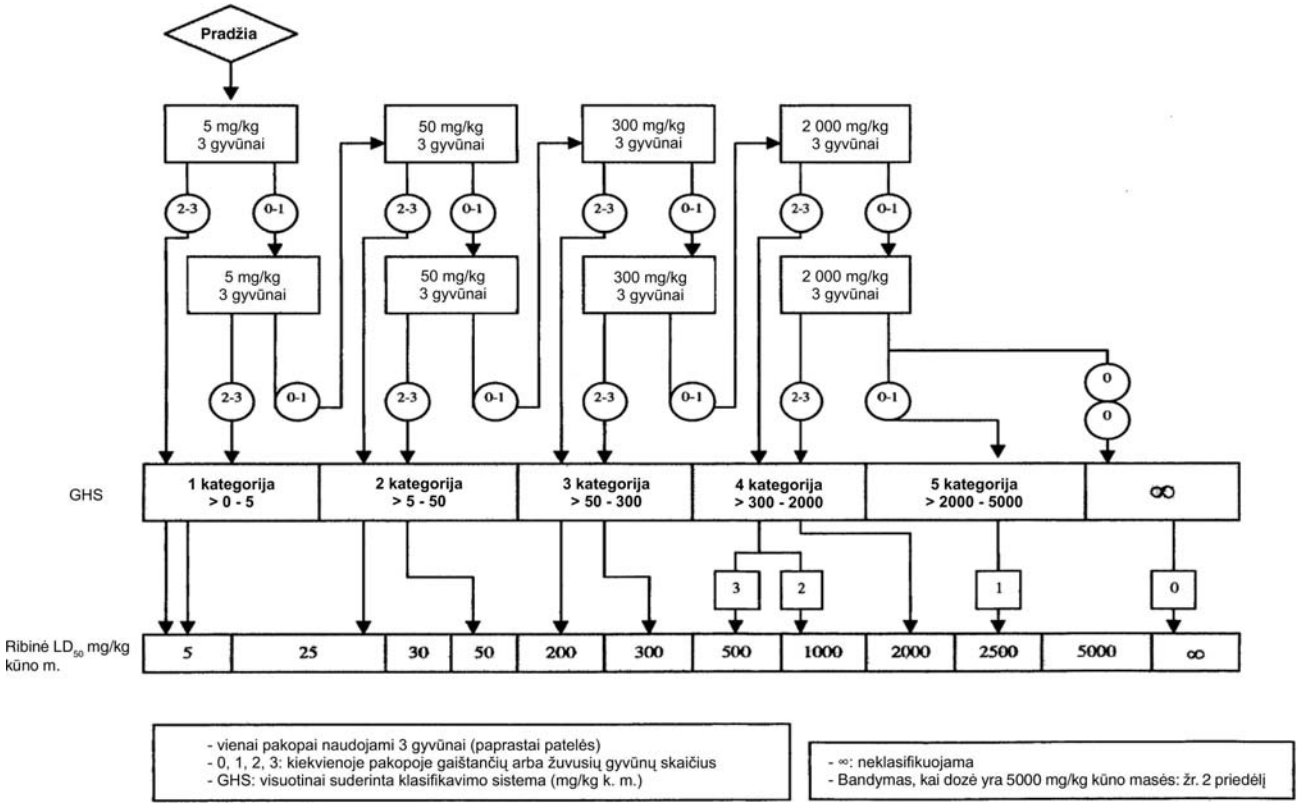
— 1 D priedėlis: pradinė dozė 2 000 mg/kg kūno masės

Atsižvelgiant į humaniškai numarintų arba nugaišusių gyvūnų skaičių, bandymo eiga žymima rodyklėmis.

▼C1

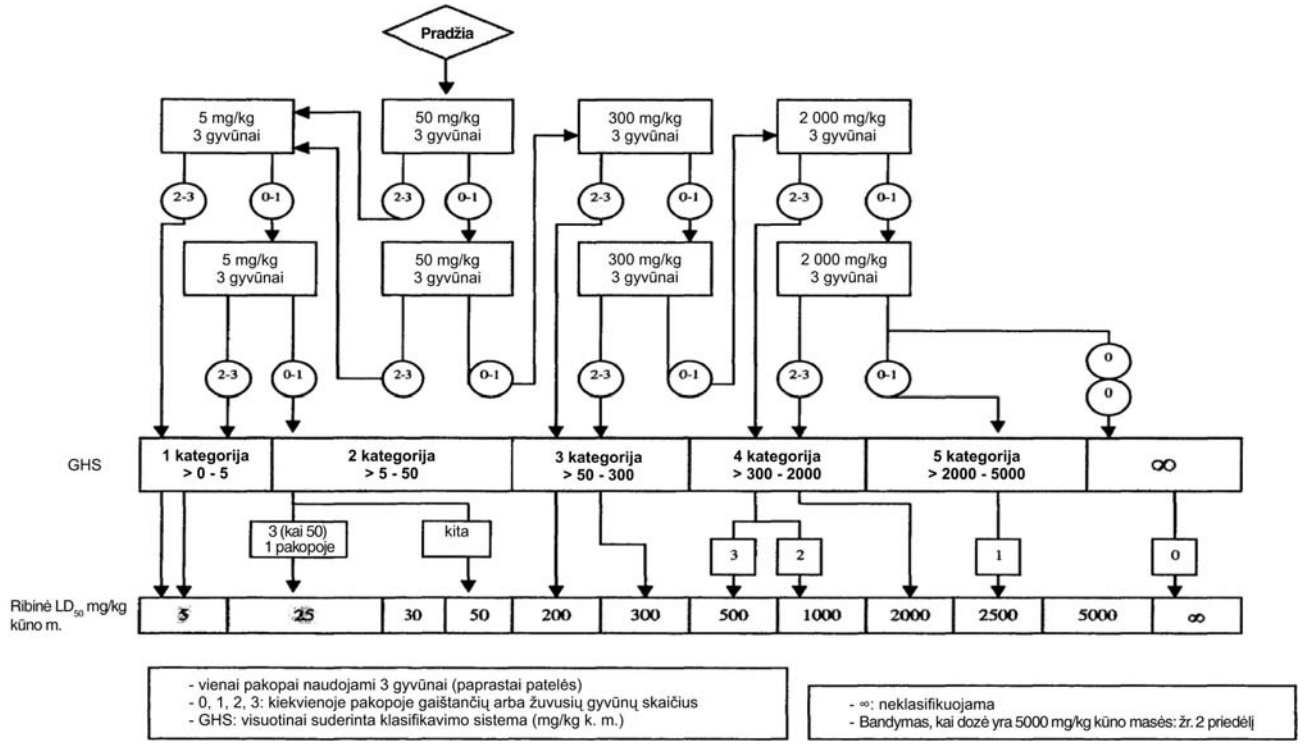
1 A PRIEDĖLIS

BANDYMO PROCEDŪRA, KAI PRADINĖ DOZĖ YRA 5 MG/KG KŪNO MASĖS



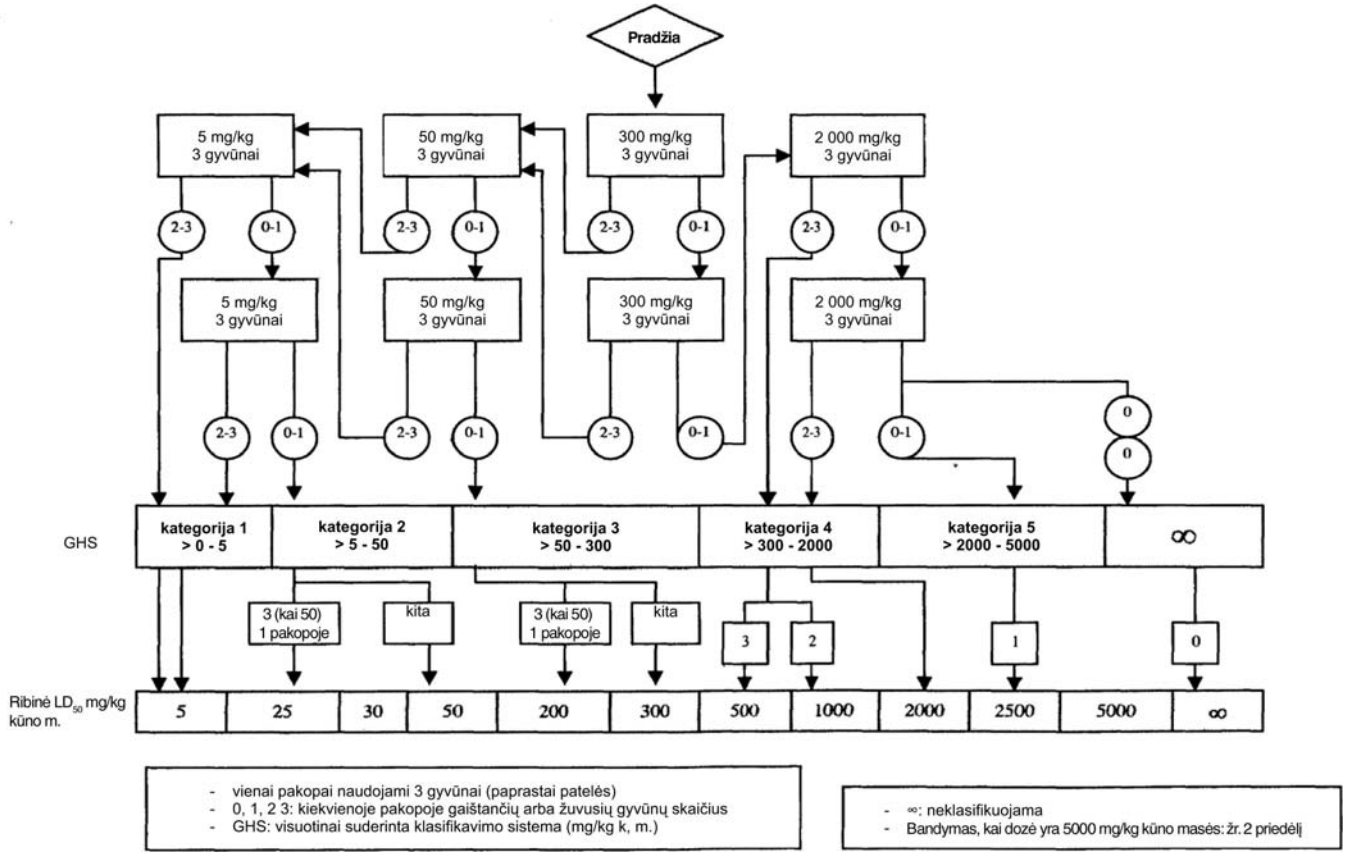
1 B PRIEDĖLIS

BANDYMO PROCEDŪRA, KAI PRADINĖ DOZĖ YRA 50 MG/KG KŪNO MASĖS



1 C PRIEDĖLIS

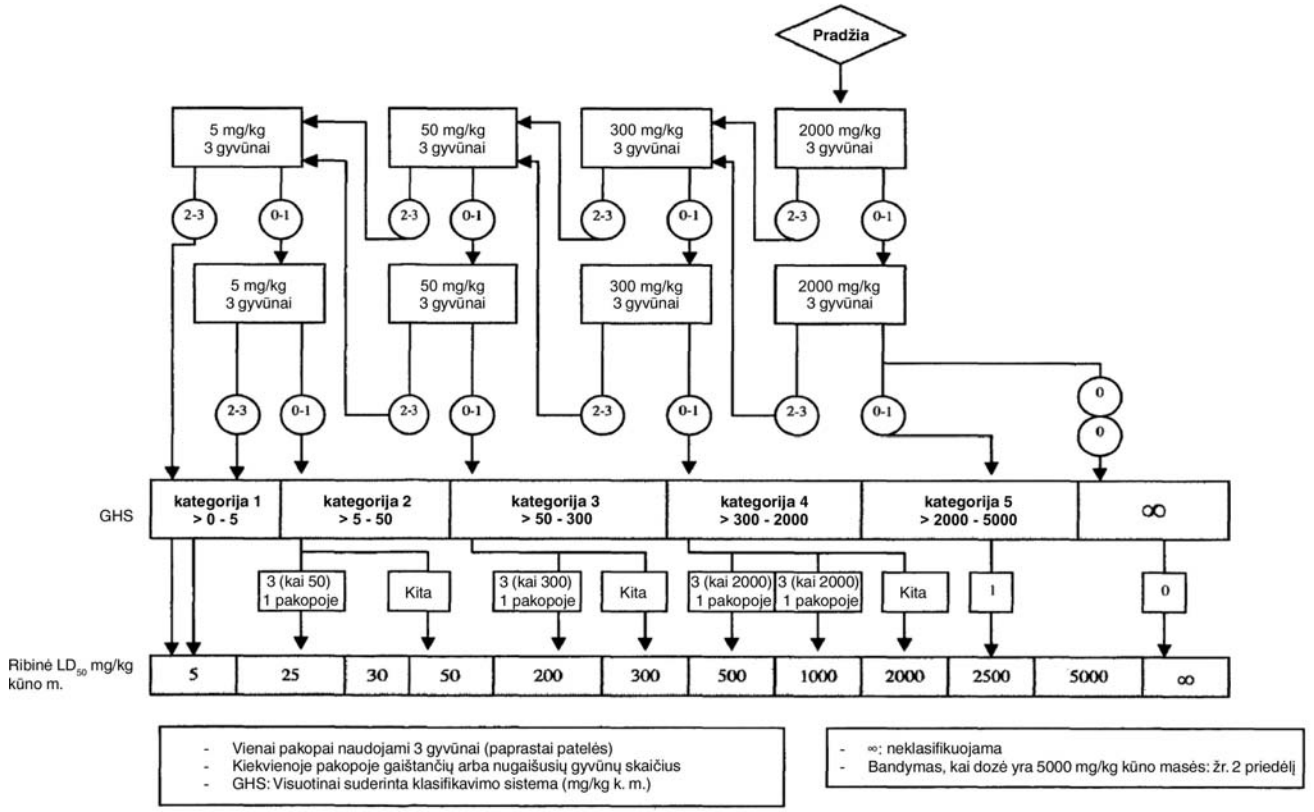
BANDYMO PROCEDŪRA, KAI PRADINĖ DOZĖ YRA 300 MG/KG KŪNO MASĖS



▼C1

1 D PRIEDĖLIS

BANDYMO PROCEDŪRA, KAI PRADINĖ DOZĖ YRA 2 000 MG/KG KŪNO MASĖS



02008R0440 — LT — 18.05.2017 — 007.001 — 228

▼C1

2 PRIEDĖLIS

BANDOMŲJŲ MEDŽIAGŲ, KURIŲ TIKĖTINOS LD_{50} VERTĖS YRA DIDESNĖS NEGU 2 000 MG/KG, KLASIFIKAVIMO KRITERIJAI NEDARANT BANDYMO

5 pavojaus kategorijos kriterijai yra apibrėžti, kad būtų galima nustatyti bandomąsias medžiagas, kurių ūmaus toksiškumo pavojus yra palyginti mažas, tačiau kurios esant tam tikroms aplinkybėms gali būti pavojingos pažeidžiamoms populiacijoms. Tikėtina, kad šių medžiagų LD_{50} per virškinamąjį traktą arba odą yra 2 000–5 000 mg/kg arba ekvivalentinė dozė, kai medžiagos patenka kitais būdais. Bandomosios medžiagos galėtų būti priskirtos pavojaus kategorijai, apibrėžtai 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (5 kategorija pagal GHS), šiais atvejais:

a) jei būtų priskirtos šiai kategorijai pagal kurią nors iš 1a-1d schemų, remiantis gaištamumo dažnumu;

b) jei jau yra patikimų duomenų, rodančių, kad LD_{50} yra 5 kategorijos verčių intervale, arba kiti bandymai su gyvūnais arba toksinis poveikis žmonėms rodo ūmaus tipo poveikį žmonių sveikatai;

c) gaunant duomenis ekstrapoliavimo, įvertinimo arba matavimo būdu, jei priskyrimas didesnio pavojaus klasei nepagrįstas ir

— yra patikimos informacijos, rodančios didelį toksinį poveikį žmonėms, arba

— pastebimas tam tikras gaištamumas, kai bandymas atliekamas per virškinamąjį traktą duodant dozes, siekiančias 4 kategorijos vertes, arba

— jei tęsiant bandymus iki 4 kategorijos verčių ekspertų sprendimu patvirtinami reikšmingi klinikiniai toksiškumo požymiai, išskyrus viduriavimą, pasišiaušusius plaukus arba nesveiko gyvūno išvaizdą, arba

— jei ekspertų sprendimu patvirtinama patikima darant kitus bandymus su gyvūnais gauta informacija, rodanti galimą reikšmingą ūmų poveikį.

BANDYMAS ESANT DIDESNĖMS KAIP 2 000 MG/KG DOZĖMS

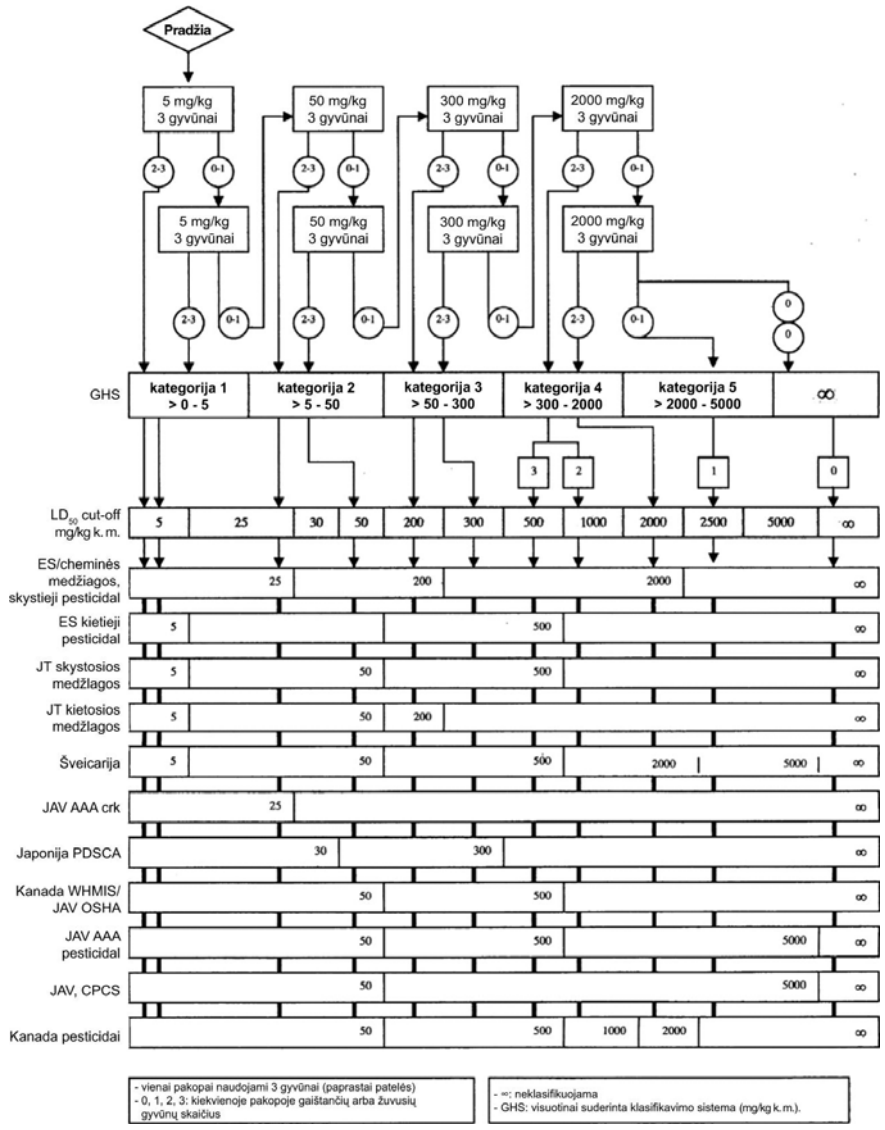
Pripažįstant būtinumą apsaugoti gyvūnų gerovę, bandymas su gyvūnais skiriant 5 kategorijos intervalo dozes (5 000 mg/kg) neskatinamas ir apie tokio bandymo būtinybę turėtų būti sprendžiama, kai yra didelė tikimybė, kad jo rezultatai yra tiesiogiai sietini su žmonių arba gyvūnų sveikatos apsauga (10). Neturi būti daromas joks bandymas esant didesnėms dozėms.

Kai reikia bandyti naudojant 5 000 mg/kg dozę, reikalinga tik viena pakopa (t. y. trys gyvūnai). Jei žūsta pirmas dozę gavęs gyvūnas, dozavimas tęsiamas skiriant 2 000 mg/kg dozę pagal 1 priedėlyje pateiktas schemas. Jei pirmas gyvūnas lieka gyvas, dozę gauna kiti du gyvūnai. Jei žūsta tik vienas iš trijų gyvūnų, daroma prielaida, kad LD_{50} vertė yra didesnė negu 5 000 mg/kg. Jei žūsta abu gyvūnai, dozavimas tęsiamas skiriant 2 000 mg/kg dozę.

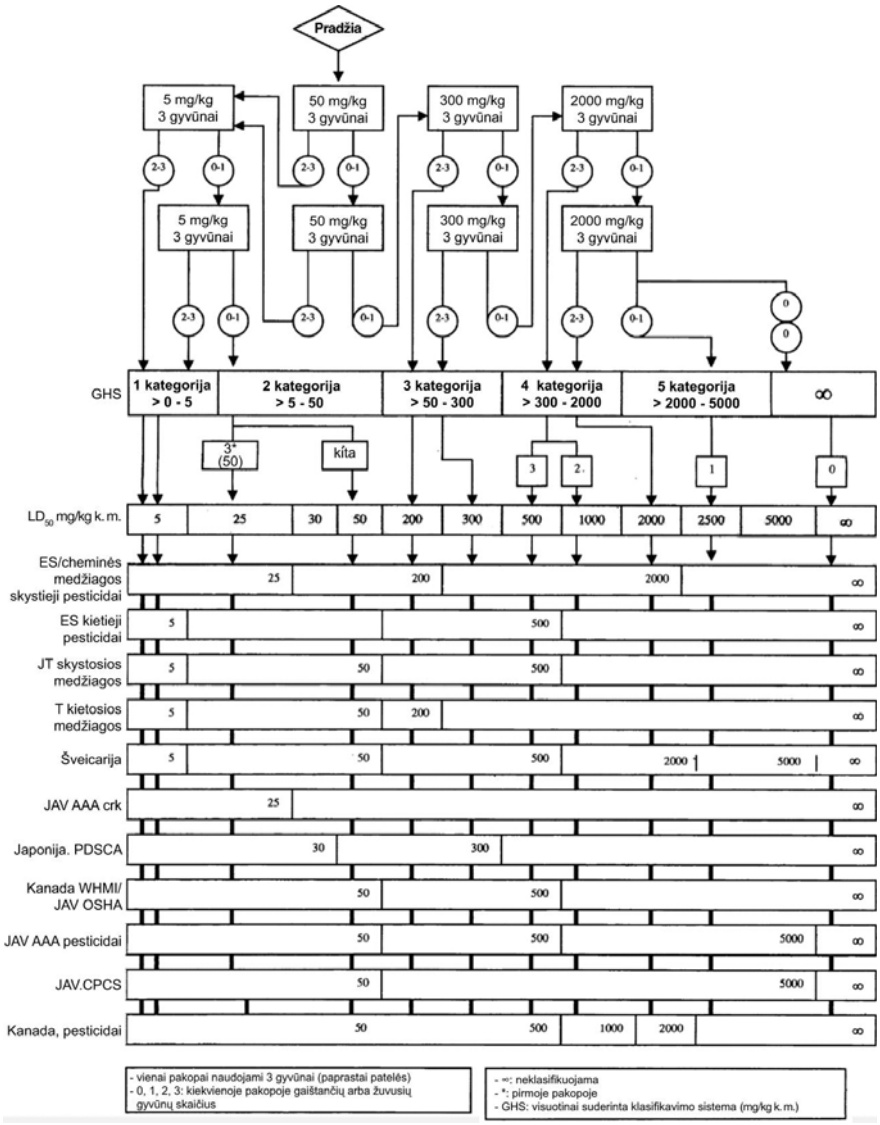
▼C1

3 PRIEDĖLIS

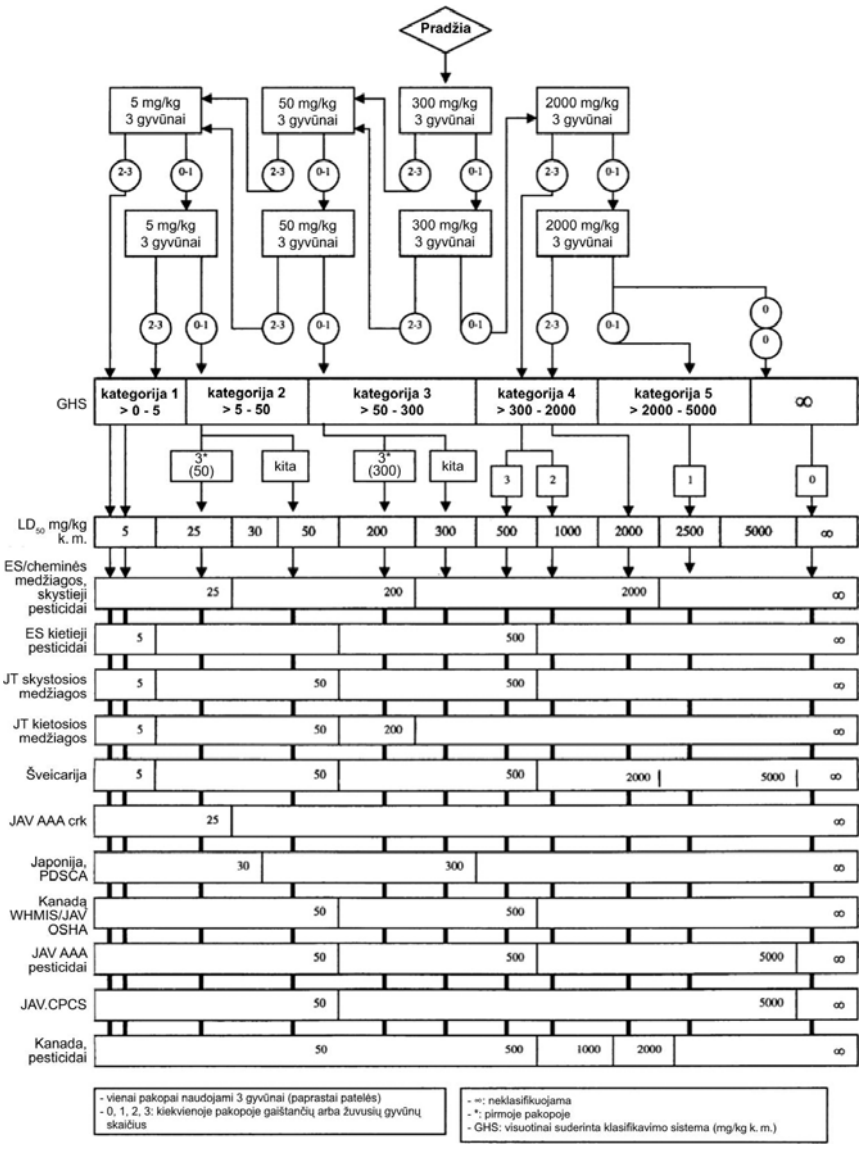
BANDYMŲ METODAS B.1 tris. Klasifikavimo pagal ES schemą rekomendacijos, taikomos pereinamajam laikotarpiui iki visiško visuotinai suderintos klasifikavimo sistemos (GHS) įgyvendinimo (paimta iš 8 nuorodos)



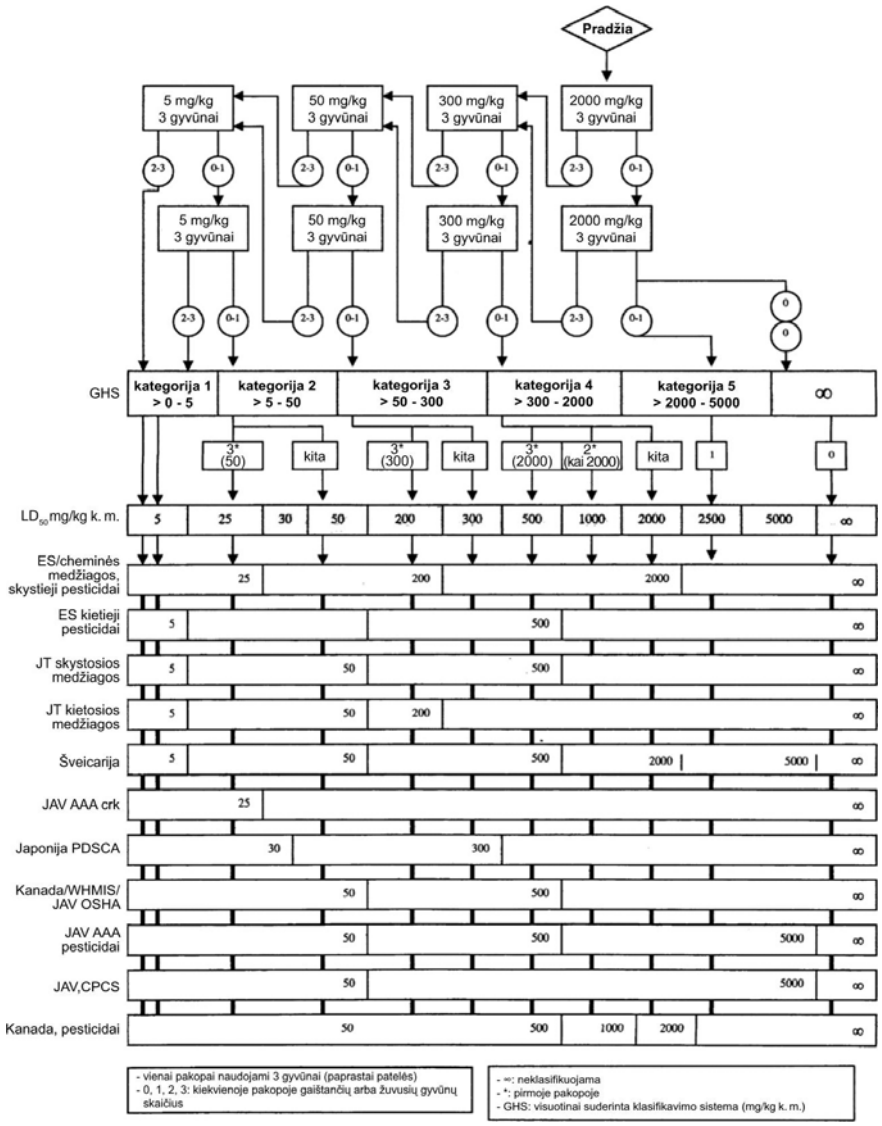
▼C1


Pradžia
5 mg/kg 3 gyvūnai
50 mg/kg 3 gyvūnai
300 mg/kg 3 gyvūnai
2000 mg/kg 3 gyvūnai
2-3
0-1
0
GHS
1 kategorija > 0 - 5
2 kategorija > 5 - 50
3 kategorija > 50 - 300
4 kategorija > 300 - 2000
5 kategorija > 2000 - 5000
∞
3* (50)
kita
LD50 mg/kg k. m.
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
ES/cheminės medžiagos skystieji pesticidai
ES kietieji pesticidai
JT skystosios medžiagos
T kietosios medžiagos
Šveicarija
JAV AAA crk
Japonija. PDSCA
Kanada WHMI/ JAV OSHA
JAV AAA pesticidai
JAV.CPCS
Kanada, pesticidai
- vienai pakopai naudojami 3 gyvūnai (paprastai patelės)
- 0, 1, 2, 3: kiekvienoje pakopoje gaištančių arba žuvusių gyvūnų skaičius
- *: neklasifikuojama
- *: pirmoje pakopoje
- GHS: visuotinai suderinta klasifikavimo sistema (mg/kg k.m.)

▼C1


Pradžia
5 mg/kg 3 gyvūnai
50 mg/kg 3 gyvūnai
300 mg/kg 3 gyvūnai
2000 mg/kg 3 gyvūnai
2-3
0-1
0
GHS
kategorija 1 > 0 - 5
kategorija 2 > 5 - 50
kategorija 3 > 50 - 300
kategorija 4 > 300 - 2000
kategorija 5 > 2000 - 5000
∞
3* (50)
kita
3* (300)
kita
3
2
1
0
LD50 mg/kg k. m.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
ES/cheminės medžiagos, skystieji pesticidai
ES kietieji pesticidai
JT skystosios medžiagos
JT kietosios medžiagos
Šveicarija
JAV AAA crk
Japonija, PDSCA
Kanada WHMIS/JAV OSHA
JAV AAA pesticidai
JAV.CPCS
Kanada, pesticidai
- vienai pakopai naudojami 3 gyvūnai (paprastai patelės)
- 0, 1, 2, 3: kiekvienoje pakopoje gaištančių arba žuvusių gyvūnų skaičius
- =: neklasifikuojama
- *: pirmoje pakopoje
- GHS: visuotinai suderinta klasifikavimo sistema (mg/kg k. m.)

▼C1


Pradžia
5 mg/kg 3 gyvūnai
50 mg/kg 3 gyvūnai
300 mg/kg 3 gyvūnai
2000 mg/kg 3 gyvūnai
2-3
0-1
0
GHS
kategorija 1 > 0 - 5
kategorija 2 > 5 - 50
kategorija 3 > 50 - 300
kategorija 4 > 300 - 2000
kategorija 5 > 2000 - 5000
∞
3* (50)
kita
3* (300)
3* (2000)
2* (kai 2000)
1
LD50 mg/kg k. m.
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
ES/cheminės medžiagos, skystieji pesticidai
ES kietieji pesticidai
JT skystosios medžiagos
JT kietosios medžiagos
Šveicarija
JAV AAA crk
Japonija PDSCA
Kanada/WHMIS/ JAV OSHA
JAV AAA pesticidai
JAV,CPCS
Kanada, pesticidai
- vienai pakopai naudojami 3 gyvūnai (paprastai patelės)
- 0, 1, 2, 3: kiekvienoje pakopoje gaištančių arba žuvusių gyvūnų skaičius
- ∞: neklasifikuojama
- *: pirmoje pakopoje
- GHS: visuotinai suderinta klasifikavimo sistema (mg/kg k. m.)

▼M4

B.2. ŪMUS TOKSIŠKUMAS ĮKVĖPUS

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka OECD „Test Guideline“ 403 (OECD bandymo gairės Nr. 403) (2009) (1). Pirmosios ūmaus toksiškumo įkvėpus bandymų gairės |Nr. 403 (TG 403) priimtos 1981 m. Šis atnaujintas B.2 bandymo metodas (lygiavertis atnaujintoms TG 403) parengtas siekiant užtikrinti didesnį lankstumą, naudoti mažiau gyvūnų ir įgyvendinti reglamentavimo reikmes. Atnaujintasis bandymo metodas sudarytas iš dviejų rūšių tyrimų: įprasto LC_{50} protokolo ir protokolo „Koncentracija × laikas“ („K × l“). Pagrindinės šio bandymo metodo savybės yra galimybė nustatyti koncentracijos ir reakcijos tarpusavio priklausomybę remiantis nemirtinomis ir mirtinomis pasekmėmis, siekiant nustatyti medianinę mirtiną koncentraciją (LC_{50}), nemirtiną ribinę koncentraciją (pvz., LC01) ir kreivės nuolydį, taip pat galimą jautrumą pagal lytį. „K × l“ protokolas turėtų būti naudojamas tada, kai yra specialiųjų reglamentavimo arba mokslinių reikmių, dėl kurių būtina atlikti įvairios trukmės bandymus su gyvūnais, pvz., reagavimo į nepaprastąsias aplinkybes planavimo [pvz., ūmaus poveikio rekomendacinių lygių (ŪPRL) nustatymo, reagavimo į nepaprastąsias aplinkybes planavimo gairių (RNAPG) parengimo arba ūmaus poveikio ribinių lygių (ŪPRL) verčių nustatymo] arba žemėnaudos planavimo tikslais.

2. Šio bandymo metodo tyrimų atlikimo ir aiškinimo gairės pateiktos rekomendaciniame dokumente dėl ūmaus toksiškumo įkvėpus bandymo (RD Nr. 39) (2).

3. Aprašant šį bandymo metodą vartojamos apibrėžtys pateiktos šio skyriaus pabaigoje ir RD Nr. 39 (2).

4. Šiuo bandymo metodu galima nustatyti bandomosios cheminės medžiagos savybes ir atlikti kokybinį rizikos vertinimą, taip pat įvertinti ir klasifikuoti bandomąsias chemines medžiagas pagal Reglamentą (EB) Nr. 1272/2008 (3). RD Nr. 39 (2) pateikiamos rekomendacijos, kaip pasirinkti tinkamą bandymo metodą, skirtą ūmaus poveikio tyrimams. Kai reikalinga informacija tik apie klasifikavimą ir ženklinimą, paprastai rekomenduojama remtis šio priedo B.52 skyriumi (4) [žr. RD Nr. 39 (2)]. Šis (B.2) bandymo metodas nėra specialiai skirtas specialiosios paskirties medžiagų, pvz., mažo tirpumo izomerinių arba pluoštinių medžiagų arba dirbtinių nanomedžiagų, bandymams.

PIRMINIAI ASPEKTAI

5. Prieš svarstydama galimybę atlikti bandymus pagal šį bandymo metodą, bandymų laboratorija, siekdama sumažinti bandymų su gyvūnais poreikį, turėtų peržiūrėti visą turimą informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą, įskaitant esamus tyrimus (pvz., šio priedo B.52 skyrius (4)), kurių duomenys leistų neatlikti papildomų bandymų. Pasirinkti tinkamiausią gyvūnų rūšį, padermę, lytį, poveikio būdą ir tinkamas bandymų koncentracijas gali padėti informacija apie bandomosios cheminės medžiagos tapatumą, cheminę struktūrą, fizines ir chemines savybes, taip pat toksiškumo bandymų *in vitro* arba *in vivo* rezultatai, numatomi panaudojimo būdai ir galimas poveikis žmogui, turimi (Q)SAR duomenys ir toksikologiniai duomenys apie panašios struktūros chemines medžiagas [žr. RD Nr. 39 (2)].

▼M4

6. Turėtų būti kaip įmanoma vengiama atlikti ėsdinančių ir (arba) dirginančių bandomųjų cheminių medžiagų bandymus naudojant koncentracijas, kurios, tikėtina, sukeltų didelį skausmą ir (arba) kančią. Ėsdinimo ir (arba) dirginimo galimybė turėtų būti vertinama pasitelkiant ekspertų nuomonę ir remiantis tokiais įrodymais kaip patirtis su žmonėmis ir gyvūnais (pvz., remiantis kartotinių dozių tyrimais, atliktais naudojant neėsdinančias ir (arba) nedirginančias koncentracijas), turimi *in vitro* duomenys (pvz., remiantis šio priedo B.40 (5) ir B.40 bis (6) skyriais arba OECD TG 435 (OECD bandymo gairės Nr. 425) (7)), pH vertės, informacija apie panašias chemines medžiagas arba kiti tinkami duomenys, pvz., norint ištirti, ar galima neatlikti papildomų bandymų. Jeigu yra specialiųjų reglamentavimo reikmių (pvz., nepaprastųjų aplinkybių planavimo tikslais), taikant šį bandymo metodą gyvūnai gali būti veikiami šiomis medžiagomis, nes pagal šį bandymo metodą tyrimo vadovas arba vyriausiasis tyrėjas turi galimybę kontroliuoti tikslinių koncentracijų pasirinkimą. Tačiau tikslinės koncentracijos neturėtų sukelti stipraus dirginimo ir (arba) ėsdinimo, bet turėtų būti pakankamos, kad būtų galima pratęsti koncentracijos ir reakcijos tarpusavio priklausomybės kreivę į tokių lygių, kad būtų pasiektas reglamentavimo arba mokslinis tikslas, kurio siekiama bandymu. Šios koncentracijos turėtų būti parinktos atsižvelgiant į konkretų atvejį, ir turėtų būti pateiktas tokių koncentracijų pasirinkimo pagrindimas [žr. RD Nr. 39 (2)].

BANDYMO PRINCIPAS

7. Šis atnaujintasis B.2 bandymo metodas skirtas gauti pakankamai informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos ūmų toksiškumą, kad ją būtų galima klasifikuoti ir pateikti gaištamumo duomenis (pvz., $LC_{50,}$ LC_{01} ir kreivės nuolydis), susijusius su viena arba abejomis lytimis ir reikalingus kiekybiniams rizikos vertinimams. Pagal šį bandymo metodą siūlomi du metodai. Pirmasis metodas yra įprastas protokolas, pagal kurį gyvūnų grupės veikiamos ribine koncentracija (ribinis bandymas) arba iš anksto nustatytą laiką, paprastai – keturias valandas, veikiamos įvairiomis pamažu didinamomis koncentracijomis. Atsižvelgiant į specialius reglamentavimo tikslus, gali būti taikomi ir kitokie poveikio laikotarpiai. Antrasis metodas yra („K × l“) protokolas, pagal kurį gyvūnų grupės veikiamos viena (ribine) koncentracija arba įvairiais laikotarpiais veikiamos skirtingomis koncentracijomis.

8. Gaištantys gyvūnai arba gyvūnai, kurie akivaizdžiai patiria skausmą arba kuriems pasireiškia didelės ir ilgalaikės kančios požymių, turėtų būti humaniškai numarinami ir aiškinant bandymo rezultatą laikomi atliekant bandymą nugaišusiais gyvūnais. Sprendimo numarinti gaištančius arba sunkiai kenčiančius gyvūnus priėmimo kriterijai ir numatomos arba neišvengiamos žūties nustatymo rekomendacijos yra pateikti OECD rekomendaciniame dokumente Nr. 19 dėl pasekmių žmonėms (8).

METODO APRAŠYMAS

Gyvūnų rūšies parinkimas

9. Turėtų būti naudojami sveiki, jauni, bet suaugę plačiai naudojamų laboratorinių padermių gyvūnai. Tinkamiausia rūšis yra žiurkės; jeigu naudojama kita rūšis, turėtų būti pateiktas jos naudojimo pagrindimas.

Gyvūnų paruošimas

10. Patelės turėtų būti dar be vados ir neapvaisintos. Poveikio dieną gyvūnai turėtų būti jauni, bet suaugę, 8–12 savaičių amžiaus, o masė pagal kiekvieną lytį turėtų ± 20 % tikslumu atitikti anksčiau dozę gavusių gyvūnų vidutinę masę. Gyvūnai atrenkami atsitiktine tvarka ir paženklinami, kad būtų galima identifikuoti kiekvieną gyvūną. Ne mažiau kaip penkias paras iki bandymo pradžios gyvūnai laikomi savo narveliuose, kad priprastų prie laboratorinių sąlygų. Prieš bandymus gyvūnai taip pat turėtų būti trumpai papratinami prie bandymų aparatūros, nes tai padės sumažinti įtampą, kylančią patekus į naują aplinką.

▼M4

Gyvūnų laikymas

11. Bandomųjų gyvūnų laikymo patalpos temperatūra turėtų būti 22 ± 3 °C. Tinkamiausias santykinis drėgnis – 30–70 %, bet jis gali būti nepasiekiamas, jeigu naudojamas nešiklis yra vanduo. Prieš dozės davimą ir davus dozę gyvūnai turėtų būti laikomi narveliuose suskirstyti grupėmis pagal lytį ir koncentraciją; narvelyje laikomų gyvūnų skaičius turėtų būti toks, kad būtų galima aiškiai stebėti kiekvieną gyvūną ir kad būtų patiriama kuo mažiau žalos dėl kanibalizmo ir grumtynių. Jeigu dozė gyvūnams duodama tik per nosį, gali reikėti juos pripratinti prie uždaromųjų vamzdelių. Uždaromieji vamzdeliai gyvūnams neturėtų kelti didelės fizinės, terminės arba suvaržymo įtampos. Varžymas gali turėti fiziologinių pasekmių, pvz., turėti poveikio kūno temperatūrai (hipertermija) ir (arba) per minutę įkvepiamam tūriui. Jeigu yra bendrųjų duomenų, rodančių, kad tokių pastebimų pokyčių neįvyksta, pripratinimas prie uždaromųjų vamzdelių nebūtinas. Gyvūnai, kurių visas kūnas veikiamas aerozoliu, poveikio laikotarpiu turėtų būti laikomi atskirai, kad bandomasis aerozolis nebūtų filtruojamas per kitų narvelyje esančių gyvūnų kailį. Išskyrus poveikio laikotarpį, gyvūnams šerti tinka įprastas ir sertifikuotas laboratorijose naudojamas pašaras, duodant neribotą geriamo vandens kiekį. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, taikant 12 h šviesos ir 12 h tamsos seką.

Inhaliacinės kameros

12. Parenkant inhaliacinę kamerą, turėtų būti atsižvelgiama į bandomosios cheminės medžiagos pobūdį ir bandymo tikslą. Pirmenybė teikiama dozės davimui tik per nosį (ši sąvoka apima sąvokas „tik per galvą“, „tik per nosį“ ir „tik per šnipą“). Pirmenybė dozės davimui tik per nosį paprastai teikiama tiriant skystųjų arba kietųjų dalelių aerozolius ir garus, kurie gali kondensuotis ir tapti aerozoliais. Specialieji tyrimo tikslai gali būti sėkmingiau pasiekti taikant poveikio per visą kūną metodą, tačiau tai turi būti pagrįsta tyrimo ataskaitoje. Siekiant užtikrinti atmosferos pastovumą naudojant poveikio per visą kūną kamerą, visa bandomųjų gyvūnų užimama erdvė turėtų neviršyti 5 % kameros tūrio. Poveikio tik per nosį ir poveikio per visą kūną metodų principai ir konkretūs šių metodų privalumai bei trūkumai aprašyti RD Nr. 39 (2).

POVEIKIO SĄLYGOS

Koncentracijų taikymas

13. Poveikio tik per nosį trukmė atliekant bandymus su žiurkėmis gali būti bet kokia, tačiau ne ilgesnė kaip 6 valandos. Jeigu poveikis tik per nosį taikomas pelėms, poveikio trukmė paprastai neturėtų viršyti keturių valandų. Jeigu reikalingi ilgesnės trukmės tyrimai, būtinas pagrindimas [žr. RD Nr. 39 (2)]. Gyvūnai, kurie veikiami aerozoliais poveikio per visą kūną kamerose, turėtų būti laikomi atskirai, kad kiti viename narvelyje laikomi gyvūnai laižydami nenurytų bandomosios cheminės medžiagos. Poveikio metu gyvūnas neturėtų būti šeriamas. Vandens gali būti duodama per visą laikotarpį, kuriuo gyvūnas veikiamas per visą kūną.

14. Gyvūnai veikiami bandomąja medžiaga dujų, garų, aerozolių arba jų mišinių pavidalu. Per tyrimą naudotina fizinė būsena priklauso nuo fizinių ir cheminių bandomosios cheminės medžiagos savybių, pasirinktos koncentracijos ir (arba) fizinio pavidalo, kuris veikiausiai bus tvarkant ir naudojant bandomąją cheminę medžiagą. Higroskopinės ir chemiškai reaguojančios bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti bandomos sauso oro sąlygomis. Turėtų būti imamasi atsargumo priemonių, kad būtų išvengta sprogių koncentracijų susidarymo.

▼M4

Dalelių dydžio pasiskirstymas

15. Dalelių rūšiavimas pagal dydį turėtų būti taikomas visiems aerozoliams ir garams, kurie gali kondensuotis ir tapti aerozoliais. Kad poveikis būtų padarytas visoms svarbioms kvėpavimo takų sritims, rekomenduojama naudoti aerozolius, kurių masės medianinis aerodinaminis skersmuo (MMAS) yra 1–4 μm, o geometrinis standartinis nuokrypis (σ_g) – 1,5–3,0 (2) (9) (10). Nors turėtų būti imamasi pagrįstų priemonių, kad šio standarto būtų laikomasi, jeigu jo įgyvendinti neįmanoma, turėtų būti pateikta ekspertų nuomonė. Pvz., metalų garai gali būti mažesni už šį standartą, o įelektrintos dalelės, pluoštai ir higroskopinės medžiagos (kurios padidėja drėgnoje kvėpavimo takų aplinkoje) gali viršyti šį standartą.

Bandomosios cheminės medžiagos paruošimas nešiklyje

16. Siekiant užtikrinti reikiamą bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją ir dalelių dydį atmosferoje, gali būti naudojamas nešiklis. Paprastai pirmenybė teikiama vandeniui. Siekiant užtikrinti reikiamą dalelių dydžio pasiskirstymą, iš dalelių sudaryta medžiaga gali būti apdorojama mechaniškai, tačiau turėtų būti imamasi atsargumo priemonių, kad bandomoji medžiaga nebūtų suskaidyta arba nebūtų pakeistos jos savybės. Kai manoma, kad mechaniškai apdorojus bandomąją cheminę medžiagą pasikeitė jos cheminė sudėtis (pvz., dėl labai aukštų temperatūrų, susidariusių dėl trinties pernelyg stipriai malant), bandomosios cheminės medžiagos sudėtis turėtų būti patikrinta analizės būdu. Turėtų būti imamasi tinkamų atsargumo priemonių, kad bandomoji cheminė medžiaga nebūtų užteršta. Nebūtina tikrinti netrapių granulių pavidalo medžiagų, kurios specialiai paruoštos taip, kad jų nebūtų galima įkvėpti. Turėtų būti atliekamas trynimo bandymas, skirtas įrodyti, kad tvarkant granulių pavidalo medžiagą nesusidaro įkvepiamų dalelių. Jeigu atliekant trynimo bandymą susidaro įkvepiamų cheminių medžiagų, turėtų būti atliekamas toksiškumo įkvėpus bandymas.

Kontroliniai gyvūnai

17. Vienalaikės neigiamos kontrolės (naudojant orą) grupė nebūtina. Jeigu bandymo atmosferos sukūrimo tikslais naudojamas nešiklis nėra vanduo, nešiklio kontrolinė grupė turėtų būti naudojama tik tuo atveju, jeigu nėra istorinių toksiškumo įkvėpus duomenų. Jeigu atlikus nešiklyje paruoštos bandomosios cheminės medžiagos toksiškumo tyrimą nustatoma, kad medžiaga nėra toksiška, vadinasi, ir nešiklis, esant ištirtai koncentracijai, nėra toksiškas; taigi nešiklio kontrolė nebūtina.

POVEIKIO SĄLYGŲ STEBĖJIMAS

Oro srautas kameroje

18. Kiekvieno poveikio metu turėtų būti atidžiai reguliuojamas, nuolat stebimas ir ne rečiau kaip kartą per valandą registruojamas per kamerą tekantis oro srautas. Bandymo atmosferoje susidariusios koncentracijos (arba jos pastovumo) stebėjimas yra vienas iš visų dinaminių parametrų matavimų, suteikiantis galimybę netiesiogiai kontroliuoti visus svarbius dinaminius atmosferos kūrimo parametrus. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas tam, kad būtų išvengta pakartotinio įkvėpimo dozės davimo tik per nosį kamerose, kai per poveikio sistemą tekantis oro srautas yra nepakankamas užtikrinti dinaminį bandomosios cheminės medžiagos atmosferos srautą. Yra nustatyti metodai, kurie gali būti taikomi norint įrodyti, kad pasirinktomis poveikio sąlygomis neįvyksta pakartotinio įkvėpimo (2) (11). Deguonies koncentracija turėtų būti ne mažesnė kaip 19 %, anglies dioksido – ne didesnė kaip 1 %. Jeigu yra pagrindo manyti, kad šių standartų įgyvendinti neįmanoma, turėtų būti matuojamos deguonies ir anglies dioksido koncentracijos.

▼M4

Kameros temperatūra ir santykinis drėgnis

19. Kameroje turėtų būti palaikoma 22 ± 3 °C temperatūra. Tiek dozę duodant tik per nosį, tiek veikiant visą kūną, santykinis drėgnis turėtų būti stebimas ir registruojamas ne mažiau kaip tris kartus, kai poveikio trukmė keturios valandos, ir kas valandą, kai poveikio trukmė mažesnė. Tinkamiausias santykinis drėgnis – 30–70 %, tačiau jis gali būti nepasiekiamas (pvz., bandant vandens pagrindo mišinius) arba neišmatuojamas dėl trukdžių, atsirandančių bandomajai cheminei medžiagai taikant bandymo metodą.

Bandomoji cheminė medžiaga. Vardinė koncentracija

20. Jeigu įmanoma, turėtų būti apskaičiuota ir užregistruota vardinė koncentracija poveikio kameroje. Vardinė koncentracija yra sukurtos bandomosios cheminės medžiagos masės ir viso oro srauto, perleisto per kamerų sistemą, tūrio santykis. Vardinė koncentracija nėra naudojama apibūdinti poveikį gyvūnui, tačiau, vardinę koncentraciją palyginus su faktine, nustatomas generavimo, kurį užtikrina bandymų sistema, efektyvumas, kuriuo remiantis galima nustatyti generavimo problemas.

Bandomoji cheminė medžiaga. Faktinė koncentracija

21. Faktinė koncentracija yra bandomosios cheminės medžiagos koncentracija inhaliacinės kameros gyvūno kvėpavimo zonoje. Faktines koncentracijas galima nustatyti specialiaisiais metodais (pvz., taikant tiesioginio ėminių ėmimo, adsorbcijos ar cheminių reakcijų metodus ir tada atliekant analizinį apibūdinimą) arba nespecialiaisiais metodais, pvz., atliekant gravimetrinę analizę naudojant filtrus. Gravimetrinė analizė gali būti taikoma tik vienos sudedamosios dalies miltelių aerozoliams arba mažo lakumo skystųjų dalelių aerozoliams ir turėtų būti grindžiama tinkamais prieš tyrimą atliktais bandomosios cheminės medžiagos savybių apibūdinimais. Iš daugiau kaip vienos sudedamosios dalies sudarytų miltelių aerozolių koncentracijos taip pat gali būti nustatomos atliekant gravimetrinę analizę. Tačiau tam reikalingi analitiniai duomenys, įrodantys, kad ore esančios medžiagos sudėtis panaši į pirminės medžiagos sudėtį. Jeigu tokios informacijos nėra, tyrimo metu gali reikėti vienodais intervalais atlikti pakartotinę bandomosios cheminės medžiagos (geriausia, kad ji būtų ore) analizę. Jeigu aerozolinės medžiagos gali garuoti arba sublimuoti, turėtų būti įrodyta, kad pasirinktu metodu surinktos visos fazės. Tyrimo ataskaitoje turėtų būti nurodytos siekiamos, vardinės ir faktinės koncentracijos, tačiau atliekant statistinę analizę, skirtą apskaičiuoti mirtinas koncentracijos vertes, naudojamos tik faktinės koncentracijos.

22. Jeigu įmanoma, turėtų būti naudojama viena bandomosios cheminės medžiagos partija, o bandomasis ėminys turėtų būti laikomas tokiomis sąlygomis, kad būtų išsaugotas jo grynumas, homogeniškumas ir stabilumas. Prieš pradedant tyrimą reikėtų apibūdinti bandomosios cheminės medžiagos savybes, įskaitant jos grynumą ir, jeigu tai techniškai įmanoma, tapatumą, taip pat nustatytų teršalų ir priemaišų kiekius. Be kitų duomenų, tai galima pagrįsti šiais duomenimis: sulaikymo trukme ir susijusia didžiausios koncentracijos sritimi, molekuline mase, nustatyta atlikus spektroskopinę arba dujų chromatografijos analizę, arba kitais įverčiais. Nors bandomojo ėminio tapatumo nustatymas nėra bandymų laboratorijos pareiga, bandymų laboratorijai gali būti naudinga patvirtinti bent kai kurias pateikėjo nurodytas savybes (pvz., spalvą, fizinę būseną ir t. t.).

23. Poveikio atmosfera turėtų būti kaip įmanoma pastovesnė ir turėtų būti stebima nuolat ir (arba) su pertraukomis, atsižvelgiant į analizės metodą. Jeigu ėminiai imami su pertraukomis, per keturių valandų tyrimą kameros atmosferos ėminiai turėtų būti imami ne mažiau kaip du kartus. Jeigu tai neįmanoma dėl nedidelių oro srauto greičių arba mažų koncentracijų, gali būti imamas vienas ėminys per visą poveikio laikotarpį. Jeigu ėminiai pastebimai skiriasi, tiriant kitas koncentracijas per poveikio laikotarpį turėtų būti

▼M4

imami keturi ėminiai. Atskiri kameroje susidariusios koncentracijos ėminiai neturėtų nukrypti nuo vidutinės koncentracijos daugiau kaip ± 10 %, kai tiriamos dujos ir garai, arba daugiau kaip ± 20 %, kai tiriami skystųjų arba kietųjų dalelių aerozoliai. Turėtų būti apskaičiuotas ir užregistruotas pusiausvyros nusistovėjimo kameroje laikotarpis (t_{95}). Į poveikio trukmę įtraukiamas laikas, per kurį susidaro bandomoji cheminė medžiaga, ir atsižvelgiama į laiką, kurio reikia, kad būtų pasiekta t_{95}. T_{95} apskaičiavimo gairės pateiktos RD Nr. 39 (2).

24. Jeigu tiriami labai sudėtingi mišiniai, sudaryti iš dujų ir (arba) garų, ir aerozoliai (pvz., deginimo atmosferos ir bandomosios cheminės medžiagos, pučiamos iš specialiai varomų galutinio naudojimo produktų arba prietaisų), kiekvienos fazės veikimas inhaliacinėje kameroje gali būti skirtingas, todėl iš kiekvienos fazės (dujų ir (arba) garų ir aerozolio) turėtų būti parinkta bent viena indikacinė cheminė medžiaga (analitė); paprastai šiuo tikslu pasirenkama pagrindinė veiklioji mišinio cheminė medžiaga. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga yra mišinys, turėtų būti nurodyta mišinio, o ne tik veikliosios cheminės medžiagos arba sudedamosios dalies (analitės) analizinė koncentracija. Daugiau informacijos apie faktines koncentracijas pateikta RD Nr. 39 (2).

Bandomoji cheminė medžiaga. Dalelių dydžio pasiskirstymas

25. Aerozolių dalelių dydžio pasiskirstymas turėtų būti nustatomas bent kartą per kiekvieną keturių valandų trukmės poveikio laikotarpį naudojant pakopinį ėmiklį arba alternatyvų prietaisą, pvz., aerodinaminį dalelių rūšiuotuvą. Jeigu galima įrodyti, kad pakopiniu ėmikliu arba alternatyviu prietaisu gaunami lygiaverčiai rezultatai, atliekant tyrimą gali būti naudojamas alternatyvus prietaisas. Siekiant įsitikinti pagrindinio prietaiso surenkamuoju veiksmingumu, kartu su pagrindiniu prietaisu turėtų būti naudojamas antrasis prietaisas, pvz., gravimetrinis filtras, gaudyklė arba barboteris. Atlikus dalelių dydžio analizę nustatyta masės koncentracija turėtų neviršyti priimtinų filtruojamosios analizės būdu nustatytos masės koncentracijos ribų [žr. RD Nr. 39 (2)]. Jeigu lygiavertiškumą galima įrodyti pradiniame tyrimo etape, tolesnius patvirtinamuosius matavimus galima praleisti. Gyvūnų gerovės sumetimais turėtų būti imamasi priemonių, kad būtų kuo mažiau negalutinių duomenų, dėl kurių galėtų reikėti pakartoti poveikį. Garuose esančios dalelės turėtų būti rūšiuojamos tuo atveju, jeigu bent kiek tikėtina, kad susidarant aerozoliui gali kondensuotis garai, arba jeigu garų atmosferoje aptinkama dalelių, dėl kurių gali susidaryti mišrių fazių (žr. 15 skirsnį).

PROCEDŪRA

26. Toliau aprašyti du tyrimų tipai: įprastas protokolas ir „K × l“ protokolas. Pagal abu protokolus gali būti atliekamas orientacinis tyrimas, pagrindinis tyrimas ir (arba) ribinis bandymas (tradicinis protokolas) arba bandymai taikant ribinę koncentraciją („K × l“ protokolas). Jeigu žinoma, kad kurios nors lyties gyvūnai yra jautresni, tyrimo vadovas gali nuspręsti atlikti šiuos tyrimus tik su jautresniąja lytimi. Jeigu naudojant kitos rūšies graužikus nei žiurkės dozė duodama tik per nosį, ilgiausia poveikio trukmė gali būti pakoreguojama siekiant sumažinti tos rūšies gyvūnų patiriamą kančią. Prieš pradedant turėtų būti atsižvelgta į visus turimus duomenis, kad būtų kuo labiau sumažintas gyvūnų naudojimo poreikis. Pvz., naudojant pagal šio priedo B.52 skyrių (4) gautus duomenis galima sumažinti orientacinio tyrimo poreikį ir įrodyti, ar kurios nors lyties gyvūnai yra jautresni [žr. RD Nr. 39 (2)].

▼M4

ĮPRASTAS PROTOKOLAS

Bendrieji aspektai. Įprastas protokolas

27. Atliekant įprastą tyrimą, gyvūnų grupės nustatytą laikotarpį (paprastai – keturias valandas) veikiamos bandomąja chemine medžiaga dozės davimo tik per nosį arba dozės davimo per visą kūną kameroje. Gyvūnai veikiami ribine koncentracija (ribinis bandymas) arba nuosekliai veikiami ne mažiau kaip trimis skirtingomis koncentracijomis (pagrindinis tyrimas). Išskyrus atvejus, kai apie bandomąją cheminę medžiagą jau turima informacijos, pvz., gautos remiantis anksčiau atliktu B.52 tyrimu, prieš pagrindinį tyrimą gali būti atliekamas orientacinis tyrimas [žr. RD Nr. 39 (2)].

Orientacinis tyrimas. Įprastas protokolas

28. Orientacinis tyrimas skirtas įvertinti bandomosios cheminės medžiagos stiprumą, nustatyti lyčių jautrumo skirtumus ir padėti pasirinkti poveikio koncentracijos lygius, taikytinus per pagrindinį tyrimą arba ribinį bandymą. Parenkant per orientacinį tyrimą taikytinus koncentracijos lygius, turėtų būti naudojama visa turima informacija, įskaitant turimus (Q)SAR duomenis ir duomenis apie panašias chemines medžiagas. Taikant kiekvieną skirtingą koncentraciją, dozė turėtų būti duodama ne daugiau kaip trims patinams ir trims patelėms (trijų kiekvienos lyties gyvūnų gali reikėti lyčių skirtumams nustatyti). Per orientacinį tyrimą gali būti taikoma tik viena koncentracija, tačiau prireikus bandymas gali būti atliktas ir taikant kitokias koncentracijas. Per orientacinį tyrimą neturėtų būti naudojama tiek gyvūnų ir taikoma tiek skirtingų koncentracijų, kiek per pagrindinį tyrimą. Vietoje orientacinio tyrimo gali būti remiamasi anksčiau atliktu B.52 tyrimu [žr. RD Nr. 39 (2)].

Ribinis bandymas. Įprastas protokolas

29. Ribinis bandymas atliekamas tada, kai bandomoji cheminė medžiaga yra nežinoma arba kai manoma, kad ji iš esmės netoksiška, t. y. sukelianti toksinį poveikį tik taikant didesnę nei norminę ribinę koncentraciją. Atliekant ribinį bandymą, ribine bandomosios cheminės medžiagos koncentracija veikiama tik viena trijų patinų ir trijų patelių grupė. Informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą galima gauti remiantis žiniomis apie panašias bandytas chemines medžiagas, atsižvelgiant į toksikologinės reikšmės turinčių sudedamųjų dalių tapatumą ir procentinę dalį. Tais atvejais, kai informacijos apie medžiagos toksiškumą yra mažai arba jos išvis nėra arba kai remiantis ta informacija yra tikėtina, kad bandomoji cheminė medžiaga yra toksiška, turėtų būti atliekamas pagrindinis bandymas.

30. Ribinės koncentracijos paprastai parenkamos atsižvelgiant į norminius reikalavimus. Jeigu taikomas Reglamentas (EB) Nr. 1272/2008, dujoms, garams ir aerozoliams taikytinos ribinės koncentracijos atitinkamai yra 20 000 ppm, 20 mg/l ir 5 mg/l (arba didžiausioji pasiekiama koncentracija) (3). Pasiekti kai kurių bandomųjų cheminių medžiagų, ypač garų ir aerozolių, ribines koncentracijas, gali būti techniškai sudėtinga. Atliekant aerozolių bandymus, pirmiausia turėtų būti siekiama užtikrinti įkvepiamą dalelių dydį (MMAS – 1–4 μm). Daugelio bandomųjų cheminių medžiagų atveju tai įmanoma pasiekti, kai koncentracija yra 2 mg/l. Atlikti aerozolių bandymus taikant didesnę kaip 2 mg/l koncentraciją turėtų būti mėginama tik tuo atveju, jeigu įmanoma pasiekti įkvepiamą dalelių dydį [žr. RD Nr. 39 (2)]. Reglamente (EB) Nr. 1272/2008 gyvūnų gerovės sumetimais rekomenduojama neatlikti bandymų viršijant ribinę koncentraciją (3). Galimybė taikyti ribinę koncentraciją turėtų būti svarstoma tik tuo atveju, jeigu labai tikėtina, kad tokio bandymo rezultatai turės tiesioginės reikšmės žmonių sveikatos apsaugai (3); tokiu atveju tyrimo ataskaitoje pateikiamas pagrindimas. Tiriant potencialiai sprogias bandomąsias chemines medžiagas turėtų būti imamasi atsargumo priemonių, kad nesusidarytų sprogimui palankių sąlygų. Siekiant išvengti nebūtino gyvūnų naudojimo, prieš ribinį bandymą turėtų būti atliktas atskiras bandymas be gyvūnų, siekiant įsitikinti, ar įmanoma pasiekti ribiniam bandymui reikalingas kameros sąlygas.

▼M4

31. Jeigu taikant ribinę koncentraciją pastebimas gyvūnų gaišimas arba liguistumas, ribinio bandymo rezultatai gali būti naudojami kaip orientacinis tyrimas, kuriuo būtų remiamasi per tolesnius bandymus taikant kitokias koncentracijas (žr. apie pagrindinį tyrimą). Jeigu dėl bandomosios cheminės medžiagos fizinių arba cheminių savybių neįmanoma pasiekti ribinės koncentracijos, turėtų būti bandoma didžiausioji pasiekiama koncentracija. Jeigu esant didžiausiajai pasiekiamai koncentracijai pasireiškia mažesnis kaip 50 % gaištamumas, daugiau bandymų atlikti nereikia. Jeigu ribinės koncentracijos neįmanoma pasiekti, tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateiktas paaiškinimas ir patvirtinamieji duomenys. Jeigu didžiausioji pasiekiama koncentracija nesukelia toksiškumo, gali reikėti sukurti skystojo aerozolio pavidalo bandomąją cheminę medžiagą.

Pagrindinis tyrimas. Įprastas protokolas

32. Pagrindinis tyrimas paprastai atliekamas naudojant po penkis patinus ir penkias pateles (arba penkis jautresniosios lyties, jeigu ji žinoma, gyvūnus) kiekvienam koncentracijos lygiui ir taikant bent tris koncentracijos lygius. Norint gauti patikimą statistinę analizę, turėtų būti taikomi pakankami koncentracijos lygiai. Laiko tarpas tarp dozių davimo grupėms nustatomas atsižvelgiant į toksiškumo požymių atsiradimo laiką, trukmę ir sunkumą. Kito koncentracijos lygio dozės davimas gyvūnams nukeliamas iki to laiko, kai bus pagrįstai įsitikinta, kad pirmiau bandytieji gyvūnai išgyveno. Tai tyrimo vadovui suteikia galimybę pakoreguoti tikslinę koncentraciją, taikytiną kitai grupei, kuriai duodama dozė. Atsižvelgiant į technologijų sudėtingumą, atliekant inhaliacinius tyrimus tai gali būti ne visada įgyvendinama, todėl poveikis gyvūnams taikant kitą koncentracijos lygį turėtų būti grindžiamas jau įgyta patirtimi ir mokslinu vertinimu. Bandant mišinius, turėtų būti remiamasi RD Nr. 39 (2).

PROTOKOLAS „KONCENTRACIJA × LAIKAS“ („K × L“)

Bendrieji aspektai. „K × l“ protokolas

33. Vertinant toksiškumą įkvėpus, kaip alternatyva įprastam protokolui gali būti svarstoma galimybė atlikti nuoseklų „K × l“ protokolu pagrįstą tyrimą (12) (13) (14). Šiuo metodu suteikiama galimybė daryti poveikį gyvūnams taikant keletą koncentracijos lygių ir keletą laikotarpių. Visi bandymai atliekami tik dozės davimo tik per nosį kameroje (pagal šį protokolą netikslinga naudoti poveikio per visą kūną kameras). Šis protokolas pavaizduotas 1 priedėlyje pateiktoje struktūrinėje schemoje. Modeliuojamoji analizė parodė, kad gauti patikimas LC_{50} vertes galima ir pagal įprastą protokolą, ir pagal „K × l“ protokolą, tačiau „K × l“ protokolas paprastai tinkamesnis norint gauti patikimas LC_{01} ir LC_{10} vertes (15).

34. Modeliuojamoji analizė parodė, kad dviejų gyvūnų naudojimas (kai naudojama po vieną skirtingų lyčių gyvūną arba kai naudojami du jautresniosios lyties gyvūnai) kiekvienam koncentracijos ir laiko tarpusavio priklausomybės kreivės intervalui paprastai yra tinkamas, kai per pagrindinį tyrimą bandomos keturios koncentracijas ir taikomi penki poveikio laikotarpiai. Tam tikromis aplinkybėmis tyrimo vadovas gali pasirinkti kiekviename koncentracijos ir laiko tarpusavio priklausomybės kreivės intervale naudoti po dvi kiekvienos lyties žiurkes (15). Kiekvienam koncentracijos ir laiko momento deriniui naudojant po du kiekvienos lyties gyvūnus gali būti sumažintas įverčių poslinkis ir nuokrypis, padidintas vertinimo sėkmės koeficientas ir pagerinta pasikliautinojo intervalo aprėptis. Tačiau, jeigu nepasiekiama pakankamai tikslios atitikties skaičiuojant naudotiniems duomenims (kai naudojama po vieną skirtingų lyčių gyvūną arba kai naudojami du jautresniosios lyties gyvūnai), gali pakakti ir penktosios poveikio koncentracijos. Daugiau patarimų dėl gyvūnų skaičiaus ir koncentracijų, taikytinų atliekant „K × l“ protokolu pagrįstą tyrimą, pateikta RD Nr. 39 (2).

▼M4

Orientacinis tyrimas. „K × l“ protokolas

35. Orientacinis tyrimas yra skirtas įvertinti bandomosios cheminės medžiagos stiprumą ir padėti pasirinkti poveikio koncentracijos lygius, taikytinus per pagrindinį tyrimą. Siekiant parinkti tinkamą pradinę koncentraciją, taikytiną per pagrindinį tyrimą, ir sumažinti naudojamų gyvūnų skaičių, gali reikėti atlikti orientacinį tyrimą kiekvienai koncentracijai naudojant ne daugiau kaip po tris kiekvienos lyties gyvūnus [išsamesnės informacijos pateikta RD Nr. 39 (2) III priedėlyje]. Norint nustatyti lyčių skirtumus, gali reikėti naudoti po tris kiekvienos lyties gyvūnus. Šiems gyvūnams turėtų būti daromas vienkartinis poveikis, paprastai trunkantis 240 minučių. Galimybė sukurti tinkamas bandymo atmosferas turėtų būti įvertinta per išankstinius techninius bandymus, nenaudojant gyvūnų. Jeigu yra per B.52 (4) tyrimą gautų gaištamumo duomenų, orientacinis tyrimas paprastai nebūtinas. Parinkdamas pradinę B.2 tyrimo tikslinę koncentraciją, tyrimo vadovas turėtų atsižvelgti į gaištamumo pobūdį, nustatytą per B.52 tyrimus (4) pagal kiekvieną lytį ir visas bandytas koncentracijas [žr. RD Nr. 39 (2)].

Pradinė koncentracija. „K × l“ protokolas

36. Pradinė koncentracija (I poveikio seansas) (I priedėlis) bus ribinė koncentracija arba koncentracija, tyrimo vadovo parinkta remiantis orientaciniu tyrimu. Šia koncentracija įvairiais laikotarpiais (pvz., 15, 30, 60, 120 arba 240 minučių) veikiamos gyvūnų grupės, sudarytos iš dviejų skirtingos lyties gyvūnų, t. y. bendras gyvūnų skaičius yra 10 (vadinamasis I poveikio seansas) (I priedėlis).

37. Ribinės koncentracijos paprastai parenkamos atsižvelgiant į norminius reikalavimus. Jeigu taikomas Reglamentas (EB) Nr. 1272/2008, dujoms, garams ir aerozoliams taikytinos ribinės koncentracijos atitinkamai yra 20 000 ppm, 20 mg/l ir 5 mg/l (arba didžiausioji pasiekiama koncentracija) (3). Pasiekti kai kurių bandomųjų cheminių medžiagų, ypač garų ir aerozolių, ribines koncentracijas, gali būti techniškai sudėtinga. Atliekant aerozolių bandymus, turėtų būti siekiama užtikrinti įkvėpiamą dalelių dydį (MMAS – 1–4 μm), esant ribinei 2 mg/l koncentracijai. Daugelio bandomųjų cheminių medžiagų atveju tai įmanoma pasiekti. Atlikti aerozolių bandymus taikant didesnę kaip 2 mg/l koncentraciją turėtų būti mėginama tik tuo atveju, jeigu įmanoma pasiekti įkvepiamą dalelių dydį [žr. RD Nr. 39 (2)]. Reglamente (EB) Nr. 1272/2008 gyvūnų gerovės sumetimais rekomenduojama neatlikti bandymų viršijant ribinę koncentraciją (3). Galimybė atlikti bandymus viršijant ribinę koncentraciją turėtų būti svarstoma tik tuo atveju, jeigu labai tikėtina, kad tokio bandymo rezultatai turės tiesioginės reikšmės žmonių sveikatos apsaugai (3); tokiu atveju tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateiktas pagrindimas. Tiriant potencialiai sprogias bandomąsias chemines medžiagas turėtų būti imamasi atsargumo priemonių, kad nesusidarytų sprogimui palankių sąlygų. Siekiant išvengti nebūtino gyvūnų naudojimo, prieš bandymą taikant pradinę koncentraciją turėtų būti atliktas atskiras bandymas be gyvūnų, siekiant įsitikinti, ar įmanoma pasiekti šiai koncentracijai reikalingas kameros sąlygas.

38. Jeigu taikant pradinę koncentraciją pastebimas gyvūnų gaišimas arba liguistumas, tos koncentracijos bandymo rezultatai gali būti panaudojami kaip pagrindas per tolesnius bandymus taikant kitokias koncentracijas (žr. apie pagrindinį tyrimą). Jeigu dėl bandomosios cheminės medžiagos fizinių arba cheminių savybių neįmanoma pasiekti ribinės koncentracijos, turėtų būti bandoma didžiausia pasiekiama koncentracija. Jeigu esant didžiausiai pasiekiamai koncentracijai pasireiškia mažesnis kaip 50 % gaištamumas, daugiau bandymų atlikti nereikia. Jeigu ribinės koncentracijos neįmanoma pasiekti, tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateiktas paaiškinimas ir patvirtinamieji duomenys. Jeigu didžiausia pasiekiama koncentracija nesukelia toksiškumo, gali reikėti sukurti skystojo aerozolio pavidalo bandomąją cheminę medžiagą.

▼M4

Pagrindinis tyrimas. „K × l“ protokolas

39. Per pagrindinį tyrimą bandoma pradinė koncentracija (I poveikio seansas) (I priedėlis) bus ribinė koncentracija arba koncentracija, tyrimo vadovo parinkta remiantis orientaciniu tyrimu. Jeigu per I poveikio seansą arba po jo pastebimas gaištamumas, II poveikio seanso koncentracija ir poveikio laikotarpiai bus nustatomi remiantis mažiausiuoju poveikiu („K × l“ protokolas), dėl kurio nugaištama. Kiekvienas tolesnis seansas priklausys nuo ankstesniojo seanso (žr. 1 priedėlį).

40. Norint nustatyti „K × l“ protokolu pagrįstą gaištamumo priklausomybę, daugeliui bandomųjų cheminių medžiagų pakanka rezultatų, gautų taikant pradinę koncentraciją ir per tris papildomus poveikio seansus naudojant smulkesnę laiko matricą (t. y. poveikio laikotarpių geometrinius intervalus, apibūdinamus vienas po kito einančių laikotarpių santykiu, kuris paprastai yra √2) (15), tačiau taip pat gali būti naudinga taikyti penktąją poveikio koncentraciją [žr. 1 priedėlį ir RD Nr. 39 (2)]. Matematinis pagal „K × l“ protokolą gautų rezultatų apdorojimas aprašytas 1 priedėlyje.

STEBĖJIMAI

41. Poveikio laikotarpiu turėtų būti dažnai atliekami klinikiniai gyvūnų stebėjimai. Baigus duoti dozę, dozės davimo dieną klinikiniai stebėjimai turėtų būti atliekami bent du kartus arba daugiau, atsižvelgiant į gyvūnų reakciją į gautą dozę, o vėliau – bent kartą per parą, iš viso stebint 14 dienų. Tikslios stebėjimų laikotarpio trukmės nenustatoma; ji turėtų būti parenkama atsižvelgiant į klinikinių požymių atsiradimo laiką ir gyvūnų atsigavimo laikotarpio trukmę. Svarbu atkreipti dėmesį į toksiškumo požymių atsiradimo ir išnykimo laiką, ypač jeigu toksiškumo požymiai pasireiškia tik po kurio laiko. Visi stebėjimai sistemingai registruojami, išsaugant atskirus įrašus apie kiekvieną gyvūną. Gaištantys gyvūnai ir gyvūnai, kurie patiria didelius skausmus ir (arba) kuriems pasireiškia ilgalaikių sunkios kančios požymių, gyvūnų gerovės sumetimais turėtų būti humaniškai numarinami. Atliekant klinikinių toksiškumo požymių tyrimus, turėtų būti imamasi atsargumo priemonių, kad prasta pradinė išvaizda ir trumpalaikiai kvėpavimo takų pakitimai, atsiradę dėl poveikio procedūros, nebūtų palaikyti bandomosios cheminės medžiagos sukelto toksiškumo požymiais, dėl kurių reikėtų pirmiau laiko numarinti gyvūnus. Turėtų būti atsižvelgta į principus ir kriterijus, apibendrintus Rekomendaciniame dokumente dėl pasekmių žmonėms (RD Nr. 19) (7). Kai gyvūnai numarinami dėl humaniškų priežasčių arba randami nugaišę, kiek įmanoma tiksliau užregistruojamas žūties laikas.

42. Narveliuose turėtų būti stebimi odos ir kailio, akių ir gleivinės pakitimai, taip pat kvėpavimo, kraujo, autonominės ir centrinės nervų sistemų, somatomotorinės veiklos ir elgsenos pakitimai. Jeigu įmanoma, turėtų būti išskirti vietinis ir sisteminis poveikiai. Ypač reikėtų stebėti, ar nepasireiškia drebulys, traukuliai, viduriavimas, mieguistumas, miego ir komos būsenos, ar neteka seilės. Matuojant temperatūrą tiesiojoje žarnoje, galima gauti patvirtinamųjų sulėtėjusio kvėpavimo arba nukritusios ar pakilusios temperatūros įrodymų, susijusių su dozės davimu arba izoliavimu.

Kūno masė

43. Kiekvieno gyvūno masė turėtų būti vieną kartą užregistruojama pratinimo laikotarpiu, tada poveikio dieną dar nedavus dozės (nulinė diena) ir bent pirmąją, trečiąją ir septintąją dienomis (o vėliau – kas savaitę), taip pat žūties arba numarinimo metu, jeigu tai įvyksta po pirmosios dienos. Kūno masė yra labai svarbus toksiškumo gyvūnams rodiklis, todėl gyvūnai, kurių masė, palyginti su vertėmis, gautomis prieš tyrimą, nukrenta 20 % arba daugiau, turėtų būti atidžiai stebimi. Pasibaigus poveikio pasekmių stebėjimo laikotarpiui, išgyvenę gyvūnai pasveriami ir humaniškai numarinami.

▼M4

Patologija

44. Visiems bandomiesiems gyvūnams, įskaitant nugaišusius atliekant bandymą arba numarintus ir pašalintus iš tyrimo gyvūnų gerovės sumetimais, daromas bendrasis skrodimas. Jeigu skrodimo negalima atlikti iš karto po to, kai aptinkamas nugaišęs gyvūnas, gyvūnas turėtų būti laikomas pakankamai šaltoje vietoje (bet neužšaldomas), siekiant kuo labiau pristabdyti autolizę. Skrodimai turėtų būti atliekamai kaip galima anksčiau, paprastai – per dieną arba dvi. Visi dideli patologiniai pakitimai turėtų būti užregistruojami pagal kiekvieną gyvūną, ypatingą dėmesį skiriant kvėpavimo takų pakitimams.

45. Norint padidinti tyrimo aiškinamąją reikšmę, gali būti atliekamos papildomos apžiūros, iš anksto numatytos pagal tyrimo planą, pvz., išgyvenusių žiurkių plaučių svėrimas ir (arba) dirginimo įrodymų gavimas atliekant kvėpavimo takų apžiūrą mikroskopu. Taip pat gali būti tiriami organai, turintys didelės 24 valandas arba ilgiau išgyvenusių gyvūnų patologijos požymių, arba organai, apie kuriuos žinoma arba dėl kurių manoma, kad jiems buvo pakenkta. Mikroskopu apžiūrėjus visus kvėpavimo takus, galima gauti naudingos informacijos apie bandomąsias chemines medžiagas, kurios reaguoja su vandeniu, pvz., rūgštis ir higroskopines bandomąsias chemines medžiagas.

DUOMENYS IR ATASKAITOS

Duomenys

46. Turėtų būti pateikti kiekvieno gyvūno masės duomenys ir skrodimo išvados. Klinikinių stebėjimų duomenys turėtų būti apibendrinti lentelėse, pagal kiekvieną bandomąją grupę nurodant naudotų gyvūnų skaičių, gyvūnų, kuriems pasireiškė toksiškumo požymių, skaičių, atliekant bandymą nugaišusių arba dėl humaniškų priežasčių numarintų gyvūnų skaičių, kiekvieno gyvūno žūties laiką, taip pat pateikiant toksinio poveikio aprašymą, pasireiškimo laiką ir grįžtamumą, skrodimo išvadas.

Bandymo ataskaita

47. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikta tokia informacija (jeigu taikytina):

Bandomieji gyvūnai ir jų laikymas

— Laikymo sąlygų aprašymas, nurodant gyvūnų skaičių narvelyje (arba skaičiaus pokytį), kraiko medžiagą, aplinkos temperatūrą ir santykinį drėgnį, šviesos ir tamsos kaitą paros metu ir šėrimo režimą,

— naudota rūšis (padermė) ir, jeigu tai ne žiurkės, kitos rūšies naudojimo pagrindimas,

— gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,

— atsitiktinės atrankos metodas,

— išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę (įskaitant pašaro tipą arba šaltinį, vandens šaltinį),

— prieš bandymą sudarytų sąlygų aprašymas, nurodant šėrimo režimą, izoliavimo ir apsaugos nuo ligų būdą.

▼M4

Bandomoji cheminė medžiaga

— Fizinė būsena, grynumas ir, jeigu taikytina, fizinės ir cheminės savybės (įskaitant izomeriją),

— identifikavimo duomenys ir Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos (angl. CAS) registracijos numeris, jeigu jis žinomas.

Nešiklis

— Nešiklio naudojimo pagrindimas ir nešiklio parinkimo pagrindimas (jeigu tai ne vanduo),

— istoriniai arba vienalaikiai duomenys, įrodantys, kad nešiklis nedaro neigiamo poveikio tyrimo rezultatams.

Inhaliacinė kamera

— Inhaliacinės kameros aprašas, nurodant matmenis ir tūrį,

— įrangos, naudotos darant poveikį gyvūnams ir kuriant atmosferą, šaltinis ir aprašas,

— temperatūros, drėgnio, dalelių dydžio ir faktinės koncentracijos matavimo įranga,

— oro šaltinis, tiekiamo ir (arba) ištraukiamo oro apdorojimas ir kondicionavimo sistema,

— įrangos kalibravimo siekiant užtikrinti homogenišką bandymo atmosferą metodai,

— slėgių skirtumas (teigiamas ar neigiamas),

— kameroje esančios dozės davimo angos (jeigu dozė duodama tik per nosį); gyvūnų vieta sistemoje (jeigu dozė duodama per visą kūną),

— bandymo atmosferos laikinas homogeniškumas ir (arba) pastovumas,

— temperatūros ir drėgnio jutiklių vieta ir kameroje sukurtos bandymo atmosferos ėminių ėmimas,

— oro srauto greičiai, per dozės davimo angą tekančio oro srauto greitis (jeigu dozė duodama tik per nosį) arba gyvūnų kiekis kameroje (jeigu dozė duodama per visą kūną),

— informacija apie deguonies ir anglies dioksido kiekio matavimo įrangą, jeigu tokia naudota,

— inhaliacinės kameros pusiausvyros pasiekimo laikas (t_{95}),

— tūrio pokyčių kiekis per valandą,

— matavimo prietaisai (jeigu naudojami).

Poveikio duomenys

— Tikslinės koncentracijos parinkimo pagrindiniam tyrimui pagrindimas,

— vardinės koncentracijos (inhaliacinėje kameroje sukurtos bandomosios cheminės medžiagos bendrosios masės ir viso per kamerą perleisto oro srauto tūrio santykis),

— faktinės bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, nustatytos gyvūnų kvėpavimo zonoje; jeigu bandomi mišiniai, įgaunantys įvairias fizines būsenas (dujos, garai, aerozoliai), kiekviena iš šių būsenų gali būti analizuojama atskirai,

▼M4

— visos koncentracijos ore turėtų būti nurodomos masės vienetais (pvz., mg/l, mg/m^3 ir t. t.); skliaustuose taip pat gali būti nurodoma tūrio vienetais (pvz., ppm, ppb ir t. t.),

— dalelių dydžio pasiskirstymas, masės medianinis aerodinaminis skersmuo (MMAS) ir geometrinis standartinis nuokrypis (σg), nurodant jų apskaičiavimo metodus. Turėtų būti nurodytos atliktos atskiros dalelių dydžio analizės.

Bandymo sąlygos

— Išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos paruošimą, nurodant procedūras, taikytas siekiant sumažinti kietųjų medžiagų dalelių dydį arba paruošti bandomosios cheminės medžiagos tirpalus. Jeigu mechaniniais procesais galėjo būti pakeista bandomosios cheminės medžiagos sudėtis, pateikite bandomosios cheminės medžiagos sudėties patikros analizių rezultatus,

— įrangos, naudotos kuriant bandymo atmosferą ir veikiant gyvūnus bandymo atmosfera, aprašas (pageidautina, pateikiant diagramą),

— išsami informacija apie taikytą cheminės analizės metodą ir metodo tinkamumo patvirtinimą (nurodant bandomosios cheminės medžiagos regeneravimo iš ėminių ėmimo terpės veiksmingumą),

— bandomųjų koncentracijų parinkimo pagrindimas.

Rezultatai

— Kameros temperatūrų, drėgnio ir oro srautų lentelės,

— kameros vardinės ir faktinės koncentracijos duomenų lentelės,

— dalelių dydžių lentelės, pateikiant analizinių ėminių ėmimo duomenis, dalelių dydžių pasiskirstymą ir MMAS bei σ_g skaičiavimus,

— kiekvieno gyvūno reakcijos duomenų ir jam taikyto koncentracijos lygio lentelės (t. y. gyvūnų, kuriems pasireiškė toksiškumo požymių, nurodant gaištamumą, poveikio pobūdį, sunkumą, pasireiškimo laiką ir trukmę),

— kiekvieno gyvūno masė, nustatyta atliekant tyrimą; žūties data ir laikas, jeigu gyvūnas nugaišo dar prieš numatytą numarinimą; toksiškumo požymių atsiradimo laikas ir ar šių požymių pasireiškimas kiekvieno gyvūno atveju buvo grįžtamasis,

— kiekvieno gyvūno skrodimo išvados ir histopatologinių tyrimų rezultatai, jeigu yra,

— gaištamumo įverčiai (pvz., LC_{50}, LD_{01}), taikant 95 % pasikliovimo ribas, ir kreivės nuolydis (jeigu nustatytas pagal vertinimo metodą),

— statistinis ryšys, pateikiant n rodiklio įvertį („K × l“ protokolas). Turėtų būti nurodytas naudotos statistinės programinės įrangos pavadinimas.

▼M4

Rezultatų aptarimas ir aiškinimas

— Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas metodų, taikytų siekiant laikytis šio bandymo metodo kriterijų, pvz., susijusių su ribine koncentracija arba dalelių dydžiu, aprašymui,

— atsižvelgiant į bendruosius rezultatus, turėtų būti aprašyta dalelių įkvėpimo galimybė, ypač jeigu nebuvo įmanoma taikyti dalelių dydžio kriterijaus,

— atsižvelgiant į OECD rekomendaciniame dokumente dėl pasekmių žmonėms (8) nustatytus kriterijus, turėtų būti pateiktas paaiškinimas, ar kilo poreikis humaniškai numarinti gyvūnus, patiriančius skausmą arba sunkią ilgalaikę kančią,

— jeigu šio priedo B.52 skyriuje (4) nustatyti bandymai buvo nutraukti atsižvelgiant šį (B.2) bandymo metodą, turėtų būti pateiktas pagrindimas,

— pateikiant bendrąjį tyrimo vertinimą, turėtų būti nurodytas metodų, taikytų nustatyti vardines ir faktines koncentracijas, nuoseklumas ir faktinės koncentracijos santykis su vardine koncentracija,

— turėtų būti aprašyta tikėtina žūties priežastis ir vyraujantis veikimo būdas (sisteminis ar vietinis).

LITERATŪRA

1. OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

2. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

3. 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353, 2008 12 31, p. 1.

4. Šio priedo B.52 skyrius. Ūmus toksiškumas įkvėpus. Ūmaus toksiškumo klasės (ŪTK) metodas.

5. Šio priedo B.40 skyrius. Odos ėsdinimas *in vitro*. Odos sluoksnio elektrinės varžos (OSEV) bandymas.

6. Šio priedo B.40bis skyrius. Odos ėsdinimas *in vitro*. Žmogaus odos modelio bandymas.

7. OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

8. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in SAFEty Evaluation. Environmental Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

9. SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321–327.

10. Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼M4

11. Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160–167.

12. Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278–290.

13. Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105–117.

14. Ten Berge WF and Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65–71.

15. OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C x t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

16. Finney DJ (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

APIBRĖŽTIS

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

▼M4

1 priedėlis

„K × l“ protokolas

1. Vertinant toksiškumą įkvėpus, kaip alternatyva įprastam protokolui gali būti svarstoma galimybė atlikti nuoseklų „Koncentracija × laiko“ („K × l“) protokolu pagrįstą tyrimą (12) (13) (14). Jam turėtų būti teikiama pirmenybė, kai yra konkrečių reglamentavimo arba mokslinių reikmių, dėl kurių būtina atlikti įvairios trukmės bandymus su gyvūnais, pvz., reagavimo į nepaprastąsias aplinkybes planavimo arba žemėnaudos planavimo tikslais. Pagal šį metodą pirmiausia atliekami bandymai taikant ribinę koncentraciją (I poveikio seansas), per kuriuos gyvūnai veikiami chemine medžiaga penkis skirtingus laikotarpius (pvz., 15, 30, 60, 120 ir 240 minučių), siekiant per vieną poveikio seansą padaryti įvairios trukmės poveikius (žr. 1 paveikslą). Jeigu taikomas Reglamentas (EB) Nr. 1272/2008, dujoms, garams ir aerozoliams taikytinos ribinės koncentracijos atitinkamai yra 20 000 ppm, 20 mg/l ir 5 mg/l. Šie lygiai gali būti viršijami tik tuo atveju, jeigu yra reglamentavimo arba mokslinių reikmių atlikti bandymus taikant kitokius lygius (žr. B.2 skyriaus pagrindinio teksto 37 skirsnį).

2. Tais atvejais, kai apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą turima mažai informacijos arba jeigu jos išvis nėra, turėtų būti atliekamas orientacinis tyrimas, per kurį gyvūnai (naudojant ne daugiau kaip tris kiekvienos lyties gyvūnus) paprastai 240 minučių veikiami tyrimo vadovo pasirinkta tiksline koncentracija.

3. Jeigu per I poveikio seansą bandoma ribinė koncentracija ir pastebimas mažesnis kaip 50 % gaištamumas, daugiau bandymų atlikti nereikia. Jeigu yra reglamentavimo arba mokslinių reikmių nustatyti koncentracijos, laiko ir reakcijos tarpusavio priklausomybę taikant aukštesnius lygius nei nurodytoji ribinė koncentracija, kitas poveikis turėtų būti daromas taikant aukštesnį lygį, pvz., du kartus viršijant ribinę koncentraciją (1 paveiksle tai nurodyta kaip 2L).

4. Jeigu taikant ribinę koncentraciją pastebimas toksiškumas, būtina atlikti papildomus bandymus (pagrindinį tyrimą). Šie papildomi poveikiai daromi taikant mažesnes koncentracijas (1 paveiksle tai nurodyta kaip II, III ir IV poveikio seansai) arba didesnes koncentracijas, tačiau taikant trumpesnes trukmes (1 paveiksle tai nurodyta kaip IV poveikio seansas), parenkant pritaikytas trukmes ir jas išdėstant mažesniais intervalais).

5. Bandymas (taikant pradinę koncentraciją ir papildomas koncentracijas) atliekamas kiekvienam koncentracijos lygio ir laiko momento deriniui naudojant po vieną skirtingos lyties gyvūną arba du jautresniosios lyties gyvūnus. Tam tikromis aplinkybėmis tyrimo vadovas gali pasirinkti kiekvienam koncentracijos lygio ir laiko momento deriniui naudoti po dvi kiekvienos lyties žiurkes (arba keturis jautresniosios lyties gyvūnus) (15). Kiekvienam koncentracijos ir laiko momento deriniui naudojant po du kiekvienos lyties gyvūnus gali būti sumažintas įverčių poslinkis ir nuokrypis, padidintas vertinimo sėkmės koeficientas ir pagerinta pasikliautinojo intervalo aprėptis, susijusi su čia aprašomu protokolu. Išsamesnės informacijos pateikta RD Nr. 39 (2).

6. Geriausia, kad visi poveikio seansai būtų atlikti tą pačią dieną. Tai suteiktų galimybę atidėti kitą dozės davimą, kol bus pagrįstai įsitikinta išgyvenimu, o tyrimo vadovui būtų sudaryta galimybė pakoreguoti kito poveikio seanso tikslinę koncentraciją ir taikytinas trukmes. Rekomenduojama kiekvieną poveikio seansą pradėti nuo grupės, kuriai bus daromas ilgiausias poveikis, pvz., nuo grupės, kuri bus veikiama 240 minučių, tada pereiti prie grupės, kuri bus veikiama 120 minučių ir t. t. Pvz., jeigu grupės, kuri bus veikiama 240 minučių, gyvūnai žūna po 90 minučių arba jiems pasireiškia sunkaus toksiškumo požymių (pvz., labai pakinta kvėpavimas, pvz., kvėpavimas pasunkėja), nėra prasmės duoti dozę grupei, kurią buvo numatytą veikti 120 minučių, nes tikėtina, kad gaištamumas būtų 100 %. Taigi tyrimo vadovas šiai koncentracijai turėtų parinkti trumpesnius poveikio laikotarpius (pvz., 90, 65, 45, 33 ir 25 minučių trukmės).

▼M4

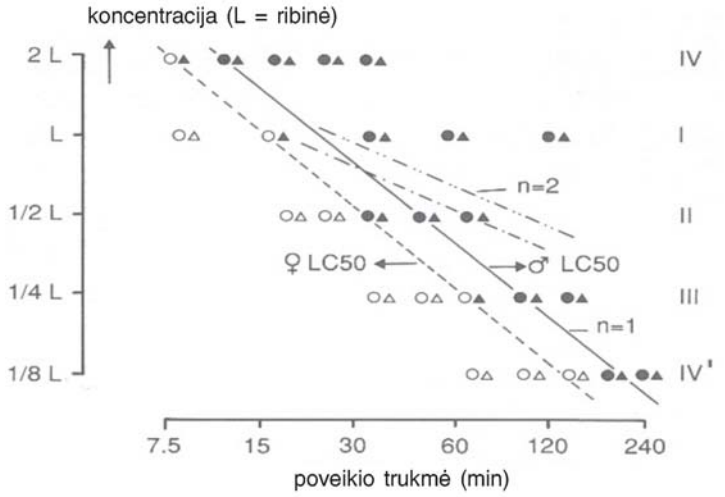
7. Turėtų būti dažnai matuojama kameroje susidariusi koncentracija, kad kiekvienai poveikio trukmei būtų galima nustatyti pagal laiką apskaičiuojamą vidutinę koncentraciją. Jeigu įmanoma, atliekant statistinę analizę turėtų būti naudojamas kiekvieno gyvūnų žūties laikas (o ne poveikio trukmė).

8. Pirmųjų keturių poveikio seansų rezultatai turėtų būti išanalizuoti siekiant nustatyti koncentracijos ir laiko tarpusavio priklausomybės kreivėje susidariusias duomenų spragas (žr. 1 paveikslą). Nepakankamos atitikties atveju gali būti daromas papildomas poveikis (taikant penktąją koncentraciją). Šio penktojo poveikio koncentracija ir poveikio trukmės turėtų būti tokios, kad būtų užpildyta minėtoji spraga.

9. Visi poveikio seansai (įskaitant pirmąjį) bus naudojami apskaičiuoti koncentracijos, laiko ir reakcijos tarpusavio priklausomybę taikant statistinę analizę (16). Jeigu įmanoma, kiekvienam koncentracijos ir laiko priklausomybės kreivės intervalui turėtų būti taikoma pagal laiką apskaičiuota vidutinė koncentracija ir poveikio trukmė iki žūties (jei darant poveikį gyvūnas nugaišta).

1 paveikslas

Hipotetinis koncentracijos, laiko ir gaištamumo tarpusavio priklausomybės pavyzdys



Nenuspalvinti simboliai – išgyvenę gyvūnai; nuspalvinti simboliai – nugaišę gyvūnai.

Trikampiai – patelės; apskritimai – patinai.

Ištisinė linija – LC_{50} vertės (intervalas – 7,5–240 min.), apskaičiuotos patinams, kai n = 1.

Brūkšninė linija – LC_{50} vertės (intervalas – 7,5–240 min.), apskaičiuotos patelėms, kai n = 1.

Taškinės linijos – hipotetinių LC_{50} verčių tiesės, nubrėžtos patinams ir patelėms, kai n = 2 (12).

Žodynėlis

koncentracija

poveikio trukmė

▼M4

10. Toliau pateiktas nuoseklios procedūros pavyzdys.

I poveikio seansas. Bandymai taikant ribinę koncentraciją (žr. 1 paveikslą)

— Kiekvienam koncentracijos ir laiko trukmės deriniui naudojama po vieną skirtingos lyties gyvūną; iš viso – 10 gyvūnų ([a])

— Tikslinė koncentracija ([b]) – ribinė koncentracija.

— Penkios gyvūnų grupės veikiamos šia tiksline koncentracija atitinkamai 15, 30, 60, 120 ir 240 minučių.

↓

II poveikio seansas ([c]). Pagrindinis tyrimas

— Kiekvienam koncentracijos ir laiko trukmės deriniui naudojama po vieną skirtingos lyties gyvūną; iš viso – 10 gyvūnų.

— Penkios gyvūnų grupės veikiamos mažesne koncentracija ([d]) (1/2L), taikant šiek tiek ilgesnes poveikio trukmes (intervalai apskaičiuojami taikant koeficientą √2; žr. 1 paveikslą).

↓

III poveikio seansas. Pagrindinis tyrimas

— Kiekvienam koncentracijos ir laiko trukmės deriniui naudojama po vieną skirtingos lyties gyvūną; iš viso – 10 gyvūnų.

— Penkios gyvūnų grupės veikiamos mažesne koncentracija ([d]) (1/4L), taikant šiek tiek ilgesnes poveikio trukmes (intervalai apskaičiuojami taikant koeficientą √2; žr. 1 paveikslą).

↓

IV' poveikio seansas. Pagrindinis tyrimas

— Kiekvienam koncentracijos ir laiko trukmės deriniui naudojama po vieną skirtingos lyties gyvūną; iš viso – 10 gyvūnų.

— Penkios gyvūnų grupės veikiamos mažesne koncentracija ([d]) (1/8L), taikant šiek tiek ilgesnes poveikio trukmes (intervalai apskaičiuojami taikant koeficientu √2; žr. 1 paveikslą).

↓ arba

([a]) Jeigu nėra informacijos apie lyčių jautrumą, naudojamos abiejų lyčių žiurkės, t. y. kiekvienai koncentracijai naudojama po vieną skirtingos lyties gyvūną. Remiantis turima informacija arba per šį poveikio seansą pastebėjus, kad kurios nors lyties gyvūnai yra jautresni, per tolesnius bandymus kiekvienam koncentracijos lygiui naudojama 10 jautresniosios lyties gyvūnų (kiekvienam koncentracijos ir laiko trukmės deriniui naudojama po du gyvūnus).

([b]) Jeigu taikomas Reglamentas (EB) Nr. 1272/2008, dujoms, garams ir aerozoliams taikytinos ribinės koncentracijos atitinkamai yra 20 000 ppm, 20 mg/l ir 5 mg/l. Numatant, kad medžiaga yra toksiška, arba atsižvelgiant į orientacinio tyrimo rezultatus, turėtų būti parinktos mažesnės pradinės koncentracijos. Jeigu yra reglamentavimo arba mokslinių reikmių, gali būti taikomos didesnės koncentracijos.

([c]) Būtų geriausia, jeigu kito koncentracijos lygio dozės davimas gyvūnams būtų nukeliamas iki to laiko, kai bus pagrįstai įsitikinta, kad pirmiau dozę gavę gyvūnai išgyveno. Tai tyrimo vadovui suteiktų galimybę pakoreguoti tikslinę koncentraciją ir trukmes, taikytinas per kitą poveikio seansą.

([d]) Mažiausioji dozė (koncentracija × laikas), dėl kurių gyvūnai nugaišo per bandymus taikant pradinę koncentraciją (pirmasis poveikio seansas), bus naudojama kaip orientyras, nustatant kitą koncentracijos ir poveikio trukmės derinį. Paprastai koncentracija mažinama du kartus (1/2L), ir gyvūnai veikiami naujais laiko intervalais, naudojant smulkesnį tinklelį, sudarytą taikant geometrinį poveikio laikotarpių suskirstymą remiantis koeficientu 1,4 (√2; žr. 11 nuorodą), ir šiuos laikotarpius išdėstant apie trukmę, per kurią pirmojo poveikio metu pastebėtas mažiausiasis mirtinas dozės dydis (laikas × koncentracija). Šiame paveiksle (1 paveikslas) per I poveikio seansą gaištamumas pirmą kartą pastebėtas po 15 minučių; todėl per II seansą taikytinos trukmės nustatytos kaip vidurinę trukmę pasirenkant 30 min., t. y. 15, 21, 30, 42 ir 60 minučių. Po dviejų poveikio seansų primygtinai rekomenduojama remiantis duomenimis nubraižyti panašų grafiką, kaip parodyta pirmiau, ir patikrinti, ar koncentracijos ir laiko tarpusavio priklausomybės tiesė sudaro 45 laipsnių kampą (n = 1) arba ar koncentracijos, laiko ir reakcijos tarpusavio priklausomybės tiesė yra nelabai nuožulni (pvz., n = 2) ar nuožulnesnė (pvz., n = 0,8). Pastaraisiais atvejais primygtinai rekomenduojama atitinkamai pakoreguoti toliau taikytinas koncentracijas ir trukmes.

▼M4

IV poveikio seansas. Pagrindinis tyrimas

— Kiekvienai koncentracijai ir laiko trukmei naudojama po vieną skirtingos lyties gyvūną; iš viso – 10 gyvūnų.

— Penkios gyvūnų grupės veikiamos didesne koncentracija ([e]) (2L), taikant šiek tiek trumpesnes poveikio trukmes (intervalus apskaičiuojant remiantis koeficientu √2; žr. 1 paveikslą).

Matematinis rezultatų apdorojimas pagal „K × l“ protokolą

11. Pagal „K × l“ procedūrą taikant keturias arba penkias poveikio koncentracijas ir penkias trukmes bus atitinkamai bus gauti 20 arba 25 duomenų taškai. Naudojant šiuos duomenų taškus, koncentracijos ir laiko tarpusavio priklausomybė gali būti apskaičiuota atliekant statistinę analizę (16):

1 lygtis:

$$Tikimybė(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

čia: C – koncentracija; t – poveikio trukmė, arba:

2 lygtis:

$$Reakcija = f(C^n t)$$

čia: $n = b_1/b_2$.

Naudojant 1 lygtį, LC_{50} vertė gali būti apskaičiuota tam tikram laikotarpiui (pvz., keturių valandų, vienos valandos, 30 minučių arba bet kokiam kitam laikotarpiui, patenkančiam į bandymų laikotarpių intervalą), tariant, kad P = 5 (50 % reakcija). Atkreipkite dėmesį, kad Haberio taisyklė taikoma tik tada, kai n = 1. LC_{01} vertė gali būti apskaičiuota tariant, kad P = 2,67.

([e]) Tam tikrais atvejais gali reikėti padidinti koncentraciją (2L), taikytiną per naujus laiko intervalus, nustatytus naudojant dar smulkesnį tinklelį, sudarytą taikant geometrinį poveikio laikotarpių suskirstymą remiantis koeficientu 1,4 (√2), ir šiuos laikotarpius išdėstant apie trukmę, per kurią pirmojo poveikio metu pastebėtas mažiausiasis mirtinas koncentracijos lygis. Pageidautina, kad trumpiausia poveikio trukmė būtų ilgesnė kaip 5 minutės; ilgiausia trukmė turėtų neviršyti 8 valandų.

▼C1

B.3. ŪMUS TOKSIŠKUMAS (PER ODĄ)

1. METODAS

1.1. ĮVADAS

Žr. Bendrojo įvado B dalies A skirsnį.

1.2. APIBRĖŽTYS

Žr. Bendrojo įvado B dalies B skirsnį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandomoji medžiaga dedama ant odos skirtingomis dozėmis kelioms eksperimentinių gyvūnų grupėms, viena dozė – vienai grupei. Po to atliekami poveikio ir nugaišimo atvejų stebėjimai. Gyvūnams, kurie nugaišta bandymo metu, atliekama nekroskopija, ir, užbaigus bandymą, atliekama bandymą išgyvenusių gyvūnų nekroskopija.

Gyvūnus, kurie turi aiškių ir ilgalaikių kančios ir skausmo požymių, reikia humaniškai numarinti. Jeigu žinoma, kad dėl medžiagų, naudojamų dozavimo bandymuose, gali kilti skausmas ir kančia dėl jų ardančių (ėsdinančių) arba dirginančių savybių, tokie bandymai neturėtų būti atliekami.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Pasirengimas**

Gyvūnai laikomi eksperimentiniuose narveliuose eksperimentinėmis laikymo ir šėrimo sąlygomis ne trumpiau kaip penkias dienas iki eksperimento pradžios. Prieš bandymą sveiki jauni suaugę gyvūnai atsitiktinai atrenkami ir paskiriami į bandomąsias grupes. Apytikriai 24 valandas iki bandymo nuo gyvūno kūno sprando srityje pašalinamas kailis, jį nukerpant arba nuskutant. Jeigu kailis kerpamas arba skutamas, reikia stengtis nenutrinti odos, tai gali pakeisti pralaidumą. Bandomajai medžiagai uždėti turėtų būti nukirpta ar nuskusta ne mažiau kaip 10 % kūno paviršiaus. Jeigu bandomos kietosios medžiagos, kurios atitinkamais atvejais gali būti pulverizuojamos, bandomoji medžiaga turėtų būti pakankamai sudrėkinama vandeniu arba, jeigu reikia, atitinkamu nešikliu, kad būtų užtikrinamas geras sąlytis su oda. Jeigu naudojamas nešiklis, turėtų būti atsižvelgiama į jo poveikį bandomosios medžiagos įsiskverbimui į odą. Skystos bandomosios medžiagos paprastai naudojamos neskiestos.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

1.6.2.1. *Eksperimentiniai gyvūnai*

Gali būti naudojamos suaugusios žiurkės arba triušiai. Gali būti naudojamos ir kitos rūšys, bet jų naudojimas turėtų būti pagrindžiamas. Turėtų būti panaudojamos įprastos laboratorinės veislės. Bandymo pradžioje abiejų lyčių gyvūnų svoris turėtų būti ± 20 % atitinkamo vidutinio svorio.

▼C1

1.6.2.2. *Skaičius ir lytis*

Kiekvienai dozei naudojama ne mažiau kaip 5 gyvūnai. Jie visi turėtų būti vienos lyties. Jeigu naudojamos patelės, jos turėtų būti neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos. Jeigu galima gauti informacijos, įrodančios, kad kuri nors lytis yra daug jautresnė, dozė taikoma tai lyčiai.

Pastaba. Atliekant ūmaus toksiškumo bandymus su aukštesniaisiais gyvūnais nei graužikai, turi būti apsvarstoma galimybė naudoti mažesnį gyvūnų skaičių. Dozės turėtų būti atidžiai parenkamos ir turėtų būti dedamos visos pastangos neviršyti vidutinio toksiškumo dozių. Tokiuose bandymuose turėtų būti vengiama mirtinų bandomosios medžiagos dozių.

1.6.2.3. *Dozės*

Dozių skaičius turėtų būti pakankamas, ne mažiau kaip trys. Jos turėtų pakankamai skirtis, kad bandomiesiems gyvūnams pasireikštų įvairus toksinis poveikis ir skirtingo dydžio gaištamumo procentas. Parenkant dozės dydį reikia atsižvelgti į jautrinimo ar ėsdinimo poveikį. Duomenų turėtų būti tiek, kad būtų galima sudaryti dozės ir reakcijos kreivę ir, jeigu įmanoma, būtų galima nustatyti LD_{50}.

1.6.2.4. *Ribinis bandymas*

Galima atlikti ribinį bandymą su penkiais patinėliais ir penkiomis patelėmis, jiems skiriant vienetinę 2 000 mg/kg kūno masės dozę pagal pirmiau aprašytą darbo eigą. Jeigu cheminis junginys tampa nugaišimo priežastimi, reikėtų apsvarstyti, ar nereikėtų atlikti išsamų tyrimą.

1.6.2.5. *Stebėjimo laikotarpis*

Stebėjimo laikotarpis turėtų būti ne trumpesnis kaip 14 dienų. Tačiau stebėjimo trukmė neturėtų būti griežtai nustatoma. Ji turėtų būti nustatoma pagal toksines reakcijas, jų pasireiškimo dažnumą ir sveikimo laikotarpio trukmę; todėl, jeigu laikoma reikalinga, ji gali būti pailginama. Labai svarbu, kada toksiškumo požymiai atsiranda ir išnyksta, bei nugaišimo laikas, ypač jeigu yra tendencija, kad žūtis pasireiškia vėliau.

1.6.3. **Bandymo eiga**

Gyvūnai turėtų būti laikomi atskiruose narveliuose. Bandomoji medžiaga turėtų būti tolygiai uždedama ant plotelio, kurio dydis sudaro apie 10 % viso kūno paviršiaus. Jeigu medžiagos labai toksiškos, paveikiamas paviršius gali būti mažesnis, bet kaip galima didesnis plotas turėtų būti padengiamas kuo plonesniu ir lygesniu sluoksniu.

Bandomoji medžiaga turėtų liestis su oda akytu marlės tvarsčiu ir nedirginančia lipnia juostele per visą 24 valandų veikimo laiką. Bandomoji vieta turėtų būti papildomai tinkamai uždengta, kad marlės tvarstis ir bandomoji medžiaga laikytųsi bei būtų užtikrinama, kad gyvūnai nepraris bandomosios medžiagos. Gali būti naudojami ribotuvai, kad bandomoji medžiaga nebūtų praryjama, bet visiško imobilizavimo metodas nerekomenduojamas.

▼C1

Veikimo laikotarpio pabaigoje bandomosios medžiagos likutis turėtų būti nuimamas, paprastai naudojant vandenį ar kokį kitą atitinkamą odos valymo būdą.

Veikimo metu atliekami stebėjimai, kurie sistemingai užrašomi. Apie kiekvieną gyvūną turėtų būti daromi atskiri įrašai. Pirmą dieną stebėjimai turėtų būti atliekami dažnai. Kruopštus klinikinis ištyrimas turėtų būti atliekamas ne rečiau kaip vieną kartą kiekvieną darbo dieną, kiti stebėjimai turėtų būti vykdomi kiekvieną dieną, imantis atitinkamų veiksmų kuo labiau sumažinti bandymo metu prarandamų gyvūnų skaičių, pvz., rastų negyvų gyvūnų nekroskopija arba užšaldymas ir nusilpusių arba gaištančių gyvūnų izoliavimas arba numarinimas.

Turėtų būti stebimi odos ir kailio, akių ir gleivinės pasikeitimai, taip pat respiratorinės, kraujo, autonominės ir centrinės nervų sistemų ir somatomotorinio aktyvumo ir elgsenos pasikeitimai. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas drebulių, konvulsijų, seilėjimosi, viduriavimo, letargo, miego ir komos stebėjimams. Nugaišimo laikas turėtų būti užrašomas kuo tiksliau. Gyvūnams, kurie nugaišta bandymo metu, ir tiems, kurie išlieka gyvi pabaigus bandymą, atliekama nekroskopija. Visi dideli patologiniai pokyčiai turėtų būti registruojami. Jeigu nurodyta, turėtų būti paimami audiniai histopatologiniam tyrimui.

Toksiškumo priešingai lyčiai įvertinimas

Užbaigus bandymą su viena lytimi, dozė skiriama ne mažiau kaip vienai grupei, susidedančiai iš 5 priešingos lyties gyvūnų, kad būtų nustatyta, ar šios lyties gyvūnai nėra jautresni bandomajai medžiagai. Atskirais atvejais pateisinamas mažesnio gyvūnų skaičiaus naudojimas. Jeigu galima gauti pakankamai informacijos, įrodančios, kad bandomos lyties gyvūnai yra daug jautresni, galima apsieiti be priešingos lyties gyvūnų bandymo.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti apibendrinami lentelėse, nurodant kiekvienos grupės gyvūnų skaičių bandymo pradžioje, kiekvieno gyvūno nugaišimo laiką, gyvūnų, turinčių kitokių toksiškumo požymių, skaičių, pateikiant toksinio poveikio ir nekroskopijos duomenų aprašymą. Kiekvieno gyvūno svoris turėtų būti nustatomas ir užrašomas prieš pat uždedant bandomosios medžiagos, po to kartą per savaitę ir nugaišimo metu; svorio pasikeitimai turėtų būti apskaičiuojami ir užrašomi, jeigu išgyvenama ilgiau negu vieną dieną. Gyvūnai, kurie humaniškai numarinami dėl cheminio junginio sukeliamų kančių ir skausmo, yra užregistruojami kaip žūties atvejai, kurių priežastis – cheminis junginys. LD_{50} turėtų būti nustatoma pripažintu metodu.

Vertinant duomenis reikėtų įvertinti sąryšį, jeigu toks yra, tarp gyvūnų, paveiktų bandomąja medžiaga, ir visų anomalijų atsiradimo ir stiprumo, įskaitant elgsenos ir klinikines anomalijas, didesnių audinių pakitimų, kūno svorio pasikeitimų, nugaišimo ir kito toksikologinio poveikio.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, turėtų būti pateikiama tokia informacija:

▼C1

— rūšis, veislė, gyvūnų tiekėjas, aplinkos sąlygos, pašaras ir pan.,

— bandymo sąlygos (taip pat odos nuvalymo metodas ir tvarstymo būdas: pralaidus arba nepralaidus),

— dozės (nurodant nešiklį, jeigu naudojamas, ir koncentracijas),

— gyvūnų, kuriems įvestos dozės, lytis,

— duomenų lentelės pagal lytį ir dozes (t. y. gyvūnų, kurie nugaišo arba buvo numarinti bandymo metu, skaičius, toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičius, paveiktų gyvūnų skaičius),

— nugaišimo laikas davus dozę, priežastys ir kriterijai, kuriais naudotasi humaniškai numarinant gyvūnus,

— visi pastebėjimai,

— išsamiame bandyme išbandytos lyties LD_{50} vertė, nustatyta per 14 dienų (nurodant apibrėžtą nustatymo metodą),

— LD_{50} 95 % pasikliautinasis intervalas (tais atvejais, kai gali būti pateiktas),

— dozės ir gaištamumo kreivė ir statumas, jeigu įmanoma nustatyti pagal nustatymo metodą,

— nekroskopijos duomenys,

— visi histopatologiniai duomenys,

— bet kurio bandymo su priešinga lytimi rezultatai,

— rezultatų aptarimas (ypatingas dėmesys turėtų būti atkreipiamas į tai, kokį poveikį apskaičiuojamai LD_{50} vertei gali turėti humaniškas gyvūnų numarinimas bandymo metu),

— duomenų aiškinimas.

3.2. DUOMENŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalies D skirsnį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalies E skirsnį.

▼C1

B.4. **ŪMUS TOKSIŠKUMAS. ODOS DIRGINIMAS AR ĖSDINIMAS**

1. **METODAS**

Šis metodas atitinka OECD TG 404 (2002).

1.1. ĮVADAS

Rengiant šį atnaujintą metodą ypatingas dėmesys buvo kreipiamas į galimą gyvūnų gerovės pagerinimą ir į visos turimos informacijos apie bandomąją medžiagą įvertinimą, siekiant išvengti nebūtinų bandymų su laboratoriniais gyvūnais. Pagal šį metodą rekomenduojama, prieš darant aprašytą medžiagos ėsdinimo ar dirginimo *in vivo* bandymą, daryti turimų atitinkamų duomenų įrodomosios vertės analizę. Jei duomenų nepakanka, jų galima gauti darant nuoseklųjį bandymą (1). Į bandymo strategiją, pateikiamą kaip šio metodo priedėlis, įtraukti įteisinti ir priimti *in vitro* bandymai. Be to, jei tinka, darant pradinį *in vivo* bandymą vietoj vienalaikio rekomenduojamas nuoseklusis trijų bandomųjų tamponų uždėjimo gyvūnui bandymas.

Siekiant užtikrinti ir duomenų mokslinį patikimumą, ir gyvūnų gerovę, *in vivo* bandymai nedaromi tol, kol darant duomenų įrodomosios vertės analizę nebus įvertinti visi turimi duomenys, apibūdinantys galimą medžiagos ėsdinamąjį ar dirginamąjį poveikį odai. Tokius duomenis sudarys turimų bandymų su žmonėmis ir (arba) laboratoriniais gyvūnais rezultatai, ėsdinimo ar dirginimo duomenys, gauti apie vieną arba kelias medžiagas, turinčias gimininga struktūrą, arba apie jų mišinius, duomenys, patvirtinantys medžiagos stiprias rūgštines arba šarmines savybes (2) (3), be to, įteisintų ir priimtų *in vitro* arba *ex vivo* bandymų rezultatai (4) (5) (5a). Ši analizė turėtų sumažinti poreikį *in vivo* bandyti tas medžiagas, apie kurių odos ėsdinamąjį ar dirginamąjį poveikį jau turima pakankamai kitų bandymų metu gautų duomenų.

Pirmenybė teikiama į šio metodo priedėlį įtrauktai nuoseklųjų bandymų strategijai, kurią sudaro įteisinti ir priimti *in vitro* arba *ex vivo* ėsdinimo ar dirginimo bandymai. Strategiją parengė ir vienbalsiai rekomendavo OECD seminaro dalyviai (6), ji buvo priimta ir rekomenduota kaip visuotinai suderintos cheminių medžiagų klasifikavimo sistemos (GHS) bandymų strategija (7). Rekomenduojama laikytis šios bandymų strategijos prieš pradedant *in vivo* bandymus. Tiriant naujas medžiagas, rekomenduojamas nuoseklusis bandymo būdas moksliškai pagrįstiems duomenims apie medžiagos ėsdinimo ar dirginimo savybes gauti. Tiriant esamas medžiagas, apie kurių odos ėsdinimo ar dirginimo savybes duomenų nepakanka, ši strategija turėtų būti taikoma tiek, kiek trūksta duomenų spragoms užpildyti. Kitokios bandymo strategijos arba metodikos taikymas arba sprendimas netaikyti nuoseklųjų bandymų metodo turi būti pagrįstas.

Jei darant duomenų įrodomosios vertės analizę ėsdinimo arba dirginimo savybių negalima nustatyti, pagal nuoseklaus bandymo strategiją reikėtų apsvarstyti *in vivo* bandymo atlikimą (žr. priedėlį).

▼C1

1.2. APIBRĖŽTYS

Odos dirginimas – išnykstantis odos pažeidimas, bandomąja medžiaga veikiant ne ilgiau kaip 4 h.

Odos ėsdinimas – neišnykstantis odos pažeidimas; būtent, matomoji nekrozė per epidermį ir į dermį, odos nekrozė po bandomosios medžiagos uždėjimo ne ilgiau kaip keturioms valandoms. Tipiniai ėsdinimo požymiai yra opos, kraujavimas, kruvini šašai ir, baigiantis 14 parų stebėjimo laikotarpiui, odos blukimas dėl jos išbalimo, visiškai nuplikusios vietos ir randai. Neaiškiems pažeidimams nustatyti galima būtų daryti histopatologinį tyrimą.

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Ant bandomo gyvūno odos dedama viena bandomosios medžiagos dozė; nepaveiktos gyvūno odos vietos naudojamos kontrolei. Nustatytais laiko tarpais nustatomas ir balais įvertinamas dirginimo ar ėsdinimo laipsnis, kuris papildomai aprašomas, siekiant išsamiai įvertinti poveikį. Bandymo trukmė turi būti tokia, kad pakaktų įvertinti, ar stebimas poveikis yra grįžtamas, ar negrįžtamas.

Gyvūnai, kuriems kurioje nors bandymo stadijoje pasireiškia nuolatiniai sunkių kančių ir (arba) skausmo požymiai, turi būti humaniškai numarinami, o medžiaga atitinkamai įvertinama. Kriterijai, pagal kuriuos priimamas sprendimas dėl humaniško gaištančių ir labai kenčiančių gyvūnų numarinimo, aprašyti (8) nuorodoje.

1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.4.1. **Pasiruošimas *in vivo* bandymui**

1.4.1.1. *Gyvūnų rūšies pasirinkimas*

Tinkamiausias laboratorinis gyvūnas – baltasis triušis; naudojami sveiki, jauni ir suaugę triušiai. Kitų rūšių naudojimas turi būti pagrįstas.

1.4.1.2. *Gyvūnų ruošimas*

Maždaug 24 h prieš bandymą nuo gyvūno reikia pašalinti kailį, jį trumpai nukerpant nugaros srityje. Reikia stengtis nenutrinti odos ir naudoti tik tuos gyvūnus, kurių oda yra sveika ir nepažeista.

Kai kurių veislių triušiai turi tankių plaukų vietas, kurios labiau matomos tam tikrais metų laikais. Tokios tankių plaukų vietos neturi būti naudojamos bandymui.

1.4.1.3. *Laikymo ir šėrimo sąlygos*

Gyvūnai turi būti laikomi atskirai. Patalpos, kurioje laikomi bandomieji triušiai, temperatūra turi būti 20 °C (± 3 °C). Nors santykinė oro drėgmė turėtų būti mažiausiai 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikėtų siekti, kad ji būtų 50–60 %. Apšvietimas turi būti dirbtinis: 12 h šviesos ir 12 h tamsos. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, neribojant geriamo vandens kiekio.

▼C1

1.4.2. **Bandymo eiga**

1.4.2.1. *Bandomosios medžiagos uždėjimas*

Bandomoji medžiaga uždedama ant mažo odos ploto (maždaug 6 cm^2) ir uždengiama marlės tamponu, kuris tvirtinamas nedirginančia lipnia juosta. Jei tiesiogiai uždėti neįmanoma (pvz., skysčiai arba kai kurios pastos), bandomąją medžiagą reikėtų dėti ant marlės tampono, kuris būtų dedamas ant odos. Visą veikimo laikotarpį tamponas turi laisvai liesti odą, naudojant pusiau pralaidų tvarstį. Jei bandomoji medžiaga dedama ant tampono, jis dedamas ant odos taip, kad medžiaga gerai liestųsi su oda ir tolygiai pasiskirstytų ant jos. Gyvūnai neturi pasiekti tampono ir praryti arba įkvėpti bandomosios medžiagos.

Skystos bandomosios medžiagos paprastai naudojamos neskiestos. Bandant kietąsias medžiagas (kurios gali būti pulverizuojamos, jei manoma, kad tai būtina), bandomąją medžiagą reikėtų sudrėkinti kuo mažesniu vandens kiekiu (arba prireikus kitu tinkamu nešikliu), kurio pakaktų geram sąlyčiui su oda užtikrinti. Kai nešiklis yra ne vanduo, galima nešiklio įtaka bandomosios medžiagos dirginamajam poveikiui turi būti kiek įmanoma mažesnė.

Pasibaigus veikimo laikotarpiui, kurio trukmė paprastai yra 4 h, bandomosios medžiagos likutis turi būti pašalintas, jei įmanoma, vandeniu arba kitu tinkamu tirpikliu, nepakeičiant odos reakcijos arba epidermio vientisumo.

1.4.2.2. *Dozės dydis*

Ant bandymo vietos dedama 0,5 ml skysčio arba 0,5 g kietosios medžiagos arba pastos dozė.

1.4.2.3. *Pradinis bandymas (in vivo odos dirginimo ar ėsdinimo bandymas su vienu gyvūnu)*

Labai rekomenduojama *in vivo* bandymą iš pradžių daryti su vienu gyvūnu, ypač kai yra įtarimas dėl ėsdinančiųjų medžiagos savybių. Tai atitinka nuosekliųjų bandymų strategiją (žr. 1 priedėlį).

Kai po duomenų įrodomosios vertės analizės padaroma išvada, kad medžiaga yra ėsdinanti, daugiau bandymų su gyvūnais daryti nereikia. Didesnei daliai medžiagų, kurios, kaip spėjama, yra ėsdinančios, paprastai daugiau *in vivo* bandymų neprireikia. Tačiau tais atvejais, kai turimi duomenys atrodo nepakankamai įrodantys, galima daryti ribotą bandymą su gyvūnais, taikant šį būdą: ant gyvūno paeiliui dedami ne daugiau kaip trys tamponai. Pirmasis tamponas nuimamas po trijų minučių. Jei jokios sunkios odos reakcijos nėra, dedamas antras tamponas, kuris nuimamas po valandos. Jei šioje stadijoje stebėjimai rodo, kad veikimą galima humaniškai pratęsti keturioms valandoms, dedamas trečias tamponas, kuris nuimamas po keturių valandų, ir odos reakcija įvertinama balais.

Jei ėsdinantis poveikis pastebimas po bet kurio iš trijų nuoseklių paveikimų, bandymas nedelsiant baigiamas. Jei ėsdinančio poveikio nėra, nuėmus paskutinį tamponą, gyvūnas stebimas 14 parų, jei ėsdinimo požymių neatsiranda anksčiau.

▼C1

Tais atvejais, kai nesitikima, kad bandomoji medžiaga sukels ėsdinantį poveikį, o tik dirginantį, vienam gyvūnui keturioms valandoms dedamas vienas tamponas.

1.4.2.4. *Patvirtinamasis bandymas (in vivo odos dirginimo bandymas su papildomais gyvūnais)*

Jei darant pradinį bandymą ėsdinančio poveikio nėra, dirginantis poveikis arba neigiama reakcija turi būti patvirtinti naudojant ne daugiau kaip du papildomus gyvūnus, kiekvienam iš jų uždedant po vieną tamponą ir laikant jį keturias valandas. Jei dirginantis poveikis pastebimas darant pradinį bandymą, patvirtinamąjį bandymą galima daryti nuosekliu būdu arba veikiant du papildomus gyvūnus vienu metu. Išimtiniais atvejais, kai pradinis bandymas nedaromas, dviem arba trims gyvūnams gali būti dedama po vieną tamponą keturioms valandoms. Kai naudojami du gyvūnai ir abiejų reakcija vienoda, toliau bandyti nereikia. Priešingu atveju atliekamas bandymas su trečiu gyvūnu. Neaiškias reakcijas gali tekti įvertinti naudojant papildomą gyvūną.

1.4.2.5. *Stebėjimo laikotarpis*

Stebėjimo laikotarpio trukmės turi pakakti pastebėto poveikio grįžtamumui visiškai įvertinti. Tačiau bandymas turi būti nutrauktas bet kuriuo momentu, kai tik gyvūnui pasireiškia ilgalaikiai didelio skausmo arba kančios požymiai. Siekiant nustatyti poveikio grįžtamumą, gyvūnai po tamponų nuėmimo stebimi iki 14 parų. Jei grįžtamumas pastebimas anksčiau kaip po 14 parų, bandymas nutraukiamas tuo momentu.

1.4.2.6. *Klinikiniai stebėjimai ir odos reakcijos įvertinimas balais*

Patikrinama, ar gyvūnai turi eritemos ir edemos požymių, o reakcija įvertinama balais po 60 minučių nuėmus tamponą ir vėliau – po 24, 48 ir 72 valandų. Darant pradinį bandymą su vienu gyvūnu, bandymo vieta taip pat tiriama iškart po tampono nuėmimo. Odos reakcija įvertinama balais ir užrašoma pagal lentelėje pateiktą gradavimo skalę. Jei odai padarytas pažeidimas po 72 h negali būti identifikuotas kaip dirginimas arba ėsdinimas, poveikio grįžtamumui nustatyti stebėjimą gali tekti tęsti iki 14 parų. Be dirginamojo poveikio stebėjimo, turi būti išsamiai apibūdintas ir užrašytas bet koks vietinis toksinis poveikis, pvz., odos džiūvimas, ir bet koks neigiamas somatinis poveikis (pvz., poveikis, pasireiškiantis kaip klinikiniai toksiškumo požymiai, ir poveikis kūno masei). Neaiškiems pažeidimams išaiškinti galima būtų daryti histopatologinį tyrimą.

Odos reakcijos įvertinimas balais yra neišvengiamai subjektyvus. Siekiant labiau suderinti odos reakcijos įvertinimą balais ir padėti bandymo laboratorijoms ir visiems, kurie vykdo ir aiškina stebėjimus, juos vykdantis personalas turi būti atitinkamai apmokytas taikyti įvertinimo balais sistemą (žr. toliau pateiktą lentelę). Taip pat galėtų būti naudingas iliustruotas odos dirginimo ir kitų pažeidimų vertinimo vadovas (9).

2. **DUOMENYS**

2.1. REZULTATŲ PATEIKIMAS

Galutinėje ataskaitoje bandymo rezultatai turi būti apibendrinti lentelėje, į kurią turėtų būti įtraukti visi 3.1 skirsnio punktai.

▼C1

2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS

Odos sudirginimo rezultatai turi būti įvertinti pagal pažeidimų tipą ir sunkumą bei atsižvelgiant į grįžtamumą arba į jo nebuvimą. Atskiri rezultatai nėra medžiagos dirginamųjų savybių absoliutusis įvertis, kadangi vertinamas ir kitas bandomosios medžiagos poveikis. Į šiuos atskirus rezultatus reikėtų žiūrėti kaip į pamatines vertes, kurios turi būti vertinamos kartu su visais kitais bandymo rezultatais.

Vertinant dirginamąsias savybes turėtų būti atsižvelgta į odos pažeidimų grįžtamumą. Kai reakcija, pvz., plikimas (ribotame plote), hiperkeratozė, hiperplazija ir pleiskanojimas, išlieka iki 14 parų stebėjimo laikotarpio pabaigos, bandomoji medžiaga priskiriama dirginančioms.

3. **ATASKAITOS RENGIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

In vivo bandymo pagrindimas: jau turimų bandymo duomenų įrodomosios vertės analizė, įskaitant nuoseklių bandymų strategijos taikymo rezultatus:

— ankstesnių bandymų atitinkamų duomenų aprašymas,

— duomenys, gauti kiekvienoje bandymų strategijos stadijoje,

— darytų *in vitro* bandymų aprašymas, įskaitant išsamią informaciją apie metodikas, rezultatus, gautus tiriant bandomąją ir (arba) etaloninę medžiagą,

— duomenų įrodomosios vertės analizė siekiant nustatyti, ar reikia atlikti *in vivo* bandymą.

Bandomoji medžiaga:

— tapatumas duomenys (pvz., CAS numeris, šaltinis, grynumas, žinomos priemaišos, partijos numeris),

— fizinė būsena ir fizikinės bei cheminės savybės (pvz., pH, lakumas, tirpumas, stabilumas),

— sudėtis ir komponentų procentinė dalis, jei tai mišinys.

Nešiklis:

— tapatumas, koncentracija (jei taikytina), naudojamas tūris,

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas.

Bandomieji gyvūnai:

— naudota rūšis ir veislė, kitų nei baltieji triušiai gyvūnų naudojimo pagrindimas,

— kiekvienos lyties gyvūnų skaičius,

— kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje ir pabaigoje,

— amžius bandymo pradžioje,

— gyvūnų šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.

▼C1

Bandymo sąlygos:

— tampono dėjimo vietos ruošimo technika,

— išsami informacija apie tamponui naudojamas medžiagas ir tampono dėjimo techniką,

— išsami informacija apie bandomosios medžiagos ruošimą, dėjimą ir nuėmimą.

Rezultatai:

— kiekvieno gyvūno dirginimo ar ėsdinimo reakcijos balų, gautų per kiekvieną matavimą, lentelių sudarymas,

— visų pastebėtų pažeidimų aprašymas,

— pastebėto dirginimo arba ėsdinimo tipo ir laipsnio pasakojamasis aprašymas ir visi histopatologinio tyrimo rezultatai,

— kito kartu su dirginimu arba ėsdinimų pasireiškiančio neigiamo vietinio (pvz., odos džiūvimo) ir somatinio poveikio aprašymas.

Rezultatų aptarimas.

4. **NUORODOS**

1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, h.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, p. 410–429.

2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, p. 19–26.

3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, p. 709–720.

4) ECETOC (1990) Monograph No. 15, „Skin Irritation“, European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.

5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, h.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, p. 483–524.

5a) Testing Method B.40 Skin Corrosion.

6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (http://www.oecdl.org/ehs/test/background.htm).

7) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecdl.org/ehs/Class/HCL6.htm).

▼C1

8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in SAFEty Evaluation. OECD Environmental Health and SAFEty Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (http://www.oecdl.org/ehs/test/monos.htm).

9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, (*20T-2004*). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990.

[Paprašius, galima gauti OECD sekretoriate].

▼C1

I lentelė

ODOS REAKCIJOS VERTINIMO BALAIS SKALĖ

Eritemos ir šašų atsiradimas

Eritemos nėra	0
Labai nedidelė eritema (vos pastebima)	1
Aiškiai apibrėžta eritema	2
Nuo vidutinės iki didelės eritemos	3
Didelė eritema (jautienos raudonumo) arba šašų susidarymas, trukdantis įvertinti eritemą	4

Didžiausias įmanomas balas: 4

Edemos atsiradimas

Edemos nėra	0
Labai nedidelė edema (vos pastebima)	1
Nedidelė edema (plotelio kraštai aiškiai apibrėžti dėl iškilimo)	2
Vidutinė edema (iškilusi maždaug 1 mm)	3
Didelė edema (iškilusi daugiau kaip 1 mm ir išplitusi už veikiamo ploto ribų)	4

Didžiausias įmanomas balas: 4

Neaiškiems pažeidimams paaiškinti galima būtų daryti histopatologinį tyrimą.

▼C1

PRIEDĖLIS

Nuosekliųjų bandymų strategija odos dirginimui ir ėsdinimui nustatyti

BENDRIEJI KLAUSIMAI

Siekiant gauti išsamių mokslinių rezultatų ir rūpinantis gyvūnų gerove, svarbu be reikalo nenaudoti gyvūnų ir, kiek įmanoma, mažinti visus bandymus, kurie gyvūnams gali sukelti sunkias reakcijas. Prieš sprendžiant, ar daryti *in vivo* bandymus, turėtų būti įvertinta visa informacija apie medžiagos galimą ėsdinamąjį ar dirginamąjį poveikį odai. Jei jau yra pakankamai duomenų galimam bandomosios medžiagos ėsdinamajam arba dirginamajam poveikiui odai klasifikuoti, nereikia bandymų su laboratoriniais gyvūnais. Taigi taikant duomenų įrodomosios vertės analizę ir nuosekliųjų bandymų strategiją sumažėja būtinybė daryti *in vivo* bandymus, ypač jei tikėtina, kad medžiaga gali sukelti sunkias reakcijas.

Turimai informacijai apie medžiagų dirginamąjį ir ėsdinamąjį poveikį įvertinti rekomenduojama taikyti duomenų įrodomosios vertės analizę, kuri leistų spręsti, ar tokio poveikio galimybei apibūdinti reikia daryti papildomus tyrimus, išskyrus *in vivo* odos bandymus. Jei reikia papildomų tyrimų, atitinkamiems eksperimentiniams duomenims gauti, rekomenduojama taikyti nuosekliųjų bandymų strategiją. Norint gauti duomenų apie nebandytas medžiagas, reikalingų jų ėsdinamajam ar dirginamajam poveikiui odai įvertinti, reikėtų taikyti nuosekliųjų bandymų strategiją. Šiame priede aprašyta bandymų strategija buvo parengta OECD seminare (1) ir vėliau patvirtinta bei išplėsta kaip integruota darnioji pavojų dėl cheminių medžiagų poveikio žmonių sveikatai ir aplinkai klasifikavimo sistema (*Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances*), 1998 m. lapkričio mėn. priimta 28-ajame jungtiniame cheminių medžiagų komiteto ir cheminių medžiagų darbo grupės posėdyje (2).

Nors ši nuosekliųjų bandymų strategija nėra sudėtinė B.4 bandymo metodo dalis, ji apibūdina rekomenduojamą būdą odos dirginimo ar ėsdinimo charakteristikoms nustatyti. Šis būdas atitinka geriausią praktiką ir yra odos dirginimo ar ėsdinimo *in vivo* bandymų etikos etalonas. Bandymo metode pateikiamos *in vivo* bandymų rekomendacijos ir apibendrinami veiksniai, į kuriuos reikėtų atkreipti dėmesį prieš pradedant tokį bandymą. Strategijoje siūlomas būdas, kaip įvertinti turimus duomenis apie bandomųjų medžiagų odos dirginimo ar ėsdinimo savybes, kad būtų galima gauti reikiamų duomenų apie medžiagas, kurioms reikalingi papildomi tyrimai arba kurios nebuvo tirtos. Be to, rekomenduojama daryti įteisintus ir priimtus odos ėsdinimo ar dirginimo *in vitro* arba *ex vivo* bandymus esant konkrečioms aplinkybėms.

ĮVERTINIMO IR BANDYMO STRATEGIJOS APRAŠYMAS

Siekiant nustatyti *in vivo* odos bandymų reikalingumą, prieš darant bandymus, kurie būtų nuosekliųjų bandymų strategijos dalis (schema), įvertinama visa turima informacija. Nors reikšmingos informacijos galima būtų gauti vertinant atskirus parametrus (pvz., pH ribines vertes), turėtų būti nagrinėjama turimos informacijos visuma. Sprendimui priimti turi būti daroma visų atitinkamų duomenų apie konkrečios medžiagos arba jos analogų poveikį įrodomosios vertės analizė, kuri pagrįstų priimamą sprendimą. Didžiausias dėmesys turėtų būti kreipiamas į duomenis apie medžiagą gautus tiriant žmones ir gyvūnus, o vėliau tirti *in vitro* arba *ex vivo* bandymų duomenis. Ėsdinančiųjų medžiagų *in vivo* bandymų reikėtų kiek įmanoma vengti. Toliau pateikiami bandymų strategijos veiksniai.

▼C1

Turimų duomenų gautų tiriant žmones ir gyvūnus, įvertinimas (1 pakopa). Iš pradžių nagrinėjami tiriant žmones gauti duomenys, pvz., klinikiniai arba profesinių susirgimų tyrimai ir bylų ataskaitos, ir (arba) bandymų su gyvūnais duomenys, pvz., vienkartinio arba kartotinio poveikio odai toksiškumo tyrimai, kadangi jie suteikia informacijos, tiesiogiai susijusios su poveikiu odai. Medžiagų, kurios yra žinomos kaip dirginančios arba ėsdinančios, ir medžiagų, kurios akivaizdžiai nėra ėsdinančios arba dirginančios, nereikia bandyti darant *in vivo* tyrimus.

Struktūros ir aktyvumo ryšių (SAR) analizė (2 pakopa). Analizuojami gimininga struktūrą turinčių medžiagų bandymo rezultatai, jei tokie būtų. Kai pakanka duomenų apie gimininga struktūros medžiagų arba tokių medžiagų mišinių poveikį žmonėms ir gyvūnams, kad būtų galima įrodyti medžiagų gebą ėsdinti ar jautrinti odą, galima daryti prielaidą kad įvertinimui pateiktos bandomosios medžiagos poveikis bus toks pats. Tokiais atvejais bandomosios medžiagos nebūtina bandyti. Pagal nuosekliųjų bandymų strategiją neigiami duomenys apie gimininga struktūros medžiagų arba tokių medžiagų mišinių poveikį žmonėms ar gyvūnams nėra pakankamas įrodymas, kad medžiaga nėra ėsdinanti ar jautrinanti. Medžiagų geba ėsdinti ir dirginti odą nustatoma taikant įteisintus ir priimtus SAR metodus.

Fizikinės ir cheminės savybės ir cheminis reaktyvumas (3 pakopa). Medžiagos, turinčios ribines pH vertes, pvz., $\leq 2{,}0$ ir $\geq 11{,}5$, gali turėti didelį vietinį poveikį. Jei ribinė pH vertė yra pagrindinė savybė, pagal kurią medžiaga identifikuojama kaip odą ėsdinanti medžiagą galima atsižvelgti į rūgšties ar šarmo atsargą (arba buferinę talpą) (3) (4). Jei buferinė talpa leidžia daryti prielaidą, kad medžiaga gali nebūti odą ėsdinanti medžiaga, tai turi būti patvirtinta darant papildomus bandymus ir geriau būtų taikyti įteisintą ir priimtą *in vitro* arba *ex vivo* bandymą (žr. 5 ir 6 pakopas).

Toksiškumas per odą (4 pakopa). Jei buvo įrodyta, kad cheminė medžiaga yra labai toksiška per odą, *in vivo* odos dirginimo ar ėsdinimo tyrimas gali būti neįmanomas, nes bandomosios medžiagos kiekis, kuris įprastai dedamas ant odos, gali būti didesnis už labai didelio toksiškumo dozę, taigi gyvūnas gali žūti arba sunkiai kentėti. Be to, jei jau yra padaryti toksiškumo per odą tyrimai su baltaisiais triušiais, naudojant 2 000 mg/kg kūno masės arba didesnę ribinę dozę, ir nebuvo pastebėta odos dirginimo ar ėsdinimo, papildomas odos dirginimo ar ėsdinimo bandymas gali būti nereikalingas. Vertinant ūmų toksiškumą pirmiau darytuose tyrimuose, reikėtų atsižvelgti į kelias aplinkybes. Pvz., paskelbta informacija apie odos pažeidimus gali būti neišsami. Gali būti bandomi ir stebimi gyvūnai kitų, ne triušių rūšių, o rūšių jautrumas poveikiui gali labai skirtis. Be to, bandomosios medžiagos taikymo būdas gali netikti odos dirginimui ar ėsdinimui įvertinti (pvz., medžiagų skiedimas bandant toksiškumą per odą (5). Tačiau tais atvejais, kai toksiškumo per odą tyrimai su triušiais buvo gerai suplanuoti ir padaryti, neigiami rezultatai gali būti laikomi pakankamu įrodymu, kad medžiaga nėra ėsdinanti arba dirginanti.

In vitro arba ex vivo bandymų rezultatai (5 *ir 6 pakopos*). Medžiagų, kurios, kaip įrodyta, veikia kaip ėsdinančios arba labai dirginančios darant patvirtinto tinkamumo ir priimtą *in vitro* arba *ex vivo* bandymą (6) (7), skirtą šiam konkrečiam poveikiui įvertinti, nereikia bandyti su gyvūnais. Galima daryti prielaidą, kad tokios medžiagos turės panašų sunkų poveikį *in vivo*.

▼C1

Bandymas su triušiais in vivo (7 *ir 8 pakopos*). Jei atlikus duomenų įrodomosios vertės analizę priimamas sprendimas daryti bandymą *in vivo*, jį reikėtų pradėti pradiniu bandymu su vienu gyvūnu. Jei šio bandymo rezultatai rodo, kad medžiaga yra odą ėsdinanti, toliau bandyti nereikia. Jei darant pradinį bandymą ėsdinamasis poveikis nepastebimas, dirginimo arba ėsdinimo poveikis patvirtinamas naudojant ne daugiau kaip du papildomus gyvūnus, veikiamus keturias valandas. Jei darant pradinį bandymą pastebimas dirginamasis poveikis, patvirtinamasis bandymas gali būti daromas nuosekliu būdu arba tuo pat metu veikiant du papildomus gyvūnus.

NUORODOS

1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (http://www1. oecd. org/ehs/test/b ackground. htm).

2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28[l] Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://wwwl.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

3) Worth, A.P., Fentem J. H, Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin prielaidą ATLA 26, p. 709–720.

4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. Toxic In Vitro, 2 (1) p. 19–26.

5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): Dermatotoxicology. Fifth 1 1,5, 1–56032–356–6, Chapter 31, p. 411–436.

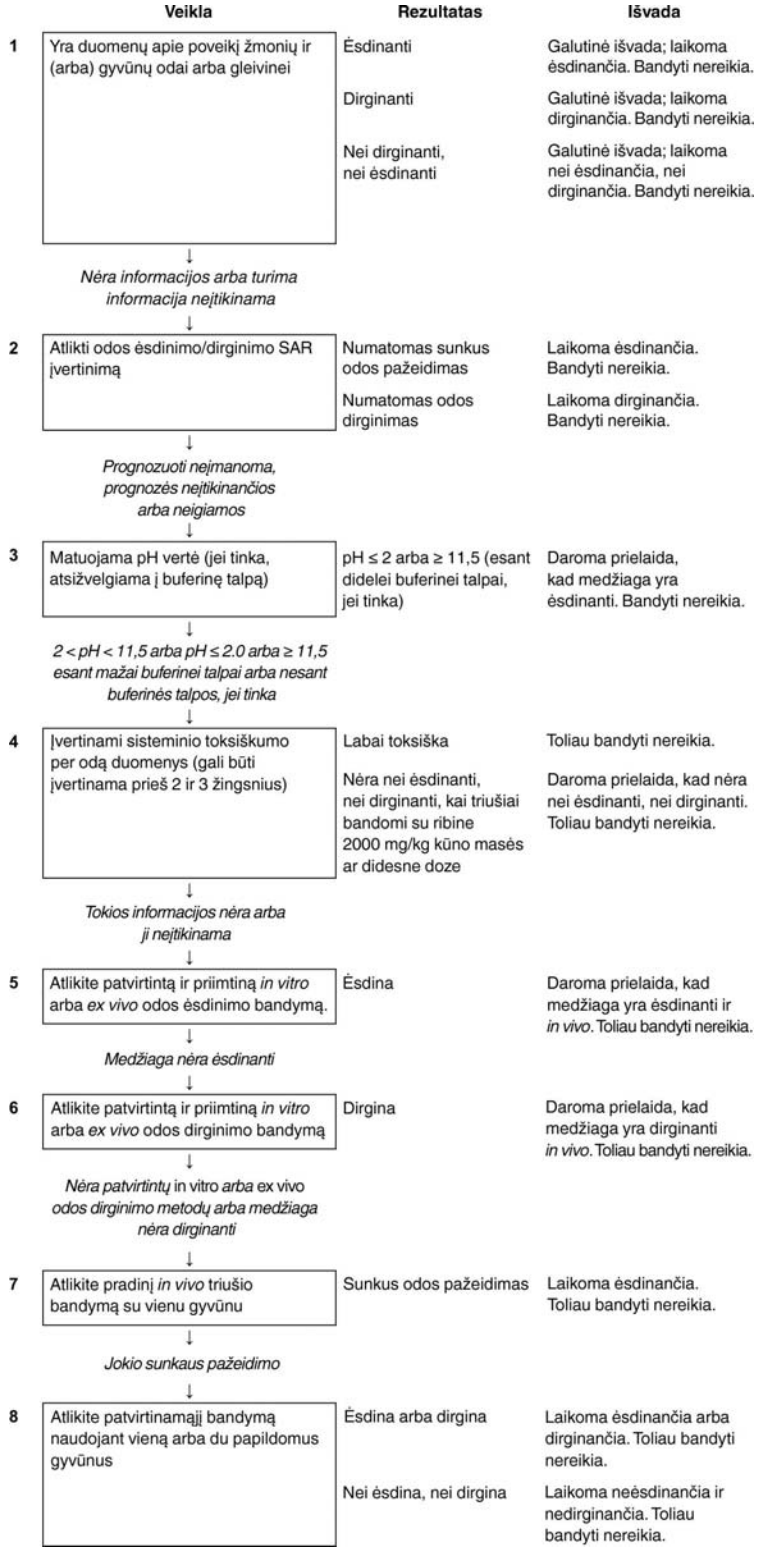
6) Testing Method B.40.

7) Fentem, J.H., identifikuojama G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation prielaidą on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, p. 483–524.

▼C1

Schema

ODOS DIRGINIMO AR ĖSDINIMO BANDYMO IR ĮVERTINIMO STRATEGIJA



▼M7

B.5. ŪMUS AKIŲ DIRGINIMAS IR (ARBA) ĖSDINIMAS

ĮVADAS

Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) 405 (2012). EBPO cheminėms medžiagoms bandyti skirtos bandymų gairės periodiškai peržiūrimos, siekiant, kad jose būtų atsižvelgta į geriausius turimus mokslinius duomenis. Anksčiau peržiūrint šias gaires, ypatingas dėmesys buvo kreipiamas į galimus pagerinimo būdus, įvertinant visą turimą informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą, kad būtų išvengta nebūtinų bandymų su laboratoriniais gyvūnais ir taip būtų sprendžiamos jų gerovės problemos. Į TG 405 (priimtas 1981 m. ir atnaujintas 1987, 2002 ir 2012 m.) įtraukta rekomendacija, kad prieš atliekant aprašytą ūmaus akių dirginimo ar ėsdinimo *in vivo* bandymą, reikėtų atlikti esamų atitinkamų duomenų įrodomosios vertės analizę (1). Jei duomenų nepakanka, rekomenduojama jų gauti atliekant nuosekliuosius bandymus (2)(3). Bandymų strategiją, pateiktą kaip šio bandymų metodo priedėlis, sudaro patvirtinti ir priimti *in vitro* bandymai. Reglamento (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH) ([1]) taikymo tikslu kompleksinių bandymų strategija taip pat įtraukta į atitinkamą ECHA rekomendaciją (21). Bandymus su gyvūnais reikėtų atlikti tik tais atvejais, kai nustatoma, kad jie yra būtini, išnagrinėjus turimus alternatyvius metodus, ir taikyti tik tuos metodus, kurie nustatyti kaip tinkami. Tuo metu, kai buvo rengiamas šio atnaujinto bandymo metodo projektas, pagal kai kurias reglamentavimo sistemas vis dar buvo būtina arba reikalaujama taikyti šį metodą.

Vėliausiame atnaujinime daugiausia dėmesio skiriama analgetikų ir anestetikų naudojimui, nedarant įtakos pagrindinei bandymų gairių koncepcijai ir struktūrai. ICCVAM ([2]) ir tarptautinė mokslinė nepriklausomų ekspertų grupė peržiūrėjo vietinių anestetikų ir sisteminių analgetikų įprastinio naudojimo naudą bei apribojimus ir humaniško poveikio vertinamąsias baigtis, atliekant *in vivo* akių dirginimo saugos bandymus (12). Peržiūros išvada yra ta, kad, naudojant vietinius anestetikus ir sisteminius analgetikus, dažniausiai arba visiškai būtų galima išvengti skausmo ir kančių, nedarant įtakos bandymo rezultatui, ir rekomenduojama, kad šios medžiagos būtų visuomet naudojamos. Šiame bandymo metode atsižvelgta į šią peržiūrą. Atliekant ūmaus akių dirginimo ir ėsdinimo *in vivo* bandymus, įprastai reikėtų naudoti vietinius anestetikus, sisteminius analgetikus ir humaniško poveikio vertinamąsias baigtis. Jų naudojimo išimtys turėtų būti pagrįstos. Šiame metodo aprašyme nurodyti patobulinimai iš esmės sumažins gyvūnų skausmą ir kančias arba jų bus išvengta atliekant daugelį bandymų, kai vis dar yra būtinas *in vivo* akių saugos bandymas.

Subalansuotą prevencinį skausmo valdymą turėtų sudaryti (i) įprastinis išankstinis apdorojimas vietiniu anestetiku (pvz., proparakainu ar tetrakainu) ir sisteminiu analgetiku (pvz., buprenorfinu), (ii) įprastinio paskesnio nuskausminimo sisteminiais analgetikais (pvz., buprenorfinu ir meloksikamu) planas, (iii) planinis gyvūnų stebėjimas, monitoringas ir registravimas dėl klinikinių skausmo ir (arba) kančių požymių ir (iv) planinis visų akių pažeidimo tipų, rimtumo ir eigos stebėjimas, monitoringas ir registravimas. Papildoma informacija pateikta

([1]) 2006 m. gruodžio 18 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH), įsteigiantis Europos cheminių medžiagų agentūrą, iš dalies keičiantis Direktyvą 1999/45/EB bei panaikinantis Tarybos reglamentą (EEB) Nr. 793/93, Komisijos reglamentą (EB) Nr. 1488/94, Tarybos direktyvą 76/769/EEB ir Komisijos direktyvas 91/155/EEB, 93/67/EEB, 93/105/EB ir 2000/21/EB. OL L 304, 2007 11 22, p. 1.

([2]) JAV Alternatyvių metodų patvirtinimo tarpžinybinis koordinavimo komitetas.

▼M7

toliau aprašytose atnaujintose procedūrose. Po veikimo bandomąja chemine medžiaga nereikėtų naudoti papildomų vietinių anestetikų ar analgetikų, kad būtų išvengta tyrimo trukdžių. Analgetikų su priešuždegiminiu veikimu (pvz., meloksikamo) nereikėtų naudoti kaip vietinių analgetikų, o sisteminio naudojimo dozės neturėtų trukdyti akių poveikiui.

Apibrėžtys aprašytos bandymo metodo priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI

Siekiant užtikrinti duomenų mokslinį patikimumą ir gyvūnų gerovę, *in vivo* bandymai neturėtų būti numatomi tol, kol atliekant duomenų įrodomosios vertės analizę nebus įvertinti visi turimi duomenys, apibūdinantys galimą cheminės medžiagos ėsdinamąjį ar dirginamąjį poveikį akims. Tokius duomenis sudaro turimų tyrimų su žmonėmis ir (arba) laboratoriniais gyvūnais rezultatai, ėsdinimo ar dirginimo duomenys, gauti apie vieną arba kelias medžiagas, turinčias giminingą struktūrą, arba jų mišinius, duomenys, patvirtinantys cheminės medžiagos stiprias rūgštines arba šarmines savybes (4)(5), be to, patvirtintų ir priimtų *in vitro* arba *ex vivo* odos ėsdinimo ir dirginimo bandymų rezultatai (6) (13) (14) (15) (16) (17). Tyrimai gali būti daromi prieš duomenų įrodomosios vertės analizę arba kaip jos rezultatas.

Tokia tam tikrų cheminių medžiagų analizė gali parodyti, kad reikia atlikti cheminės medžiagos akių ėsdinimo ar dirginimo gebos *in vivo* tyrimus. Visais šiais atvejais prieš svarstant *in vivo* akių bandymo atlikimą, pageidautina prieš tai atlikti cheminės medžiagos *in vitro* ir (arba) odos ėsdinimo *in vivo* padarinių tyrimą ir ją įvertinti taikant B.4 bandymų metodo (7) nuosekliųjų bandymų strategiją arba kompleksinių bandymų strategiją, aprašytą ECHA rekomendacijoje (21).

Nuosekliųjų bandymų strategija, kurią sudaro patvirtintų *in vitro* ar *ex vivo* akių ėsdinimo ar dirginimo bandymų atlikimas, yra įtraukta į šį bandymo metodą kaip priedėlis ir, dėl REACH, į ECHA rekomendaciją (21). Prieš pradedant *in vivo* bandymus, rekomenduojama laikytis šios bandymų strategijos. Naujoms cheminėms medžiagoms rekomenduojamas nuosekliųjų bandymų metodas, siekiant gauti moksliškai pagrįstus cheminės medžiagos ėsdinimo ar dirginimo duomenis. Esamoms cheminėms medžiagoms, apie kurių odos ir akių ėsdinimo ar dirginimo savybes duomenų nepakanka, ši strategija gali būti taikoma trūkstamiems duomenims gauti. Kitokios bandymo strategijos arba procedūros taikymas arba sprendimas netaikyti nuosekliųjų bandymų metodo turėtų būti pagrįstas.

IN VIVO BANDYMO METODO PRINCIPAS

Po parengtinio apdorojimo sisteminiu analgetiku ir suleidus atitinkamo vietinio anestetiko, viena iš bandymo gyvūno akių veikiama vienkartine bandomosios cheminės medžiagos doze, neapdorota akis naudojama kaip kontrolinė. Akių dirginimo ir (arba) ėsdinimo geba nustatoma tam tikrais laiko tarpais balais įvertinant junginės, ragenos ir rainelės pažeidimus. Be to, siekiant išsamiai įvertinti poveikį, aprašomas bet koks kitas poveikis ir neigiamas sisteminis poveikis. Tyrimo trukmė turi būti pakankama, kad būtų galima įvertinti, ar poveikis yra grįžtamas ar negrįžtamas.

Gyvūnai, kuriems bet kurioje bandymo stadijoje pasireiškia stiprus skausmas, kančios arba pažeidimai, atitinkantys šiame bandymų metode aprašytas humaniško poveikio vertinamąsias baigtis (žr. 26 pastraipą), turi būti humaniškai numarinami, o cheminė medžiaga atitinkamai įvertinta. Sprendimo dėl gaištančių ir stipriai kenčiančių gyvūnų humaniško numarinimo priėmimo kriterijai yra nagrinėjami EBPO rekomendaciniame dokumente (8).

▼M7

IN VIVO BANDYMO METODO PARENGIAMIEJI DARBAI

Rūšių parinkimas

Tinkamiausias laboratorinis gyvūnas – baltasis triušis; naudojami sveiki, jauni suaugę triušiai. Kitų rūšių ar veislių naudojimas turi būti pagrįstas.

Gyvūnų paruošimas

Abi kiekvieno bandymui numatyto gyvūno akys turėtų būti patikrintos per 24 h iki bandymo pradžios. Gyvūnai, kuriems nustatomas akių dirginimas, akių defektai arba prieš tai buvęs ragenos pažeidimas, neturėtų būti naudojami.

Laikymo ir šėrimo sąlygos

Gyvūnai turėtų būti laikomi atskirai. Patalpos, kurioje laikomi bandymo triušiai, temperatūra turėtų būti 20 °C (± 3 °C). Nors santykinė oro drėgmė turėtų būti mažiausiai 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikėtų siekti, kad ji būtų 50–60 %. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, taikant 12 h šviesos ir 12 h tamsos seką. Reikėtų vengti per didelio šviesos stiprio. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, neribojant geriamojo vandens kiekio.

BANDYMO PROCEDŪRA

Vietinių anestetikų ir sisteminių analgetikų naudojimas

Rekomenduojamos šios procedūros, kad atliekant saugos akims bandymo procedūras būtų išvengta skausmo ir kančių arba jos būtų kiek įmanoma mažesnės. Jas galima pakeisti alternatyviomis procedūromis, jei būtų nustatyta, kad jos vienodai arba labiau padeda išvengti skausmo ir kančių.

— Šešiasdešimt minučių iki veikimo chemine medžiaga (TCA) pradžios daroma buprenorfino 0,01 mg/kg poodinė injekcija, kad būtų užtikrintas gydomasis sisteminio nuskausminimo lygis. Neturima duomenų arba nėra tikėtina, kad sisteminio poveikio buprenorfinas ir kiti panašūs opiatiniai analgetikai pakeistų akių atsakus (12).

— Prieš penkias minutes iki TCA į kiekvieną akį įlašinama vienas arba du lašai vietinio akių anestetiko (pvz., 0,5 % proparakaino hidrochlorido arba 0,5 % tetrakaino hidrochlorido). Siekiant išvengti galimų tyrimo trikdžių, rekomenduojamas vietinis anestetikas, kuris neturi konservantų. Kiekvieno gyvūno akis, kuri nėra apdorojama chemine medžiaga, bet apdorojama vietiniu anestetiku, naudojama kontrolei. Jei numanoma, kad cheminė medžiaga gali sukelti stiprų skausmą ir kančias, jos nereikėtų bandyti *in vivo*. Tačiau, jei yra abejonių arba bandymas yra būtinas, reikėtų svarstyti klausimą dėl papildomo vietinio anestetiko naudojimo 5 min intervalais prieš TCA. Naudotojai turėtų suvokti, kad daugkartinis vietinio anestetiko naudojimas galėtų šiek tiek padidinti chemiškai sukeltų pažeidimų rimtumą ir (arba) jų išnykimo trukmę.

— Praėjus aštuonioms valandoms po TCA, daroma buprenorfino 0,01 mg/kg ir meloksikamo 0,5 mg/kg poodinė injekcija, kad būtų užtikrintas nuolatinis gydomasis sisteminio nuskausminimo lygis. Nors nėra duomenų, kurie rodytų meloksikamo priešuždegiminį poveikį akims, kai jis suleidžiamas po oda vieną kartą per dieną, meloksikamo nereikėtų naudoti anksčiau nei 8 h po TCA, kad būtų išvengta visų galimų tyrimo trukdžių (12).

— Po pirmojo nuskausminimo, daromo praėjus 8 h po TCA, kas 12 h po oda reikėtų leisti 0,01 mg/kg buprenorfino ir kartu su juo kas 24 h – 0,5 mg/kg

▼M7

meloksikamo, kol išnyksta akių pažeidimai ir nelieka klinikinių skausmo bei kančių požymių. Galima svarstyti ilgesnės veikimo trukmės preparatų naudojimą, kurie sumažintų analgetikų dozavimo dažnumą.

— Reikėtų atlikti „pagalbinį“ nuskausminimą nedelsiant po TCA, jei prevencinio nuskausminimo analgetikais ir vietinės anestezijos nepakanka. Jei tyrimo metu matyti, kad gyvūnas patiria skausmą ir kančias, vietoj poodinės 0,01 mg/kg injekcijos kas 12 h reikėtų nedelsiant po oda suleisti 0,03 mg/kg buprenorfino „pagalbinę“ dozę ir, jei būtina, tai kartoti kas 8 h. Poodinę meloksikamo 0,5 mg/kg injekciją reikėtų atlikti kas 24 h kartu su „pagalbine“ buprenorfino doze, bet ne anksčiau kaip bent praėjus 8 h po TCA.

Bandomosios cheminės medžiagos įterpimas

Bandomoji cheminė medžiaga dedama į kiekvieno gyvūno vienos akies junginės maišelį, švelniai atitraukiant apatinį voką nuo akies obuolio. Vokai švelniai suspaudžiami maždaug vienai sekundei, kad medžiaga neištekėtų. Kita neapdorota akis naudojama kontrolei.

Drėkinimas

Įdėjus bandomosios cheminės medžiagos, bandymo gyvūno akių nereikėtų plauti mažiausiai 24 h, išskyrus kietąsias medžiagas (žr. 18 pastraipą) ir jei iš karto pasireiškia ėsdinimo arba dirginimo poveikis. Po 24 h akis galima plauti, jei manoma, kad tai reikia daryti.

Nerekomenduojama naudoti pagalbinės gyvūnų grupės plovimo įtakai tirti, išskyrus atvejus, kai tai yra moksliškai pagrįsta. Prireikus pagalbinės grupės, reikėtų naudoti du triušius. Plovimo sąlygos turėtų būti išsamiai dokumentuotos, pvz., plovimo laikas; plovimo tirpalo sudėtis ir temperatūra; plovimo trukmė, tirpalo tūris ir srautas.

Dozės dydis

(1) ***Skysčių bandymas***

Bandant skysčius, naudojama 0,1 ml dozė. Nereikėtų naudoti purškiklio cheminei medžiagai tiesiai į akį įlašinti. Prieš įlašinant 0,1 ml į akį, skystasis purškiklis išpurškiamas į indą ir surenkamas.

(2) ***Kietųjų medžiagų bandymas***

Bandant kietąsias, pastos ir dalelių pavidalo chemines medžiagas, naudojamos medžiagos tūris turėtų būti 0,1 ml arba masė – ne didesnė kaip 100 mg. Bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti sumalta į smulkias dulkes. Kietosios medžiagos tūrį reikėtų matuoti ją švelniai sutankinus, pvz., tapšnojant matavimo indą. Jei stebint pirmą kartą, praėjus 1 h po akies apdorojimo, kieta bandomoji cheminė medžiaga nepasišalino iš bandymo gyvūno akies veikiant fiziologiniams mechanizmams, akį galima praplauti fiziologiniu tirpalu arba distiliuotu vandeniu.

(3) ***Aerozolių bandymas***

Prieš įlašinant į akį rekomenduojama visas purškiamąsias medžiagas ir aerozolius iš pradžių surinkti į indą. Viena išimtis taikoma slėginiuose aerozolių purkštuvuose esančioms cheminėms medžiagoms, kurių negalima surinkti dėl garavimo. Tokiais atvejais akis laikoma atverta ir bandomoji cheminė medžiaga maždaug vieną sekundę purškiama tiesiai į akį stačiu kampu iš 10 cm atstumo. Šis atstumas gali skirtis, atsižvelgiant į purkštuvo ir jo turinio slėgį. Reikia imtis atsargumo priemonių nepažeisti akies veikiant purškimo slėgiui. Atitinkamais atvejais gali tekti įvertinti mechaninio akies pažeidimo srauto jėga tikimybę.

▼M7

Aerozolio dozės įvertį būtų galima gauti modeliuojant bandymą taip: cheminė medžiaga purškiama ant sveriamojo popieriaus pro triušio akies dydžio angą, esančia tiesiai prieš popierių. Popieriaus masės padidėjimas naudojamas apytikriam į akį įpurkšto kiekio įvertinimui. Lakiųjų cheminių medžiagų dozė gali būti įvertinta pasveriant indą su chemine medžiaga prieš įpurškimą ir po jo.

Pradinis bandymas (akies dirginimo ar ėsdinimo bandymas *in vivo* su vienu gyvūnu)

Griežtai rekomenduojama atlikti *in vivo* bandymą iš pradžių su vienu gyvūnu (žr. šio bandymo priedėlį *Nuosekliųjų bandymų strategija akių dirginimui ir ėsdinimui nustatyti*). Stebėjimai turėtų padėti nustatyti rimtumą ir grįžtamumą prieš atliekant patvirtinamąjį bandymą su antruoju gyvūnu.

Jei šio bandymo rezultatai rodo, kad taikant aprašytąją procedūrą cheminė medžiaga yra akis ėsdinanti arba stipriai jas dirginanti, kitų akies dirginimo bandymų nereikėtų atlikti.

Patvirtinamasis bandymas (*in vivo* akies dirginimo bandymas su papildomais gyvūnais)

Jei atliekant pradinį bandymą ėsdinantis poveikis nestebimas, dirginamąjį poveikį arba neigiamą atsaką reikėtų patvirtinti naudojant ne daugiau kaip du papildomus gyvūnus. Jei atliekant pradinį bandymą ėsdinantis poveikis stebimas, patvirtinamąjį bandymą rekomenduojama atlikti nuosekliuoju būdu su vienu gyvūnu, o ne veikiant abu papildomus gyvūnus vienu metu. Jei antrajam gyvūnui pasireiškia ėsdinamasis arba stiprus dirginamasis poveikis, bandymas nutraukiamas. Jei antrajam gyvūnui gautų rezultatų pakanka klasifikavimui nustatyti, kiti papildomi bandymai neatliekami.

Stebėjimo periodas

Stebėjimo laikotarpio trukmės turėtų pakakti stebimo poveikio dydžiui ir grįžtamumui visiškai įvertinti. Tačiau bandymą reikėtų baigti bet kuriuo momentu, kai tik gyvūnui pasireiškia stipraus skausmo arba kančios požymiai (8). Poveikio grįžtamumui nustatyti gyvūnai paprastai stebimi 21 parą po bandomosios cheminės medžiagos davimo. Jei grįžtamumas pastebimas anksčiau nei 21 parą, bandymas nutraukiamas tuo momentu.

Klinikiniai stebėjimai ir akių reakcijos įvertinimas balais

Reikėtų išsamiai įvertinti, ar akys pažeistos ar ne, praėjus vienai valandai po TCA, vėliau įvertinant ne rečiau kaip kasdien. Pirmąsias 3 paras gyvūnus reikėtų įvertinti kelis kartus per dieną, siekiant užtikrinti, kad sprendimai dėl nutraukimo būtų priimti laiku. Bandymo gyvūnai turėtų būti įprastiniu būdu įvertinami visą tyrimo trukmę skausmo ir (arba) kančių klinikiniams požymiams (pvz., kartotinio akies lietimo letena arba trynimo, per dažno mirkčiojimo, per didelio ašarojimo) (9) (10) (11) nustatyti ne rečiau kaip du kartus per dieną, esant ne mažesniam kaip 6 h intervalui tarp stebėjimų, arba dažniau, jei būtina. Tai yra būtina siekiant (i) tinkamai įvertinti gyvūnus dėl skausmo ir kančių požymių buvimo, kad būtų priimti pagrįsti sprendimai, ar reikia padidinti analgetikų dozes, ir (ii) įvertinti gyvūnus dėl nustatytų humaniško poveikio vertinamųjų baigčių buvimo, kad būtų galima priimti pagrįstus sprendimus, ar reikia humaniškai numarinti gyvūnus, ir užtikrinti, kad tokie sprendimai būtų priimti laiku. Paprastai reikėtų dažyti

▼M7

fluoresceinu ir naudoti biologinį mikroskopą su plyšine lempa, jei manoma, kad to reikia (pvz., žaizdos gyliui įvertinti, esant ragenos išopėjimui) kaip priemonės akių pažaidai aptikti bei išmatuoti ir įvertinti, ar pasiekti humaniško numarinimo vertinamųjų baigčių kriterijai. Galima kaupti stebimų pažeidimų skaitmenines nuotraukas, kurios būtų naudojamos palyginimui ir kaip nuolatinis akių pažaidų laipsnio registravimas. Gyvūnai turėtų būti bandomi ne ilgiau nei būtina galutinei informacijai gauti. Gyvūnai, kuriems pasireiškia stiprus skausmas arba kančia, turi būti iš karto humaniškai numarinti, o cheminė medžiaga atitinkamai įvertinta.

Turėtų būti humaniškai numarinami gyvūnai, kuriems po įlašinimo atsiranda šie pažeidimai (žr. 1 lentelę dėl pažeidimo balų aprašymo): ragenos pradūrimas arba didelės ragenos opos, įskaitant stafilomą; kraujo atsiradimas priekinėje akies kameroje; 4 balų ragenos drumstumas; šviesos reflekso nebuvimas (2 balų rainelės atsakas) ilgiau kaip 72h; junginės membranos opos; junginės arba mirksimosios membranos nekrozė, arba nekrozinio audinio lupimasis. Numarinti reikia todėl, kad tokie pažeidimai paprastai yra negrįžtami. Be to, rekomenduojama toliau nurodytus akių pažeidimus naudoti kaip humaniško poveikio vertinamąsias baigtis tyrimui užbaigti anksčiau nei 21 paros stebėjimo laikotarpiu. Sunkių dirginimo ar ėsdinimo sužeidimų ir sužeidimų, kurie, kaip manoma, nebūtų visiškai grįžtami baigiantis 21 paros stebėjimo periodui, numatomaisiais pažeidimais laikomi šie: didelis žaizdos gylis (pvz., ragenos opa išplinta giliau nei paviršiniai ragenos medžiagos sluoksniai), ragenos krašto suirimas > 50 % (rodo junginės audinio blukimas), ir stipri akių infekcija (pūlių išsiskyrimas). Ragenos paviršiaus vaskuliarizacijos (t. y. panuso), nudažyto fluoresceinu ploto nemažėjimo per kasdieniniam vertinimui nustatytą trukmę ir (arba) reepitelizacijos nebuvimo, praėjus 5 paroms nuo cheminės medžiagos įterpimo, derinys taip pat galėtų būti laikomas potencialiai naudingu kriterijumi priimant klinikinį sprendimą dėl pirmalaikio tyrimo nutraukimo. Tačiau vien tik šių duomenų nepakanka pirmalaikiam tyrimo nutraukimui pagrįsti. Nustačius stiprų poveikį akims, reikėtų pasikonsultuoti su gydančiuoju arba kvalifikuotu laboratorijos veterinaru arba su klinikinius pažeidimus nustatyti apmokytu personalu, kad būtų galima nustatyti, ar šių poveikių derinys pateisina pirmalaikį tyrimo nutraukimą. Turėtų būti gauti akių (junginės, ragenos ir rainelės) pažeidimai balais ir užrašyti praėjus 1, 24, 48 ir 72 h po bandomosios cheminės medžiagos uždėjimo (1 lentelė). Jei gyvūnų akių pažeidimų neatsiranda, bandymas gali būti baigtas ne anksčiau kaip 3 paros po įlašinimo. Gyvūnus su nedideliais pažeidimais reikėtų stebėti tol, kol tie pažeidimai pranyksta, arba 21 parą, kai tyrimas baigiamas. Stebėjimai turi būti atliekami ir registruojami ne rečiau kaip po 1 h, 24 h, 48 h, 72 h, 7 parų, 14 parų ir 21 paros, kad būtų galima nustatyti pažeidimų būseną ir jų grįžtamumą ar negrįžtamumą. Prireikus stebima dažniau, kad būtų galima nustatyti, ar bandymų gyvūną reikėtų numarinti iš humaniškų paskatų ar pašalinti iš tyrimo dėl neigiamų rezultatų.

Akių pažeidimų vertinimo balai (1 lentelė) turėtų būti užrašomi kiekvieno tikrinimo metu. Taip pat reikėtų pranešti apie visus kitus akių pažeidimus (pvz., panusą, dėmių atsiradimą, priekinės kameros pokyčius) arba neigiamą sisteminį poveikį.

Reakcijos tikrinimą galima palengvinti naudojant binokulinę lupą, rankinę plyšinę lempą, biologinį mikroskopą arba kitokį tinkamą įtaisą. Užrašius 24 h stebėjimus, akys gali būti toliau tiriamos naudojant fluoresceiną.

Akių reakcijos įvertinimas balais neišvengiamai yra subjektyvus. Siekiant labiau suderinti akių reakcijos įvertinimą balais ir padėti bandymo laboratorijoms ir visiems, kurie vykdo ir aiškina stebėjimus, juos vykdantis personalas turi būti atitinkamai išmokytas taikyti įvertinimo balais sistemą.

▼M7

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų įvertinimas

Akių dirginimo balus reikėtų įvertinti atsižvelgiant į pažeidimų tipą ir rimtumą bei į poveikio grįžtamumą arba negrįžtamumą. Atskiri balai nėra cheminės medžiagos dirginamųjų savybių absoliutusis įvertis, kadangi dar įvertinamas kitas bandomosios cheminės medžiagos poveikis. Į šiuos atskirai gautus balus reikėtų žiūrėti kaip į palyginamąsias vertes, reikšmingas tik tais atvejais, kai jas patvirtina išsamus visų kitų stebėjimų aprašymas ir įvertinimas.

Bandymo ataskaita

Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

in vivo bandymų pagrindimas: jau turimų bandymų duomenų įrodomosios vertės analizė, įskaitant nuosekliųjų bandymų strategijos taikymo rezultatus:

— ankstesnių bandymų atitinkamų duomenų aprašymas;

— duomenys, gauti kiekviename bandymų strategijos etape;

— atliktų *in vitro* bandymų aprašymas, įskaitant išsamią informaciją apie procedūras, rezultatus, gautus tiriant bandomąsias ar etalonines chemines medžiagas;

— atlikto *in vivo* odos dirginimo ar ėsdinimo tyrimo aprašymas, įskaitant gautus rezultatus;

— duomenų įrodomosios vertės analizė *in vivo* tyrimui atlikti.

Bandomoji cheminė medžiaga:

— identifikavimo duomenys (pvz., cheminis pavadinimas ir CAS numeris, jei yra, grynumas, žinomos priemaišos, kilmė, partijos numeris);

— fizikinė būsena ir fizikinės cheminės savybės (pvz., pH, lakumas, tirpumas, stabilumas, reagavimas su vandeniu),

— jei tai mišinys, reikėtų nurodyti komponentus, įskaitant sudedamųjų medžiagų identifikavimo duomenis (pvz., cheminį pavadinimą ir CAS numerį, jei yra), ir jų koncentraciją;

— naudojama dozė.

Nešiklis:

— identifikavimo duomenys, koncentracija (jei tinka), naudojamas tūris;

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas.

Bandymo gyvūnai:

— naudota rūšis ar veislė, kitų nei baltųjų triušių naudojimo pagrindimas;

— kiekvieno gyvūno amžius tyrimo pradžioje;

— kiekvienos lyties gyvūnų skaičius bandymo ir kontrolinėje (jei reikia) grupėje;

— atskirų gyvūnų masė bandymo pradžioje ir pabaigoje;

— gyvūnų kilmė, laikymo sąlygos, pašaras ir kt.

▼M7

Anestetikai ir analgetikai:

— dozės ir laikas, kuriuo buvo duodami vietiniai anestetikai ir sisteminiai analgetikai;

— jei naudojamas vietinis anestetikas, jo identifikavimo duomenys, grynumas, tipas ir galima sąveika su bandomąja chemine medžiaga.

Rezultatai:

— metodo, taikyto dirginimui kiekvienu stebėjimo momentu įvertinti balais (pvz., rankinė plyšinė lempa, biologinis mikroskopas, fluoresceinas), aprašymas;

— kiekvieno gyvūno dirginimo ar ėsdinimo atsako duomenų, gautų kiekvienu stebėjimo momentu iki gyvūno pašalinimo iš bandymo, lentelės;

— stebimo dirginimo arba ėsdinimo tipo ir laipsnio pasakojamasis aprašymas;

— visų kitų akies pažeidimų aprašymas (pvz., vaskuliarizacija, panuso susidarymas, sąaugų, dėmių atsiradimas);

— vietinių ir sisteminių su akimis nesusijusių neigiamų padarinių aprašymas, skausmo ir kančių klinikinių požymių įrašai, skaitmeninės nuotraukos ir histopatologiniai duomenys, jei yra.

Rezultatų aptarimas.

Rezultatų aiškinimas

Su laboratoriniais gyvūnais atliktų akių dirginimo tyrimų rezultatų ekstrapoliavimas žmonėms tinka tik tam tikru mastu. Daugeliu atvejų baltieji triušiai yra jautresni akis dirginančioms arba ėsdinančioms medžiagoms nei žmonės.

Aiškinant rezultatus turi būti stengiamasi neįtraukti antrinės infekcijos sukelto dirginimo.

LITERATŪRA

(1) Barratt, M.D., *et al.* (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, 410 – 429.

(2) de Silva, O., *et al.* (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, Food Chem. Toxicol 35, 159 – 164.

(3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.

(4) Young, J.R., *et al.* (1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals, Toxicol. *In Vitro*, 2, 19 – 26.

(5) Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH, J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 – 231.

(6) Fentem, J.H., *et al.* (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, Toxicology *in vitro* 12, pp.483 – 524.

(7) Šio priedo B.4 skyrius, *Ūmus toksiškumas. Odos dirginimas ar ėsdinimas*.

▼M7

(8) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

(9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, May/June, 20-36.

(10) National Research Council (NRC) (2008), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

(11) National Research Council (NRC) (2009), Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

(12) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences.

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest- TMER.htm

(13) Šio priedo B.40 skyrius, *Odos suardymas in vitro. Odos sluoksnio elektrinės varžos (OSEV) bandymas*.

(14) Šio priedo B.40bis skyrius, *Odos suardymas in vitro. Žmogaus odos modelio bandymas*.

(15) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

(16) Šio priedo B.47 skyrius *Galvijų ragenos drumstumo ir pralaidumo bandymo metodas, skirtas identifikuoti i) chemines medžiagas, sukeliančias smarkų akių pažeidimą, ir ii) chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti kaip dirginančias akis ar sukeliančias smarkų akių pažeidimą*.

(17) Šio priedo B.48 skyrius *Atskirtų viščiukų akių bandymo metodas, skirtas identifikuoti i) chemines medžiagas, sukeliančias smarkius akių pažeidimus, ir ii) chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ar smarkaus akių pažeidimo*.

(18) U.S. EPA (2003), Label Review Manual: 3rd Edition, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S., Environmental Protection Agency.

(19) UN (2011), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications.

(20) 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006. (OL L 353, 2008 12 31, p. 1).

(21) ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance.

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

1 lentelė

Akių pažeidimo vertinimo balais skalė

Ragena	Balas
Drumstumas: tankumo laipsnis (duomenys imami iš tankiausios srities) (*)	
Opėjimo arba drumstumo nėra	0
Taškinės arba pasklidosios drumstumo sritys (kitokios nei nedidelis normalaus blizgesio išblukimas); rainelės elementai aiškiai matomi	1
Lengvai įžiūrima pusskaidrė sritis; rainelės elementai šiek tiek neryškūs	2
Perlamutrinė sritis; rainelės elementai nematomi; vyzdžio dydis vos įžiūrimas	3
Ragena matinė, dėl drumstumo rainelės nesimato	4
Didžiausias įmanomas balas: 4	
Rainelė	
Normali	0
Labai pagilėjusios raukšlės, kongestija, pabrinkimas, vidutiniška junginės apie rageną hiperemija; arba paburkimas; rainelė vis dar reaguoja į šviesą (vangi reakcija laikoma poveikiu)	1
Kraujavimas, stiprus suirimas arba nėra reakcijos į šviesą	2
Didžiausias įmanomas balas: 2	
Junginė	
Raudonumas (taikoma voko ir obuolio junginei, išskyrus rageną ir rainelę)	
Normalus	0
Kai kurie kraujo indai hiperemiški (paburkę)	1
Pasklidasis, tamsiai raudonos spalvos; atskiri indai sunkiai įžiūrimi	2
Pasklidasis, jautienos raudonumo spalvos	3
Didžiausias įmanomas balas: 3	
Chemozė	
Paburkimas (taikoma vokams ir (arba) niktitacinėms membranoms)	
Normali	0
Šiek tiek didesnis nei normalus pabrinkimas	1
Akivaizdus pabrinkimas, vokai iš dalies išvirtę	2
Pabrinkimas, pusiau užmerkti vokai	3
Pabrinkimas, daugiau nei pusiau užmerkti vokai	4
Didžiausias įmanomas balas: 4	

(*) Turėtų būti nurodytas ragenos drumstumo srities plotas.

▼M7

Priedėlis

APIBRĖŽTYS

Rūgšties ar šarmo atsarga – jei preparatai rūgštiniai, natrio hidroksido/100 g preparato kiekis (g), kurio reikia nurodytai pH vertei gauti. Jei preparatai šarminiai, natrio hidroksido kiekis (g), ekvivalentiškas sieros rūgšties/100 g preparato kiekiui (g), kurio reikia nurodytai pH vertei gauti (Young *et al*. 1988).

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Nedirginančios cheminės medžiagos – medžiagos, kurios neklasifikuojamos kaip JAV aplinkos apsaugos agentūros (AAA) I, II ar III kategorijos; GHS 1, 2, 2A ar 2B kategorijos arba ES 1 ar 2 kategorijos akis dirginančios medžiagos (17) (18) (19).

Akis ėsdinančios cheminės medžiagos – a) cheminės medžiagos, kurios sukelia negrįžtamąjį akies audinio pažeidimą; b) cheminės medžiagos, kurios klasifikuojamos kaip GHS 1 kategorijos, ar AAA I kategorijos akis dirginančios medžiagos arba ES 1 kategorijos (17) (18) (19).

Akis dirginančios cheminės medžiagos – a) cheminės medžiagos, kurios sukelia grįžtamuosius akies pokyčius; b) cheminės medžiagos, kurios klasifikuojamos kaip AAA II ar III kategorijos; GHS 2, 2A ar 2B kategorijos arba ES 2 kategorijos akis dirginančios medžiagos (17) (18) (19).

Akis stipriai dirginančios medžiagos – a) cheminės medžiagos, sukeliančios akies audinių pažeidimą, kuris neišnyksta per 21 parą nuo įterpimo, arba sukeliančios smarkų fizinį regėjimo pablogėjimą; b) cheminės medžiagos, kurios klasifikuojamos kaip GHS 1 kategorijos, AAA I kategorijos arba ES 1 kategorijos akis dirginančios medžiagos (17) (18) (19).

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Nuosekliųjų bandymų metodas – pakopomis atliekamų bandymų strategija, kai tam tikra eilės tvarka nagrinėjama visa turima informacija apie bandomąją cheminę medžiagą, kiekvienoje pakopoje taikant įrodomosios vertės analizės procesą, siekiant nustatyti, ar yra pakankamai duomenų sprendimui dėl pavojingumo kategorijos priimti, prieš pereinant prie kitos pakopos. Jei bandomajai cheminei medžiagai dirginamąją gebą galima priskirti atsižvelgiant į turimą informaciją, papildomų bandymų atlikti nereikia. Jei atsižvelgiant į turimą informaciją, bandomajai cheminei medžiagai dirginamosios gebos priskirti neįmanoma, taikoma nuosekliųjų bandymų su gyvūnais procedūra tol, kol galima gauti nedviprasmį klasifikavimą.

Įrodomosios vertės analizė (procesas): Sukauptos informacijos privalumų ir trūkumų naudojimas, kad būtų galima pagrįsti išvadą, kuri, atsižvelgiant į pavienius duomenis, gali nebūti akivaizdi.

▼M7

B.5 **BANDYMŲ METODO PRIEDĖLIS** ([1])

NUOSEKLIŲJŲ BANDYMŲ STRATEGIJA AKIŲ DIRGINIMUI IR ĖSDINIMUI NUSTATYTI

Bendrieji aspektai

Siekiant gauti nuodugnių mokslinių rezultatų ir rūpinantis gyvūnų gerove, svarbu be reikalo nenaudoti gyvūnų ir kiek įmanoma mažinti visus bandymus, kurie gyvūnams gali sukelti stiprius atsakus. Visa informacija apie cheminę medžiagą dėl jos galimo ėsdinamojo ar dirginamojo poveikio odai turėtų būti įvertinta prieš sprendžiant dėl *in vivo* bandymų. Jei jau yra pakankamai duomenų galimam bandomosios cheminės medžiagos ėsdinamajam arba dirginamajam odos poveikiui klasifikuoti, su laboratoriniais gyvūnais bandymų atlikti nereikia. Taigi, taikant duomenų įrodomosios vertės analizę ir nuosekliųjų bandymų strategiją, iki minimumo sumažėja būtinybė atlikti *in vivo* bandymus, ypač jei tikėtina, kad cheminė medžiaga gali sukelti stiprias reakcijas.

Turimai informacijai apie cheminių medžiagų dirginamąjį ir ėsdinamąjį poveikį akims įvertinti rekomenduojama taikyti duomenų įrodomosios vertės analizę, kuri leistų spręsti, ar tokio poveikio galimybei apibūdinti reikia atlikti papildomus tyrimus, išskyrus *in vivo* akių tyrimus. Jei reikia papildomų tyrimų, atitinkamiems eksperimentiniams duomenims gauti, rekomenduojama taikyti nuosekliųjų bandymų strategiją. Jei nėra medžiagų bandymo duomenų jų ėsdinamajam ar dirginamajam poveikiui odai įvertinti, reikėtų taikyti nuosekliųjų bandymų strategiją. Šiame priedėlyje aprašyta pradinių bandymų strategija sukurta EBPO praktiniame seminare (1). Vėliau ji buvo patvirtinta bei išplėsta kaip integruota darnioji pavojų dėl cheminių medžiagų poveikio žmonių sveikatai ir aplinkai klasifikavimo sistema, 1998 m. lapkričio mėn. priimta 28-ame jungtiniame cheminių medžiagų komiteto ir cheminių medžiagų darbo grupės posėdyje (2) ir 2011 m. atnaujinta EBPO ekspertų grupės.

Nors ši bandymų strategija nėra sudėtinė B.5 bandymo metodo dalis, ji yra rekomenduojamas akių dirginimo ar ėsdinimo savybių nustatymo būdas. Šis būdas atitinka geriausią praktiką ir yra akių dirginimo ar ėsdinimo *in vivo* bandymų etikos etalonas. Bandymo metode pateikiamos *in vivo* bandymų rekomendacijos ir apibendrinami veiksniai, į kuriuos reikėtų atkreipti dėmesį prieš pradedant tokį bandymą. Nuosekliųjų bandymų strategijoje siūlomas duomenų įrodomosios vertės analizės būdas, kuris leistų įvertinti turimus duomenis apie bandomųjų cheminių medžiagų akių dirginimo ar ėsdinimo savybes, kad būtų galima nuosekliai gauti reikiamų duomenų apie chemines medžiagas, kurias reikia papildomai ištirti arba kurios nebuvo tirtos. Taikant strategiją iš pradžių atliekami patvirtinti ir priimti *in vitro* ar *ex vivo* bandymai ir tada TM B.4 tyrimai specifinėmis aplinkybėmis (3) (4).

Nuosekliųjų bandymų strategijos aprašymas

Siekiant nustatyti *in vivo* akių bandymų reikalingumą, prieš atliekant bandymus, kurie būtų nuosekliųjų bandymų strategijos dalis (schema), reikėtų įvertinti visą turimą informaciją. Nors reikšmingos informacijos galima būtų gauti vertinant atskirus parametrus (pvz., ribines pH vertes), turėtų būti nagrinėjama visa turima informacija. Priimant įrodomosios vertės analizės sprendimą, turėtų būti įvertinti

([1]) Jei norima taikyti akių dirginimo kompleksinių bandymų strategiją pagal REACH, žr. taip pat *ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance* http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

visi atitinkami duomenys apie konkrečios cheminės medžiagos ir jos struktūrinių analogų poveikį, ir turėtų būti pateiktas sprendimo priėmimo pagrindimas. Didžiausias dėmesys turėtų būti kreipiamas į turimus duomenis apie cheminę medžiagą, gautus tiriant žmones ir gyvūnus, o vėliau tirti *in vitro* arba *ex vivo* bandymų rezultatus. Ėsdinančiųjų medžiagų *in vivo* tyrimų reikėtų kiek įmanoma vengti. Toliau pateikiami bandymų strategijos veiksniai.

Turimų duomenų, gautų tiriant žmones ir (arba) gyvūnus, ir (arba) *in vitro* duomenų, gautų taikant patvirtintus ir tarptautiniu mastu priimtus metodus, įvertinimas (1 pakopa).

Iš pradžių nagrinėjami tiriant žmones gauti duomenys, pvz., klinikiniai arba profesinių susirgimų tyrimai ir bylų ataskaitos, ir (arba) bandymų su gyvūnais atliekant akių tyrimus duomenys, ir (arba) *in vitro* duomenys, gauti taikant patvirtintus ir tarptautiniu mastu priimtus metodus, nes jie suteikia informacijos, tiesiogiai susijusios su poveikiu akims. Toliau reikėtų įvertinti turimus odos ėsdinimo ar dirginimo duomenis, gautus atliekant tyrimus su žmonėmis ir (arba) gyvūnais, ir (arba) *in vitro* tyrimų duomenis, gautus taikant patvirtintus ir tarptautiniu mastu priimtus metodus. Cheminės medžiagos, kurios yra žinomos kaip ėsdinančios arba stipriai dirginančios akis, neturėtų būti lašinamos į gyvūnų akis, be to, nereikėtų lašinti medžiagų, kurios ėsdina arba stipriai dirgina odą; tokios cheminės medžiagos taip pat turėtų būti laikomos ėsdinančiomis ir (arba) dirginančiomis akis. Cheminės medžiagos, apie kurias iš ankstesnių akių tyrimų turima pakankamai duomenų, kad jos nėra ėsdinančios arba dirginančios, irgi neturėtų būti bandomos atliekant *in vivo* akių tyrimus.

Struktūros ir aktyvumo ryšių (SAR) analizė (2 pakopa).

Reikėtų atsižvelgti į gimininga struktūrą turinčių cheminių medžiagų bandymo rezultatus, jei tokių yra. Kai tiriant žmones ir (arba) gyvūnus gautų duomenų apie giminingos struktūros medžiagas arba tokių medžiagų mišinius pakanka norint įrodyti jų gebą ėsdinti ar dirginti akis, galima daryti prielaidą, kad bandomosios cheminės medžiagos atsakas bus toks pats. Tokiais atvejais cheminės medžiagos galbūt nebūtina bandyti. Neigiami duomenys, gauti tiriant giminingos struktūros medžiagas arba tokių medžiagų mišinius, nėra pakankamas įrodymas, kad cheminė medžiaga nėra ėsdinanti ar dirginanti pagal nuosekliųjų bandymų strategiją. Gebą ėsdinti ir dirginti odą bei akis reikėtų nustatyti taikant patvirtintus ir priimtus SAR metodus.

Fizikinės cheminės savybės ir cheminis reaktyvumas (3 pakopa).

Cheminės medžiagos, kurių pH vertės yra ribinės, pvz., $\leq$ 2,0 ar $\geq$ 11,5, gali turėti stiprų vietinį poveikį. Jei ribinė pH vertė yra pagrindinė savybė, pagal kurią cheminė medžiaga identifikuojama kaip akis ėsdinanti ar dirginanti medžiaga, galima atsižvelgti į rūgšties ar šarmo atsargą (buferinę talpą) (5)(6)(7). Jei buferinė talpa leidžia manyti, kad cheminė medžiaga gali nebūti akis ėsdinanti (t. y. ribinės pH vertės cheminės medžiagos su maža rūgšties ar šarmo atsarga), reikėtų atlikti papildomus bandymus šiai prielaidai pagrįsti, pageidautina, taikant patvirtintą ir priimtą *in vitro* ar *ex vivo* bandymą (žr. 10 pastraipą).

Kitos turimos informacijos nagrinėjimas (4 pakopa).

Šioje stadijoje įvertinama visa turima informacija apie sisteminį toksiškumą per odą. Taip pat reikėtų atsižvelgti į ūmų bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą per odą. Jei įrodyta, kad bandomoji cheminė medžiaga yra stipriai toksiška per odą, galbūt nebūtina bandyti jos poveikio akims. Nors nebūtinai turi būti

▼M7

ryšys tarp ūmaus toksiškumo per odą ir akių dirginimo ar ėsdinimo, galima daryti prielaidą, kad cheminei medžiagai esant stipriai toksiškai per odą, ji taip pat bus stipriai toksiška jos įlašinus į akis. Į tokius duomenis taip pat reikėtų atsižvelgti tarp 2 ir 3 pakopų.

Odos ėsdinimo chemine medžiaga vertinimas, jei to taip pat reikia reglamentavimo tikslais (5 pakopa).

Odos ėsdinimo ir stipraus dirginimo potencialą iš pradžių reikėtų įvertinti taikant B.4 metodą (4) ir pridedamą priedėlį (8), įskaitant patvirtintus ir tarptautiniu mastu priimtus odos ėsdinimo *in vitro* bandymo metodus (9) (10) (11). Jei įrodoma, kad cheminė medžiaga yra odą ėsdinanti ar stipriai dirginanti, ją taip pat galima laikyti akis ėsdinančia arba stipriai dirginančia medžiaga. Todėl tolesnių bandymų neprireiktų. Jei cheminė medžiaga nėra ėsdinanti arba stipriai dirginanti odą, reikėtų atlikti *in vitro* ar *ex vivo* akių bandymą.

In vitro ar *ex vivo* bandymų rezultatai (6 pakopa).

Jei atliekant patvirtintą ir tarptautiniu mastu priimtą *in vitro* ar *ex vivo* bandymą (12)(13), specialiai skirtą akių ėsdinimui ar dirginimui įvertinti, buvo įrodytos cheminių medžiagų ėsdinamosios arba stipriai dirginančios savybės, jų nereikia bandyti su gyvūnais. Galima daryti prielaidą, kad tokios cheminės medžiagos turės panašų stiprų poveikį *in vivo*. Jei patvirtintų ir priimtų *in vitro* ar *ex vivo* bandymų nėra, 5 ir 6 pakopas reikėtų praleisti ir iš karto pereiti prie 7 pakopos.

Bandymas su triušiais *in vivo* (7 ir 8 pakopos).

In vivo akių bandymą reikėtų pradėti atliekant pradinį bandymą su vienu gyvūnu. Jei šio bandymo rezultatai rodo, kad cheminė medžiaga yra stipriai dirginanti ar ėsdinanti akis, toliau bandyti nereikėtų. Jei atliekant šį bandymą ėsdinamasis ar stiprus dirginamasis poveikis nestebimas, atliekamas patvirtinamasis bandymas, naudojant du papildomus gyvūnus. Atsižvelgiant į patvirtinamojo bandymo rezultatus, gali prireikti papildomų bandymų (žr. B.5 bandymų metodą).

▼M7

AKIŲ DIRGINIMO AR ĖSDINIMO BANDYMO IR ĮVERTINIMO STRATEGIJA

	Veiksmas	Rezultatas	Išvada
1	Yra duomenys, gauti tiriant žmones ir (arba) gyvūnus, ir (arba) *in vitro* duomenys, gauti taikant patvirtintus ir tarptautiniu mastu priimtus metodus, kurie rodo poveikį akims	Sunkus akių pažeidimas	Apikalinė vertinamoji baigtis; laikyti ėsdinančia akis. Bandyti nereikia.
		Dirgina akis	Apikalinė vertinamoji baigtis; laikyti dirginančia akis. Bandyti nereikia.
		Akių neėsdina ir nedirgina	Apikalinė vertinamoji baigtis; laikoma, kad akių neėsdina ir nedirgina. Bandyti nereikia.
	Yra duomenys, gauti tiriant žmones ir (arba) gyvūnus, ir (arba) *in vitro* duomenys, gauti taikant patvirtintus ir tarptautiniu mastu priimtus metodus, kurie rodo ėsdinantį poveikį odai	Ėsdina odą	Daroma prielaida, kad ėsdina akis. Bandyti nereikia.
	Yra duomenys, gauti tiriant žmones ir (arba) gyvūnus, ir (arba) *in vitro* duomenys, gauti taikant patvirtintus ir tarptautiniu mastu priimtus metodus, kurie rodo stiprų dirginantį poveikį odai	Stipriai dirgina odą	Daroma prielaida, kad dirgina akis. Bandyti nereikia.
	↓		
	Informacijos nėra arba turima informacija neįtikinanti		
	↓		
2	Įvertinami SAR dėl akių ėsdinimo ar dirginimo	Prognozuojamas stiprus akių pažeidimas	Daroma prielaida, kad ėsdina akis. Bandyti nereikia.
		Numanomas akių dirginimas	Daroma prielaida, kad dirgina akis. Bandyti nereikia.
	Atsižvelgiama į SAR dėl odos ėsdinimo	Numanomas odos ėsdinimas	Daroma prielaida, kad ėsdina akis. Bandyti nereikia.
	↓		
	Neįmanoma pateikti prognozių arba jos neįtikinančios ar neigiamos		
	↓		
3	Matuojama pH vertė (jei tinka, buferinė talpa)	pH ≤ 2 ar ≥ 11,5 (ir didelė buferinė talpa, jei tinka)	Daroma prielaida, kad ėsdina akis. Bandyti nereikia.
	↓		
	2 < pH < 11,5 arba pH ≤ 2,0 ar ≥ 11,5 turint mažą buferinę talpą ar jos neturint, jei tinka		
	↓		
4	Atsižvelgiama į turimus sisteminio toksiškumo, veikiant per odą, duomenis	Labai toksiška, esant koncentracijai, kuri būtų bandant akyje.	Cheminė medžiaga būtų per daug toksiška, kad būtų galima bandyti. Bandyti nereikia.

▼M7

	Veiksmas	Rezultatas	Išvada
	↓		
	Tokios informacijos nėra arba cheminė medžiaga nėra labai toksiška		
	↓		
5	Bandant įvertinama odos ėsdinimo geba pagal šio priedo B.4 skyriaus bandymų strategiją, jei to taip pat reikia reglamentavimo tikslais	Ėsdina arba stipriai dirgina	Daroma prielaida, kad dirgina akis. Daugiau bandyti nereikia
	↓		
	Cheminė medžiaga odos neėsdina arba stipriai nedirgina		
	↓		
6	Atliekamas (-i) patvirtintas (-i) ir priimtas (-i) *in vitro* ar *ex vivo* akių bandymas (-ai)	Ėsdina ar stipriai dirgina	Daroma prielaida, kad ėsdina arba stipriai dirgina akis, jei atliekamą bandymą galima taikyti ėsdinančioms ar stipriai dirginančioms cheminėms medžiagoms identifikuoti, o cheminė medžiaga patenka į bandymo taikymo sritį. Daugiau bandyti nereikia
		Dirgina	Daroma prielaida, kad dirgina akis, jei atliekamą (-us) bandymą (-us) galima taikyti ėsdinančioms, stipriai dirginančioms ir dirginančioms medžiagoms tinkamai identifikuoti, o cheminė medžiaga patenka į bandymo (-ų) taikymo sritį. Daugiau bandyti nereikia
		Nedirgina	Daroma prielaida, kad nedirgina akių, jei atliekamą (-us) bandymą (-us) galima taikyti nedirginančioms cheminėms medžiagoms tinkamai identifikuoti, tinkamai atskirti nuo akis dirginančių, stipriai dirginančių ar ėsdinančių cheminių medžiagų, o cheminė medžiaga patenka į bandymo taikymo sritį. Daugiau bandyti nereikia
	↓		
	Patvirtinto (-ų) ir priimto (-ų) in vitro ar ex vivo akių bandymo (-ų) negalima taikyti išvadai padaryti		
	↓		

▼M7

	Veiksmas	Rezultatas	Išvada
7	Atliekamas pradinis *in vivo* triušio akių bandymas, naudojant vieną gyvūną	Sunkus akių pažeidimas	Laikoma, kad ėsdina akis. Daugiau bandyti nereikia
	↓		
	Nėra stipraus pažeidimo arba jokio atsako		
	↓		
8	Atliekamas patvirtinamasis bandymas, naudojant vieną arba du papildomus gyvūnus	Ėsdina ar dirgina	Laikoma, kad ėsdina ar dirgina akis. Daugiau bandyti nereikia.
		Neėsdina ar nedirgina	Laikoma, kad akių neėsdina ir nedirgina. Daugiau bandyti nereikia

LITERATŪRA

(1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 – 24 January 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.

(4) Šio priedo B.4 skyrius *Ūmus toksiškumas. Odos dirginimas ar ėsdinimas*.

(5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19 – 26.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *in vitro* 12, pp.483 – 524.

(7) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 – 231.

(8) Šio priedo B.4 skyriaus priedėlis. *Nuosekliųjų bandymų strategija odos dirginimui ir ėsdinimui nustatyti*.

(9) Šio priedo B.40 skyrius. *Odos suardymas in vitro. Odos sluoksnio elektrinės varžos (OSEV) bandymas*.

(10) Šio priedo B.40bis skyrius. Odos ėsdinimas *in vitro*. Žmogaus odos modelio bandymas.

(11) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

▼**M7**

(12) Šio priedo B.47 skyrius. *Galvijų ragenos drumstumo ir pralaidumo bandymo metodas, skirtas identifikuoti i) chemines medžiagas, sukeliančias smarkų akių pažeidimą, ir ii) chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti kaip dirginančias akis ar sukeliančias smarkų akių pažeidimą*.

(13) OECD (2009b), Šio priedo B.48 skyrius. *Atskirtų viščiukų akių bandymo metodas, skirtas identifikuoti i) chemines medžiagas, sukeliančias smarkius akių pažeidimus, ir ii) chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ar smarkaus akių pažeidimo*.

▼C1

B.6. **ODOS JAUTRINIMAS**

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Pastabos

Bandymų tikslumas ir gebėjimas jais aptikti potencialius žmogaus odos alergenus laikomi svarbiais klasifikuojant visuomenės sveikatai reikšmingą toksiškumą.

Nėra vieno bandymų metodo, kuriuo būtų galima tinkamai nustatyti visas odą jautrinti galinčias medžiagas ir kuris tiktų visoms medžiagoms tirti.

Pasirenkant bandymą, reikia atsižvelgti į medžiagos fizikines savybes, įskaitant jos gebėjimą prasiskverbti per odą.

Naudojant jūrų kiaulytes sukurti dviejų tipų bandymai: adjuvantiniai bandymai, kuriais alerginės reakcijos sustiprinamos bandomąją medžiagą ištirpinant (ar padarant suspensiją) Freundo pilname adjuvante (FPA), ir neadjuvantiniai bandymai.

Tikėtina, kad adjuvantiniais bandymais tiksliau nustatomos žmogaus odą jautrinti galinčios medžiagos negu tais bandymais, kuriems nenaudojamas Freundo pilnas adjuvantas. Todėl šiems bandymams teikiama pirmenybė.

Jūrų kiaulytės maksimizacijos bandymas (JKMB) yra plačiai naudojamas adjuvantinis bandymas. Nors medžiagos gebėjimui sukelti odos jautrinimo reakciją nustatyti gali būti naudojami ir kiti metodai, JKMB laikomas tinkamiausiu adjuvantiniu bandymu.

Manoma, kad neadjuvantiniai bandymai (plačiausiai naudojamas *Buehlerio* bandymas) daugelio medžiagų klasių atžvilgiu yra mažiau tikslus.

Kartais gali būti svarių priežasčių rinktis *Buehlerio* bandymo metodą, pagal kurį naudojamos antodinės aplikacijos, o ne įodinės injekcijos, kaip yra jūrų kiaulytės maksimizacijos bandymo atveju. Jei naudojamas *Buehlerio* bandymas, tai reikėtų moksliškai pagrįsti.

Šiame metode aprašyti jūrų kiaulytės maksimizacijos bandymas (JKMB) ir *Buehlerio* bandymas. Moksliškai pagrindus, galima naudoti ir kitus standartizuotus metodus.

Jei atlikus pripažintą atrankos bandymą gaunamas teigiamas rezultatas, bandomoji medžiaga gali būti apibūdinama kaip potencialus alergenas, ir tolesnio jūrų kiaulytės bandymo gali nereikėti. Tačiau jei atlikus tokį bandymą gaunamas neigiamas rezultatas, turi būti atliktas jūrų kiaulytės bandymas, remiantis šiame metode aprašyta procedūra.

Taip pat žiūrėkite Bendrojo įvado B dalį.

▼C1

1.2. APIBRĖŽTYS

Odos jautrinimas (alerginis kontaktinis dermatitas) – imuninės kilmės odos reakcija į medžiagą. Žmonėms atsakas gali pasireikšti odos niežėjimu, eritema, edema spuogeliais, pūslėmis, pūslelėmis ar jų deriniu. Gyvūnų odos reakcijos gali skirtis ir gali pasireikšti tik paraudimu ir patinimu.

Indukcinis poveikis – eksperimentinis organizmo veikimas bandomąja medžiaga, siekiant sukelti organizmo padidėjusio jautrumo būklę.

Indukcinis laikotarpis – bent vienos savaitės laikotarpis po indukcinio poveikio, kurio metu gali išsivystyti organizmo padidėjusio jautrumo būklė.

Provokacinis poveikis – pakartotinis organizmo veikimas bandomąja medžiaga po indukcinio laikotarpio, siekiant nustatyti, ar organizmo reakcija yra jautresnė.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Bandymams naudojamos įrangos jautrumas ir patikimumas turi būti įvertinamas kas šešis mėnesius naudojant žinomas medžiagas, sukeliančias silpną arba vidutinio stiprumo odos jautrinimo poveikį.

Tinkamai atlikus bandymą su silpna arba vidutinio stiprumo jautrinančia medžiaga (sensibilizatoriumi), reikėtų tikėtis, kad reakcija pasireikš bent 30 % gyvūnų adjuvantinio bandymo atveju ir bent 15 % gyvūnų neadjuvantinio bandymo atveju.

Pirmenybė teikiama šioms medžiagoms:

CAS Nr.	Einecs Nr.	Einecs pavadinimas	Įprastas pavadinimas
101–86–0	202–983–3	cinamono rūgšties heksialdehidas	cinamono rūgšties heksialdehidas
149–30–4	205–736–8	benztiazol-2-tiolis (2-merkaptobenztiazolas)	kaptaksas
94–09–7	202–303–5	benzokainas	norkainas

Gali būti aplinkybių, kai tinkamai pagrindus galima naudoti kitas kontrolines medžiagas.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Iš pradžių bandomieji gyvūnai paveikiami bandomosios medžiagos įodinėmis injekcijomis ir (arba) antodinėmis aplikacijomis (indukcinis poveikis). Praėjus 10–14 dienų poilsio laikotarpiui (indukciniam laikotarpiui), kurio metu gali pasireikšti imuninis atsakas, gyvūnai paveikiami provokacine doze. Bandomųjų gyvūnų odos reakcijos į provokacinį poveikį apimtis ir laipsnis yra lyginami su kontrolinių gyvūnų, kurie patyrė imitacinį (nejautrinančios medžiagos) indukcijos ir provokacijos veikimą.

1.5. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Jeigu bandomąją medžiagą būtina nuplauti, reikia naudoti vandenį ar tinkamą tirpiklį, kad nepakistų gauta reakcija ar nebūtų pažeistas odos vientisumas.

▼C1

1.5.1. **Jūrų kiaulytės maksimizacijos bandymas (JKMB)**

1.5.1.1. *Pasiruošimas*

Sveikos jaunos suaugusios baltosios (albinosės) jūrų kiaulytės mažiausiai 5 dienas prieš bandymą aklimatizuojamos laboratorijos sąlygomis. Gyvūnai prieš bandymą atsitiktinės atrankos būdu paskirstomi į bandymo grupes. Kailis gali būti pašalinamas žirklėmis, nuskutant ar chemine depiliacija, atsižvelgiant į bandymo metodą. Reikia stengtis nesubraižyti odos. Gyvūnai pasveriami prieš bandymo pradžią ir jo pabaigoje.

1.5.1.2. *Bandymo sąlygos*

1.5.1.2.1. Bandomieji gyvūnai

Naudojamos įprastinės laboratorinės baltųjų jūrų kiaulyčių veislės.

1.5.1.2.2. Skaičius ir lytis

Gali būti naudojami patinai ir (arba) patelės. Patelės turi būti neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos.

Bandomojoje grupėje turi būti mažiausiai 10 gyvūnų, o kontrolinėje mažiausiai 5. Jeigu ištirta mažiau negu 20 bandomųjų ir 10 kontrolinių jūrų kiaulyčių ir neįmanoma nustatyti, ar bandomoji medžiaga yra odą jautrinanti medžiaga, primygtinai rekomenduojama ištirti daugiau gyvūnų, kad iš viso susidarytų 20 bandomųjų ir 10 kontrolinių gyvūnų.

1.5.1.2.3. Dozės

Kiekvienam indukciniam poveikiui sukelti naudojama gerai organizmo toleruojama didžiausia bandomosios medžiagos koncentracija, sukelianti nuo silpno iki vidutinio stiprumo odos sudirginimą. Provokaciniam poveikiui naudojama didžiausia odos nedirginanti bandomosios medžiagos koncentracija. Jeigu būtina, tinkamos koncentracijos nustatomos atliekant parengtinį bandymą su dviem ar trim gyvūnais, jei nėra kitos informacijos. Šiam tikslui galima būtų panaudoti ir FPA paveiktus gyvūnus.

1.5.1.3. *Bandymo eiga*

1.5.1.3.1. Indukcija

0 diena – bandomoji grupė

Menčių srityje, nuo kurios pašalintas kailis, atliekamos 0,1 ml tūrio trys poros įodinių injekcijų taip, kad kiekvienos poros viena injekcija būtų kitoje nugaros vidurio pusėje.

1 injekcija: FPA/vandens ar fiziologinio tirpalo mišinys santykiu 1:1 (v/v)

2 injekcija: bandomosios medžiagos, ištirpintos tinkamame tirpiklyje, pasirinkta koncentracija

3 injekcija: bandomosios medžiagos pasirinkta koncentracija, pagaminta panaudojant mišinį FPA/vanduo ar fiziologinis tirpalas santykiu 1:1 (v/v).

Ruošiant 3 injekciją, vandenyje tirpios medžiagos tirpinamos vandenyje, po to maišomos su FPA. Kai medžiagos tirpios riebaluose ir netirpios, pirmiausia padaroma suspensija su FPA, po to įpilama vandens. Bandomosios medžiagos galutinė koncentracija turi būti tokia pati, kaip ir antrojoje injekcijoje.

▼C1

1 ir 2 injekcijos suleidžiamos arčiau galvos viena šalia kitos, tuo tarpu 3 injekcija suleidžiama arčiau uodegos esančiame bandomajame plote.

0 diena – kontrolinė grupė

Tose pat vietose kaip ir bandomiesiems gyvūnams atliekamos 0,1 ml tūrio trys poros įodinių injekcijų.

1 injekcija: FPA/vandens ar fiziologinio tirpalo mišinys santykiu 1:1 (v/v)

2 injekcija: neskiestas nešiklis

3 injekcija: nešiklio 50 % tirpalas (v/v), pagamintas panaudojant mišinį – FPA/vanduo ar fiziologinis tirpalas santykiu 1:1 (v/v).

5–7 diena – bandomoji ir kontrolinės grupės

Jeigu bandomoji medžiaga nedirgina odos, apytikriai 24 valandas prieš antodines indukcines aplikacijas, nuo tų bandomųjų odos plotelių nukirpus ir (ar) nuskutus kailį, tepamas 0,5 ml 10 % natrio laurilo sulfato tirpalas vazeline (siekiant sukelti vietinį dirginimą).

6–8 diena – bandomoji grupė

Nuo bandomojo ploto vėl pašalinamas kailis. Filtravimo popierius (2 × 4 cm) sudrėkinamas bandomojoje medžiagoje, ištirpintoje tinkamame nešiklyje, uždedamas ant bandomojo ploto ir fiksuojamas okliuzine (nepralaidžia) tvarstomąja medžiaga 48 valandoms. Nešiklio pasirinkimą reikia pagrįsti. Kietosios medžiagos yra susmulkinamos į miltelius ir išmaišomos nešiklyje. Skysčiai gali būti naudojami neskiesti, jei tinkama.

6–8 diena – kontrolinė grupė

Nuo bandomojo ploto vėl pašalinamas kailis. Viskas atliekama tai pat kaip ir bandomojoje grupėje, vietoj bandomosios medžiagos naudojant nešiklį; vėliau viskas fiksuojama okliuzine (nepralaidžia) tvarstomąja medžiaga 48 valandoms.

1.5.1.3.2. Provokacija

20–22 diena – bandomoji ir kontrolinė grupės

Nuo bandomųjų ir kontrolinių gyvūnų šonų pašalinamas kailis. Bandomąja medžiaga sudrėkintas tamponas arba gaubtelis, uždedamas ant vieno gyvūnų šono. Jeigu reikia, ant kito šono uždedamas nešikliu sudrėkintas tamponas. Tamponas arba gaubtelis fiksuojami nepralaidžiu tvarsčiu 24 valandoms.

1.5.1.3.3. Stebėjimas ir vertinimas: bandomoji ir kontrolinė grupės

— praėjus maždaug 21 valandai po tampono nuėmimo, provokacinis plotas nuvalomas, trumpai nukerpamas ir (arba) nuskutamas, o jeigu būtina, depiliuojamas,

— maždaug po 3 valandų (praėjus maždaug 48 valandoms nuo provokacijos pradžios) apžiūrima odos reakcija ir įvertinama balais taip, kaip paaiškinta priedėlyje,

— praėjus maždaug 24 valandoms po šio apžiūrėjimo, odos reakcija apžiūrima antrą kartą (72 valandos) ir dar kartą įvertinama balais.

Skatinama apžiūrėti bandomuosius ir kontrolinius gyvūnus aklos atrankos būdu.

Jeigu reikia išsiaiškinti per pirmąją provokaciją pastebėtus rezultatus, praėjus maždaug vienai savaitei svarstytinas antros provokacijos (t. y. reprovokacija) atlikimas, jei reikia, su nauja kontroline grupe. Reprovokaciją taip pat galima atlikti su pradine kontroline grupe.

▼C1

Dėl indukcinių ir provokacinių procedūrų kilusios visos odos ir bet kokios neįprastos, taip pat ir somatinės, reakcijos stebimos ir įvertinamos pagal Magnussono/Kligmano skalę (žr. priedėlį). Kitos procedūros, pvz., histopatologinis tyrimas, odos raukšlės storio matavimas, gali būti atliekamos siekiant išsiaiškinti neaiškias reakcijas.

1.5.2. **Buehlerio bandymas**

1.5.2.1. *Pasiruošimas*

Sveikos jaunos suaugusios baltosios (albinosės) jūrų kiaulytės mažiausiai 5 dienas prieš bandymą aklimatizuojamos laboratorijos sąlygomis. Gyvūnai prieš bandymą atsitiktinės atrankos būdu paskirstomi į bandymo grupes. Kailis gali būti pašalinamas žirklėmis, nuskutant ar chemine depiliacija, atsižvelgiant į bandymo metodą. Reikia stengtis nesubraižyti odos. Gyvūnai pasveriami prieš bandymo pradžią ir jo pabaigoje.

1.5.2.2. *Bandymo sąlygos*

1.5.2.2.1. Bandomieji gyvūnai

Naudojamos įprastinės laboratorinės baltųjų jūrų kiaulyčių veislės.

1.5.2.2.2. Skaičius ir lytis

Gali būti naudojami patinai ir (arba) patelės. Patelės turi būti neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos.

Mažiausiai 20 gyvūnų naudojama bandomojoje ir mažiausiai 10 gyvūnų kontrolinėje grupėse.

1.5.2.2.3. Dozės

Kiekvienam indukciniam poveikiui naudojama didžiausia bandomosios medžiagos koncentracija, sukelianti silpną ne pernelyg didelį odos sudirginimą. Provokaciniam poveikiui naudojama didžiausia odos nedirginanti bandomosios medžiagos koncentracija. Jeigu būtina, tinkamos koncentracijos nustatomos atliekant parengtinį bandymą su dviem ar trim gyvūnais.

Vandenyje tirpioms bandomosioms medžiagoms kaip nešiklis naudojamas vanduo ar atskiesta nedirginanti aktyvioji paviršiaus medžiaga. Kitoms bandomosioms medžiagoms kaip nešiklis indukcijos etape naudojamas 80 % etanolis/vanduo, o provokacijos etape – acetonas.

1.5.2.3. *Bandymo eiga*

1.5.2.3.1. Indukcija

0 diena – bandomoji grupė

Nuo vieno gyvūno šono pašalinamas kailis (trumpai nukerpamas). Bandymui naudojamas tamponas turi būti prisigėręs bandomosios medžiagos, ištirpintos tinkamame nešiklyje (nešiklio pasirinkimą reikia pagrįsti; skystos bandomosios medžiagos gali būti neskiedžiamos, jei tinkama).

Bandymui naudojamas tamponas (kompresas) pridedamas prie odos ir 6 h nepralaidžiu tvarsčiu arba gaubteliu ir tinkama tvarstomąja medžiaga laikomas taip, kad liestųsi su oda.

▼C1

Bandymui naudojamas tamponas turi būti nepralaidus. Tinka maždaug 4–6 cm^2 vatos diskelis ar kvadratėlis. Siekiant užtikrinti okliuziją, gyvūno judesius geriausia apriboti tinkamomis priemonėmis. Jei gyvūnas subintuojamas, gali tekti jį paveikti bandomąja medžiaga papildomai.

0 diena – kontrolinė grupė

Nuo vieno gyvūno šono pašalinamas kailis (trumpai nukerpamas). Viskas atliekama tai pat kaip ir bandomojoje grupėje, vietoj bandomosios medžiagos naudojant tik nešiklį. Bandymui naudojamas tamponas arba gaubtelis fiksuojamas tinkama tvarstomąja medžiaga 6 valandoms. Jeigu įrodoma, kad imitacinė kontrolinė grupė nebūtina, gali būti naudojama paprasta kontrolinė grupė.

6–8 ir 13–15 diena – bandomoji ir kontrolinė grupės

6–8 ir 13–15 dienomis ant to paties šono bandomojo ploto (jei būtina, pašalinus kailį) atliekamos tokios pačios pakartotinės aplikacijos kaip ir 0 dieną.

1.5.2.3.2. Provokacija

27–29 diena – bandomoji ir kontrolinė grupės

Nuo netirto bandomųjų ir kontrolinių gyvūnų šono pašalinamas kailis (trumpai nukerpamas). Ant bandomųjų ir kontrolinių gyvūnų netirto šono užpakalinės dalies dedamas nepralaidus tamponas arba gaubtelis su reikiamu kiekiu bandomosios medžiagos (didžiausios nedirginančios koncentracijos).

Kada reikia, ant bandomųjų ir kontrolinių gyvūnų netirto šono priekinės dalies taip pat dedamas nepralaidus tamponas arba gaubtelis, prisigėręs tik nešiklio. Viskas fiksuojama tinkama tvarstomąja medžiaga 6 valandoms.

1.5.2.3.3. Stebėjimas ir vertinimas

— praėjus maždaug 21 valandai po tvarsčio nuėmimo, nuo provokacinio ploto pašalinamas kailis,

— maždaug po 3 valandų (praėjus maždaug 30 valandų nuo provokacijos pradžios) apžiūrima odos reakcija ir įvertinama balais taip, kaip paaiškinta priedėlyje,

— praėjus maždaug 24 valandoms po 30 valandų apžiūrėjimo (maždaug 54 valandoms po provokacinio tampono uždėjimo), odos reakcija apžiūrima antrą kartą ir įvertinama balais.

Skatinama apžiūrėti bandomuosius ir kontrolinius gyvūnus aklos atrankos būdu.

Jeigu reikia išsiaiškinti per pirmąją provokaciją pastebėtus rezultatus, praėjus maždaug vienai savaitei svarstomas antros provokacijos (t. y. reprovokacijos) atlikimas, jei reikia, su nauja kontroline grupe. Reprovokaciją taip pat galima atlikti su pradine kontroline grupe.

▼C1

Dėl indukcinių ir provokacinių procedūrų kilusios visos odos ir bet kokios neįprastos, taip pat ir somatinės, reakcijos stebimos ir įvertinamos pagal Magnussono/Kligmano skalę (žr. priedėlį). Kitos procedūros, pvz., histopatologinis tyrimas, odos raukšlės storio matavimas, gali būti atliekamos siekiant išsiaiškinti neaiškias reakcijas.

2. **DUOMENYS (JKMB ir Buehlerio bandymo)**

Duomenys turi būti suvesti į lentelę, kurioje nurodoma kiekvieno gyvūno odos reakcija nustatyta per kiekvieną apžiūrą.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS (JKMB ir Buehlerio bandymo)**

Jeigu prieš bandymą su jūrų kiaulytėmis buvo atliktas atrankos bandymas, jo aprašymas arba nuoroda (pvz., vietinio limfinio mazgo bandymas, pelės ausies patinimo bandymas (angl. MEST)), įskaitant išsamią informaciją apie procedūrą, turi būti pateikiami kartu su gautais rezultatais apie bandomąsias ir kontrolines medžiagas.

Bandymo ataskaita (JKMB ir Buehlerio)

Bandymo ataskaitoje, jei įmanoma, turėtų būti pateikiama ši informacija.

Bandomieji gyvūnai:

— naudotos jūrų kiaulyčių veislės,

— gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,

— gyvūnų šaltinis, laikymo sąlygos, pašarai ir kt.,

— kiekvieno gyvūno kūno masė bandymo pradžioje.

Bandymo sąlygos:

— veikiamo plotelio paruošimo būdas,

— informacija apie tamponui naudotą medžiagą ir tvirtinimo būdą,

— parengtinio bandymo rezultatai su išvada apie indukcijai ir provokacijai naudotinas koncentracijas,

— informacija apie bandomosios medžiagos paruošimą, aplikaciją ir nuėmimą,

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas,

— nešiklio ir bandomosios medžiagos koncentracijos, naudotos indukciniam ir provokaciniam poveikiui sukelti, taip pat bendras indukcijai ir provokacijai sunaudotas medžiagos kiekis.

Rezultatai:

— rezultatų suvestinė su paskutiniu įrangos jautrumo ir patikimumo patikrinimu (žr. 1.3), be to, informacija apie panaudotą medžiagą, koncentraciją ir nešiklį,

▼C1

— kiekvieno gyvūno įvertinimas balais kartu su vertinimo sistema,

— pastebėto poveikio pobūdžio ir laipsnio pasakojamasis aprašymas,

— histopatologiniai duomenys.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

4. **NUORODOS**

Šis metodas atitinka OECD TG 406.

▼C1

Priedėlis

LENTELĖ

Magnussono/Kligmano skalė reakcijai į provokacinį mėginį įvertinti

0 = nėra matomų pakitimų

1 = ribotas arba nevienodo intensyvumo paraudimas

2 = vidutinis ir susiliejantis paraudimas

3 = intensyvus paraudimas ir patinimas

▼M4

B.7. 28 DIENŲ GRAUŽIKŲ KARTOTINĖS DOZĖS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka OECD „Test Guideline“ 407 (OECD bandymo gairės Nr. 407) (2008). Originalios bandymo gairės „Test Guideline“ 407 priimtos 1981 m. Siekiant gauti papildomos informacijos remiantis per tyrimą naudotais gyvūnais, pirmiausia informacijos apie neurotoksiškumą ir imunotoksiškumą, 1995 m. priimta atnaujinta versija.

2. 1998 m. OECD ėmėsi prioritetinės veiklos, skirtos atnaujinti esamas bandymų gaires ir parengti naujas bandymų gaires, pagal kurias būtų atrenkamos ir bandomos medžiagos, galinčios pakenkti endokrininei sistemai (8). Viena iš veiklos krypčių buvo esamų OECD gairių, susijusių su „28 dienų kartotinės dozės toksiškumo per virškinamąjį traktą graužikams tyrimu“ (TG 407), atnaujinimas įtraukiant parametrus, tinkamus nustatyti bandomųjų cheminių medžiagų poveikį endokrininei sistemai. Rengiant šią procedūrą įgyvendinta plati tarptautinė programa, skirta patikrinti papildomų parametrų reikšmę ir praktinį naudingumą, jų veiksmingumą cheminėms medžiagoms, turinčioms (anti)estrogeninio, (anti)androgeninio ir (anti)tiroidinio poveikio, atkuriamumo vienoje laboratorijoje ir įvairiose laboratorijose galimybes ir naujųjų parametrų nesuderinamumą su parametrais, kurie buvo privalomi prieš priimant TG 407. Pagal šią programą gauti gausūs duomenys buvo surinkti ir įvertinti išsamioje OECD ataskaitoje (9). Šis atnaujintasis B.7 metodas (lygiavertis TG 407) yra įgyvendinant šią tarptautinę bandymų programą įgytos patirties ir gautų rezultatų išdava. Šis bandymo metodas suteikia galimybę tam tikrus per endokrininę sistemą daromus poveikius susieti su kitais toksikologiniais poveikiais.

PIRMINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

3. Vertinant ir nustatant cheminių medžiagų toksiškumo charakteristikas, kartotinės dozės toksiškumas per virškinamąjį traktą gali būti nustatomas po to, kai ūmaus toksiškumo bandymais gaunama pradinės informacijos. Šis bandymo metodas skirtas nustatyti poveikį, atsižvelgiant į labai didelę galimo toksinio poveikio objektų įvairovę. Taikant šį metodą gaunama informacijos apie galimus pavojus sveikatai, kurie gali grėsti dėl gana trumpą laiką trunkančio kartotinio poveikio, įskaitant poveikį nervų, imuninei ir endokrininei sistemoms. Atsižvelgiant šias konkrečias pasekmes, taikant šį metodą turėtų būti nustatytos cheminės medžiagos, galinčios turėti neurotoksinio poveikio, dėl kurio gali reikėti atlikti nuodugnesnius šio aspekto tyrimus, ir cheminės medžiagos, kenksmingos skydliaukės fiziologijai. Be to, šiuo metodu galima gauti duomenų apie chemines medžiagas, kurios kenkia jaunų, bet suaugusių patinų ir (arba) patelių lytiniams organams, ir pastebėti poveikio imuninei sistemai požymių.

4. Šio (B.7) bandymo metodo rezultatai turėtų būti naudojami pavojų nustatymo ir rizikos vertinimo tikslais. Rezultatai, gauti pagal endokrininei sistemai taikomus parametrus, turėtų būti vertinami atsižvelgiant į OECD konceptualią endokrininei sistemai kenksmingų cheminių medžiagų bandymų ir vertinimo sistemą (11). Šis metodas sudarytas iš pamatinio kartotinės dozės toksiškumo tyrimo, kuris gali būti taikomas cheminėms medžiagoms, dėl kurių nebūtina atlikti 90 dienų tyrimo (pvz., kai gamybos apimtis neviršija tam tikrų ribų), arba kaip išankstinis tyrimas prieš ilgalaikį tyrimą. Stebėjimų laikotarpio trukmė turėtų būti 28 dienos.

▼M4

5. Tarptautinė programa, įgyvendinta siekiant patvirtinti parametrus, kurie būtų tinkami nustatyti galimą bandomosios cheminės medžiagos poveikį endokrininei sistemai, parodė, kad pagal šį (B.7) bandymo metodą gaunamų duomenų kokybė labai priklauso nuo bandymų laboratorijos patirties. Tai pirmiausia taikytina histopatologiniam ciklinių patelės lytinių organų pakitimų tyrimui ir mažų, nuo hormonų priklausomų organų, kuriuos sudėtinga skrosti, masės nustatymui. Parengtos histopatologinių tyrimų gairės (19). Jos skelbiamos OECD viešojoje svetainėje, skirtoje bandymų gairėms. Jos skirtos padėti patologams atlikti tyrimus ir užtikrinti didesnį analizės tikslumą. Nustatyta, kad toksiškumą endokrininei sistemai rodo labai įvairūs parametrai; šie parametrai įtraukti į šį bandymo metodą. Parametrai, dėl kurių negauta pakankamai duomenų, kad būtų galima įrodyti jų naudingumą, arba dėl kurių per patvirtinimo programą gauta silpnų įrodymų, kad jie gali padėti nustatyti endokrininei sistemai kenksmingas medžiagas, siūlomi naudoti kaip neprivalomos pasekmės (žr. 2 priedėlį).

6. Remiantis per patvirtinimo procesą gautais duomenimis, būtina pabrėžti, kad šios analizės tikslumas nėra pakankamas, kad būtų galima nustatyti visas chemines medžiagas, kurių veikimo būdas yra (anti)androgeninis arba (anti)-estrogeninis (9). Šis bandymo metodas netaikomas tam gyvenimo etapui, kuriuo endokrininė sistema yra pažeidžiamiausia. Visgi patvirtinimo proceso metu taikant šį bandymo metodą nustatyta cheminių medžiagų, kurios daugiau ar mažiau kenkia skydliaukės funkcijai, ir cheminių medžiagų, stipriai ir vidutiniškai stipriai veikiančių skydliaukę per estrogeninius arba androgeninius receptorius, tačiau dažniausiai nepavykdavo nustatyti endokrininę sistemą veikiančių cheminių medžiagų, kurios silpnai veikia estrogeninius arba androgeninius receptorius. Taigi jo negalima apibūdinti kaip atrankinės analizės, skirtos nustatyti poveikį endokrininei sistemai.

7. Todėl, nesant su šiais veikimo būdais susijusio poveikio, negalima teigti, kad nesukeliama poveikio endokrininei sistemai. Nagrinėjant per endokrininę sistemą daromus poveikius, cheminės medžiagos savybių apibūdinimas neturėtų būti grindžiamas vien tik šio bandymo metodo taikymo rezultatais, bet jis turėtų būti naudojamas taikant įrodomosios duomenų galios metodą, apimantį visus turimus cheminės medžiagos duomenis, skirtus apibūdinti galimą poveikį endokrininei sistemai. Dėl šios priežasties reglamentavimo tikslais priimami sprendimai dėl poveikio endokrininei sistemai (cheminės medžiagos savybių apibūdinimas) turėtų būti grindžiami platesnio metodo taikymu, o ne tik šio bandymo metodo taikymo rezultatais.

8. Pripažinta, kad visos gyvūnų naudojimu pagrįstos procedūros atitiks vietinius gyvūnų priežiūros reikalavimus; toliau išdėstyti priežiūros ir poveikio aprašymai yra minimalūs veiklos reikalavimai, kurie bus pakeičiami vietos teisės aktais, jeigu šie bus griežtesni. Daugiau rekomendacijų dėl humaniško elgesio su gyvūnais pateikia OECD (14).

9. Vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

10. Bandomoji cheminė medžiaga per burną 28 dienas kasdien skirtingomis dozėmis duodama kelioms bandomųjų gyvūnų grupėms – po vieno dydžio dozę vienai grupei. Kiekvieną dozės davimo laikotarpio dieną gyvūnai atidžiai stebimi toksiškumo požymiams nustatyti. Bandymo metu nugaišę arba numarinti gyvūnai skrodžiami, o baigus bandymą numarinami ir skrodžiami išgyvenę gyvūnai. Atliekant 28 dienų tyrimą gaunama informacijos

▼M4

apie kartotinės oralinės dozės poveikį, iš kurio gali būti matoma, ar reikia atlikti tolesnius ilgalaikius tyrimus. Be to, taip gali būti gauta informacijos dėl koncentracijų parinkimo ilgalaikiams tyrimams. Remiantis šiuo bandymo metodu gautais duomenimis turėtų būti galima apibūdinti cheminės medžiagos toksiškumą, nustatyti dozės ir reakcijos tarpusavio priklausomybę ir apibrėžti nepastebimo neigiamo poveikio lygį (NNPL).

METODO APRAŠYMAS

Gyvūnų rūšies parinkimas

11. Tinkamiausia graužikų rūšis yra žiurkės, bet galima naudoti ir kitų rūšių graužikus. Jeigu pagal šį (B.7) bandymo metodą nustatyti parametrai tiriami naudojant kitų rūšių graužikus, turėtų būti pateiktas išsamus pagrindimas. Nors biologiniu požiūriu tikėtina, kad kitos rūšis į toksines medžiagas turėtų reaguoti panašiai kaip žiurkės, naudojant smulkesnes rūšis gali atsirasti didesnių nuokrypių, susijusių su techniniais mažesnių organų skrodimo sunkumais. Vienintelė pagal tarptautinę patvirtinimo programą, skirtą nustatyti endokrininei sistemai kenksmingas medžiagas, naudota rūšis buvo žiurkės. Turėtų būti naudojami sveiki, jauni, bet suaugę plačiai naudojamų laboratorinių padermių gyvūnai. Patelės turėtų būti dar be vados ir neapvaisintos. Dozė turėtų būti pradedama duoti kaip galima anksčiau, kai tik jauniklis atjunkomas, bet ne vėliau nei gyvūnams sueina devynios savaitės. Pradedant tyrimą gyvūnų kūno masės skirtumai turi būti kuo mažesni ir nenukrypti nuo kiekvienos lyties kūno masės vidurkio daugiau kaip ± 20 %. Jeigu prieš ilgesnio laikotarpio tyrimą atliekamas išankstinis kartotinės oralinės dozės tyrimas, pageidautina, kad per abu tyrimus naudojami gyvūnai būtų tos pačios padermės ir gauti iš to paties šaltinio.

Laikymas ir šėrimas

12. Visos procedūros turėtų atitikti vietinius laboratorinės gyvūnų priežiūros reikalavimus. Bandomųjų gyvūnų patalpos temperatūra turėtų būti 22 °C (± 3 °C). Nors santykinis oro drėgnis turėtų būti ne mažesnis kaip 30 % ir, pageidautina, ne didesnis kaip 70 % (išskyrus patalpos plovimo metą), turėtų būti siekiama užtikrinti 50–60 % santykinį drėgnį. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, užtikrinant 12 h šviesos ir 12 h tamsos seką. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijose naudojamas pašaras, neribojant geriamojo vandens kiekio. Pašaro parinkimui gali turėti įtakos poreikis tinkamai įmaišyti bandomąją cheminę medžiagą, kai ji duodama pagal šį metodą. Gyvūnai turėtų būti laikomi mažomis tos pačios lyties grupėmis; jeigu tai moksliškai pagrįsta, gyvūnai gali būti laikomi po vieną. Jeigu gyvūnai narveliuose laikomi grupelėmis, viename narvelyje turėti būti laikomi ne daugiau kaip penki gyvūnai.

13. Turėtų būti nuolat analizuojama, ar pašaro sudėtyje nėra teršalų. Pašaro ėminys turėtų būti saugomas, kol bus parengta ataskaita.

Gyvūnų paruošimas

14. Sveiki jauni suaugę gyvūnai atsitiktinės atrankos principu suskirstomi į kontrolines ir bandomąsias grupes. Narveliai turėtų būti išdėstyti taip, kad galimas narvelių išdėstymo poveikis tyrimo rezultatams turėtų būtų kuo mažesnis. Gyvūnai paženklinami, kad kiekvieną iš jų būtų galima identifikuoti, ir ne mažiau kaip penkias paras iki poveikio tyrimo pradžios laikomi savo narveliuose, kad priprastų prie laboratorinių sąlygų.

Dozių ruošimas

15. Bandomoji cheminė medžiaga leidžiama zondu arba duodama su pašarais arba geriamuoju vandeniu. Oralinis dozės davimo būdas priklauso nuo tyrimo tikslų ir fizinių, cheminių bei (arba) toksikokinetinių bandomosios cheminės medžiagos savybių.

▼M4

16. Prireikus bandomoji cheminė medžiaga ištirpinama arba pagaminama jos suspensija tinkamame nešiklyje. Rekomenduojama, jeigu įmanoma, pirmenybę teikti vandeniniam tirpalui arba suspensijai, tada svarstyti galimybę naudoti aliejaus (pvz., kukurūzų) tirpalą arba suspensiją ir tik po to – galimybę naudoti tirpalus kituose nešikliuose. Jeigu naudojamas nešiklis nėra vanduo, turi būti žinomos to nešiklio toksinės savybės. Turėtų būti nustatytas bandomosios cheminės medžiagos stabilumas nešiklyje.

PROCEDŪRA

Gyvūnų skaičius ir lytis

17. Kiekvieno dydžio dozė duodama ne mažiau kaip dešimčiai gyvūnų (penkiems patinams ir penkioms patelėms). Jeigu numatoma marinti gyvūnus nebaigus bandymo, pradinis gyvūnų skaičius turėtų būti padidintas numatomu iki tyrimo pabaigos numarinti gyvūnų skaičiumi. Turėtų būti apsvarstyta galimybė į kontrolinę grupę ir didžiausiajai dozei skirtą grupę įtraukti po vieną papildomą pagalbinę dešimties gyvūnų grupę (po penkis kiekvienos lyties gyvūnus), kad bent 14 dienų po dozės davimo būtų galima stebėti toksinio poveikio grįžtamumą, tvarumą arba delsą.

Dozuotė

18. Paprastai turėtų būti naudojamos ne mažiau kaip trys bandomosios grupės ir viena kontrolinė grupė, tačiau jeigu įvertinus turimus duomenis nesitikima jokio 1 000 mg/kg kūno masės per parą dozės poveikio, galima atlikti ribinį bandymą. Jeigu nėra tinkamų duomenų, gali būti atliktas ribų nustatymo tyrimas (naudojant tos pačios padermės ir iš to paties šaltinio gautus gyvūnus), padėsiantis nustatyti naudotinas dozes. Kontrolinės grupės gyvūnai turėtų būti prižiūrimi lygiai taip pat kaip ir bandomieji gyvūnai, išskyrus tai, kad jiems neduodama bandomosios cheminės medžiagos. Jeigu duodant bandomąją cheminę medžiagą naudojamas nešiklis, kontrolinė grupė turėtų gauti didžiausią naudotą nešiklio kiekį.

19. Dozių dydžiai turėtų būti parenkami atsižvelgiant į jau turimus bandomosios arba į ją panašių cheminių medžiagų toksiškumo ir (toksiko)kinetinius duomenis. Pasirinkta didžiausioji dozė turėtų sukelti toksinį poveikį, tačiau nenužudyti gyvūno ir nesukelti sunkių kančių. Kitos, mažesnės dozės turėtų būti parenkamos taip, kad būtų galima nustatyti galimas reakcijas į dozes ir nepastebimą neigiamą poveikį (NNPL), kai duodama mažiausioji dozė. Dažnai būtų geriausia, jeigu mažėjančia tvarka parenkami dozių dydžiai vienas nuo kito skirtųsi du–keturis kartus, ir dažnai patartina ketvirtajai papildomai tiriamajai grupei taikyti labai didelius dozių dydžių skirtumus (pvz., koeficientus, didesnius kaip 10).

20. Jeigu pastebimas bendras toksinis poveikis (pvz., sumažėjusi kūno masė, poveikis kepenims, širdžiai, plaučiams arba inkstams ir t. t.) arba nustatoma kitų pakitimų, kurie gali būti ne toksinės reakcijos (pvz., sumažėjęs pašaro vartojimas, kepenų padidėjimas), pastebėtas poveikis imuninio, nervinio arba endokrininio pobūdžio pasekmėms turėtų būti vertinamas atsargiai.

Ribinis bandymas

21. Jeigu vieno dydžio dozės, ne mažesnės kaip 1 000 mg/kg kūno masės per parą arba atitinkama procentinė dalis pašaruose ar geriamame vandenyje (nustatant pagal kūno masę), kai dozė duodama su pašarais ar geriamu vandeniu, bandymas, atliekamas taikant tokiam tyrimui nustatytas procedūras, nesukelia pastebimo toksinio poveikio ir jeigu toksinio poveikio nesitikima remiantis turimais duomenimis apie panašios struktūros chemines medžiagas, išsamus trijų dydžių dozių tyrimas nebūtinas. Ribinis bandymas neatliekamas tais atvejais, kai nustatant poveikį žmogui, reikia duoti didesnes dozes.

▼M4

Dozių davimas

22. Bandomosios cheminės medžiagos dozė 28 dienų laikotarpiu gyvūnams duodama kasdien, septynias dienas per savaitę. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga leidžiama zondu, ji turėtų būti duodama viena doze, naudojant skrandžio zondą arba tinkamą intubacinį vamzdelį. Didžiausias vienkartinis duodamo skysčio kiekis priklauso nuo bandomojo gyvūno dydžio. Šis kiekis neturėtų būti didesnis kaip 1 ml/100 g kūno masės, išskyrus vandeninius tirpalus, kurių galima duoti po 2 ml/100 g kūno masės. Išskyrus dirginančias arba ėsdinančias chemines medžiagas, kurios, būdamos didesnės koncentracijos, paprastai sukelia sunkesnį poveikį, bandomojo tirpalo tūrio nepastovumas turėtų būti kiek įmanoma sumažintas keičiant koncentraciją taip, kad visų dydžių dozių tūris būtų vienodas.

23. Jeigu cheminės medžiagos duodamos su pašaru arba geriamuoju vandeniu, svarbu užtikrinti, kad įmaišomi bandomosios cheminės medžiagos kiekiai netrikdytų įprasto mitybos režimo arba vandens balanso. Bandomąją cheminę medžiagą duodant su pašaru, galima taikyti vienodą koncentraciją pašare (ppm) ar vienodą dozės dydį pagal gyvūno kūno masę; turi būti nurodytas pasirinktas variantas. Jeigu cheminė medžiaga leidžiama zondu, dozė kasdien turėtų būti duodama panašiu metu ir prireikus koreguojama, kad būtų palaikomas pastovus dozės dydis atsižvelgiant į gyvūno kūno masę. Jeigu prieš ilgalaikį tyrimą atliekamas išankstinis kartotinės dozės tyrimas, per abu tyrimus gyvūnams turi būti duodami panašūs pašarai.

Stebėjimai

24. Stebėjimų laikotarpio trukmė turėtų būti 28 dienos. Tolesniems stebėjimams numatytos pagalbinės grupės gyvūnai turėtų būti dar bent 14 dienų laikomi neduodant jokios dozės, kad būtų galima nustatyti toksinio poveikio delsą, tvarumą arba gyvūnų atsigavimą nuo poveikio.

25. Bent kartą per parą turėtų būti atliekami bendrieji klinikiniai stebėjimai; geriausia, kad jie būtų atliekami tuo pačiu paros metu, atsižvelgiant į stipriausią numatomo poveikio pasireiškimą po dozės davimo. Turėtų būti registruojama gyvūnų sveikatos būklė. Bent du kartus per parą visi gyvūnai turėtų būti patikrinami, ar jie sveiki ir nenugaišę.

26. Kartą prieš pirmojo poveikio pradžią (kad būtų galima palyginti atskirus gyvūnus) ir bent kartą per savaitę po dozės davimo turėtų būti atliekami išsamūs visų gyvūnų klinikiniai stebėjimai. Šie stebėjimai atliekami perkėlus gyvūną iš jo narvo į tam skirtą įprastą vietą ir, pageidautina, turėtų būti atliekami tuo pačiu paros metu. Stebėjimai turėtų būti kruopščiai registruojami, pageidautina, pagal toje laboratorijoje aiškiai apibrėžtą vertinimo sistemą. Turėtų būti dedamos pastangos, kad bandymo sąlygų kaita būtų kuo mažesnė, ir pageidautina, kad šiuos stebėjimus atliktų stebėtojai, nežinantys apie dozės davimą. Be kitų dalykų, turėtų būti registruojami odos, kailio, akių, gleivinės pakitimai, išskyrų atsiradimas ir autonominis aktyvumas (pvz., ašarojimas, plaukų pašiaušimas, vyzdžio dydis, neįprasti kvėpavimo pakitimai). Taip pat turėtų būti registruojami eisenos, pozos, reakcijos į paėmimą rankomis pakitimai, traukulių arba toninių judesių atsiradimas, stereotipinis (pvz., besaikis valymasis, pasikartojantis sukimasis ratu) arba keistas elgesys (pvz., savęs luošinimas, vaikščiojimas atbulomis) (2).

27. Ketvirtą poveikio savaitę turėtų būti tiriamos jutiminės reakcijos į įvairaus pobūdžio dirgiklius (pvz., klausos, regos ir proprioreceptorinius) (3) (4) (5), vertinamas spaudimo (jėgos) stiprumas (6) ir judėjimo aktyvumas (7). Išsamesnės informacijos apie procedūras, kurios galėtų būti taikomos, pateikta atitinkamuose literatūros šaltiniuose. Vietoje nurodytųjų gali būti taikomos ir alternatyvios procedūros.

▼M4

28. Jeigu kartotinės dozės tyrimas atliekamas kaip išankstinis tyrimas prieš pusiau lėtinio poveikio (90 dienų) tyrimą, funkciniai stebėjimai ketvirtąją savaitę gali būti neatliekami. Tokiu atveju funkciniai stebėjimai turėtų būti įtraukiami į šį tolesnį tyrimą. Kita vertus, tokie funkciniai stebėjimai atliekant kartotinės dozės tyrimą suteikia didesnę galimybę geriau parinkti dozių dydžius tolesniam pusiau lėtinio poveikio tyrimui.

29. Išimtiniais atvejais funkcinių stebėjimų galima neatlikti ir su tomis grupėmis, kurių toksiškumo požymiai tokio laipsnio, kad jie labai trukdytų atlikti funkcinius bandymus.

30. Atliekant skrodimą, (neprivaloma tvarka) galėtų būti nustatomas visų patelių lytinis ciklas, imant makšties tepinėlius. Šie stebėjimai suteiktų informacijos apie lytinio ciklo etapą, buvusį gyvūno numarinimo metu, ir padėtų atlikti histologinius su estrogenais susijusių audinių tyrimus [žr. histopatologinių tyrimų gaires (19)].

Kūno masė ir pašarų ir (arba) vandens suvartojimas

31. Bent kartą per savaitę visi gyvūnai turėtų būti pasveriami. Ne rečiau kaip kartą per savaitę turėtų būti matuojamas pašarų suvartojimas. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu, bent kartą per savaitę turėtų būti matuojamas ir vandens suvartojimas.

Hematologiniai tyrimai

32. Pasibaigus bandymo laikotarpiui turėtų būti atlikti tokie hematologiniai tyrimai: hematokrito, hemoglobino koncentracijos, eritrocitų kiekio, retikolucitų, bendro leukocitų kiekio ir įvairių leukocitų kiekių, trombocitų kiekio ir kraujo krešėjimo laiko ir aktyvumo. Jeigu įtariama, kad bandomoji cheminė medžiaga arba jos numatomi metabolitai turi oksidacinių savybių, turėtų būti nustatyti ir kiti rodikliai, įskaitant methemoglogino koncentraciją ir Heinco kūnelius.

33. Kraujo ėminiai turėtų būti imami iš nurodytos vietos prieš pat gyvūnų numarinimą arba numarinimo procedūros metu ir saugomi tinkamomis sąlygomis. Naktį prieš numarinimą gyvūnams turėtų būti neduodama pašaro ([1]).

Klinikinė biochemija

34. Siekiant ištirti pagrindinius toksinius poveikius audiniams, pirmiausia inkstams ir kepenims, turėtų būti atlikti visų gyvūnų kraujo ėminių, paimtų prieš pat gyvūnų numarinimą arba numarinimo procedūros metu, klinikiniai biocheminiai tyrimai (atmetus gaištančius arba nebaigus tyrimo numarintus gyvūnus). Kraujo plazmoje arba serume tiriama: natris, kalis, gliukozė, bendras cholesterolio kiekis, šlapalas, kreatininas, bendras baltymų ir albumino kiekis, mažiausiai du fermentai, rodantys poveikį kepenų ląstelėms (pvz., alaninaminotransferazė, aspartataminotransferazė, šarminė fosfatazė, gamaglutamiltranpeptidazė ir glutamato dehidrogenazė), ir tulžies rūgštys. Tam tikromis aplinkybėmis naudingos informacijos gali suteikti papildomi fermentų (kepenų arba kitokios kilmės) ir bilirubino tyrimai.

35. Paskutinę tyrimo savaitę (neprivaloma tvarka) gali būti atliekami šlapimo tyrimai, per nustatytą laiko tarpą surenkant tam tikrą šlapimo kiekį ir ištiriant šlapimo išvaizdą, kvapą, tūrį, osmosinį slėgį arba savitąjį svorį, pH, baltymus, gliukozę ir kraują (kraujo kūnelius).

([1]) Atliekant kai kuriuos serumo ir plazmos matavimus, ypač gliukozės, pageidautina, kad gyvūnai naktį negautų pašaro. Pagrindinė tokio poreikio priežastis yra ta, kad dėl padidėjusių nuokrypių, kurių neišvengiamai atsirastų, jeigu gyvūnai būtų šeriami, būtų paslėpti sunkiau pastebimi padariniai ir būtų sunku aiškinti rezultatus. Tačiau, kita vertus, naktį gyvūnams neduodant maisto gali būti padaryta neigiamos įtakos bendrajai gyvūnų medžiagų apykaitai ir, ypač atliekant šėrimo tyrimus, gali būti iškraipytas kasdienis bandomosios cheminės medžiagos poveikis. Jeigu būtų nuspręsta nešerti gyvūnų per naktį, klinikiniai biocheminiai tyrimai turėtų būti atliekami jau atlikus ketvirtosios tyrimo savaitės funkcinius stebėjimus.

▼M4

36. Be to, turėtų būti apsvarstyta galimybė atlikti plazmos arba serumo rodiklių, rodančių bendruosius audinių pažeidimus, tyrimus. Jeigu žinomos bandomosios cheminės medžiagos savybės gali arba, įtariama, gali turėti neigiamo poveikio susijusioms metabolinėms savybėms, galima atlikti kalcio, fosforo, trigliceridų, specifinių hormonų ir cholinesterazės tyrimus. Šie tyrimai turi būti paskiriami tam tikrų kategorijų medžiagoms arba atsižvelgiant į konkretų atvejį.

37. Nors atliekant tarptautinį su endokrinine sistema susijusių pasekmių vertinimą ir nepavyko įrodyti aiškios skydliaukės hormonų (T3, T4) ir tireotropinų (angl. TSH) tyrimų naudos, gali būti naudinga išsaugoti plazmos ir serumo ėminius, kad būtų galima įvertinti T3, T4 ir TSF (neprivaloma), kai atsiranda poveikio hipofizės-skydliaukės ašiai požymių. Saugotini ėminiai gali būti užšaldomi –20 °C temperatūroje. Hormonų tyrimų rezultatų nuokrypiams ir absoliutinėms koncentracijoms gali turėti įtakos šie veiksniai:

— numarinimo laikas – dėl hormonų koncentracijos kaitos paros metu,

— numarinimo būdas, taikomas siekiant, kad gyvūnai nepatirtų pernelyg didelio streso, galinčio turėti įtakos hormonų koncentracijoms,

— hormonų tyrimų įranga, kuri gali skirtis etaloninių kreivių požiūriu.

Galutinai nustatyti skydliaukę veikiančias chemines medžiagas patikimiau taikant histopatologinę analizę, o ne remiantis hormonų lygiais.

38. Hormonų tyrimams specialiai skirti plazmos ėminiai turėtų būti imami panašiu paros metu. Rekomenduojama apsvarstyti galimybę atlikti T3, T4 ir TSH tyrimus remiantis skydliaukės histopatologiniais pakitimais. Taikant įvairią komercinę analizės įrangą, skaitinės vertės, gautos analizuojant hormonų koncentracijas, skiriasi. Todėl gali būti neįmanoma parengti poveikio vertinimo kriterijų, pagrįstų vienodais istoriniais duomenimis. Arba laboratorijos turėtų siekti, kad kontroliniai T3 ir T4 variacijos koeficientai būtų mažesni kaip 25, o TSH – mažesni kaip 35. Visos koncentracijos registruojamos ng/ml išraiška.

39. Jeigu pamatiniai istoriniai duomenys yra netinkami, turėtų būti apsvarstyta galimybė nustatyti hematologinius ir klinikinius biocheminius kintamuosius prieš pradedant duoti dozes arba, pageidautina, naudojant gyvūnų grupę, neįtrauktą į bandomąsias grupes.

PATOLOGIJA

Bendrasis skrodimas

40. Atliekamas išsamus visų bandomųjų gyvūnų bendrasis skrodimas, atidžiai ištiriant kūno paviršių ir visas jo angas, kaukolę, krūtinės ląstą, pilvo ertmes ir jų turinį. Atlikus skrodimą, visų gyvūnų (išskyrus gaištančius ir (arba) numarintus nebaigus tyrimo) kepenys, inkstai, antinksčiai, sėklidės, sėklidžių prielipai, prostata ir sėklinės pūslelės su koaguliatorių liaukomis (kaip kompleksas), užkrūčio liauka, blužnis, smegenys ir širdis turėtų būti nuvalyti, jeigu reikia, pašalinant prigludusius audinius, ir po skrodimo kuo greičiau pasverti, kol neišdžiuvo. Valant prostatos kompleksą, būtina imtis atsargumo priemonių, kad nebūtų pradurtos sėklinės pūslelės su skysčiais. Arba sėklinės pūslelės ir prostata gali būti valomos ir sveriamos atlikus fiksavimą.

▼M4

41. Be to, kaip galima greičiau skrodimo, kol neišdžiuvo, gali būti pasveriami ir kiti du audiniai: kiaušidžių pora (drėgnų organų masė) ir gimda su gimdos kakleliu (patarimų, kaip pašalinti ir svėrimui paruošti gimdos audinius, pateikta OECD TG 440 (OECD bandymų gairės Nr. 440) (18)).

42. Atlikus fiksavimą, gali būti (bet neprivaloma) nustatyti skydliaukės masę. Valyti irgi būtina labai atsargiai ir tik atlikus fiksavimą, kad nebūtų pažeistas audinys. Pažeidus audinį gali būti gauti netikslūs histopatologinės analizės rezultatai.

43. Atsižvelgiant į audinio tipą ir numatomą vėliau atlikti histopatologinį tyrimą, tinkamiausioje fiksavimo terpėje turėtų būti konservuoti šie audiniai (žr. 47 skirsnį): visi labai pakitę audiniai, smegenys (jų būdingiausios dalys – didžiosios smegenys, smegenėlės ir smegenų tiltas), nugaros smegenys, akis, skrandis, mažosios ir didžiosios žarnos (taip pat Peyerio plokštelės), kepenys, inkstai, antinksčiai, blužnis, širdis, užkrūčio liauka, skydliaukė, trachėja ir plaučiai (prileidžiant fiksatyvo ir tada panardinant), lytinės liaukos (sėklidės ir kiaušidės), kiti lytiniai organai (gimda, gimdos kaklelis, sėklidžių prielipai, prostata ir sėklinės pūslelės su koaguliatorių liaukomis), makštis, šlapimo pūslė, limfiniai mazgai [be artimiausio drenažinio mazgo, remiantis geriausiąja laboratorine patirtimi paimamas dar vienas mazgas (15)], periferinis nervas (sėdimasis arba blauzdikaulio), pageidautina, esantis arti raumens, skeleto raumuo ir kaulas su kaulų čiulpais (išpjova arba šviežiai paruošta kaulų čiulpų punkcija). Rekomenduojama atlikti sėklidžių fiksavimą jas panardinant į Bouino arba modifikuotąjį Davidsono fiksatyvą (16) (17). Abu *tunica albuginea* galai turi būti atsargiai ir negiliai pradurti adata, kad būtų galima greitai prileisti fiksatyvo. Atsižvelgiant į gautas klinikines ir kitokias išvadas, gali reikėti ištirti papildomus audinius. Be to, atsižvelgiant į žinomas bandomosios cheminės medžiagos savybes, turėtų būti konservuojami visi numanomi tiksliniai organai.

44. Vertingos informacijos apie poveikį endokrininei sistemai galima gauti ištiriant šiuos organus: lytines liaukas (kiaušides ir sėklides), kitus lytinius organus (gimdą su gimdos kakleliu, sėklidžių prielipus, sėklines pūsleles su koaguliatorių liaukomis, dorsolateralinę ir pilvinę prostatas), makštį, hipofizę, patinų pieno liaukas, skydliaukę ir antinksčius). Patinų pieno liaukų pakitimai nėra pakankamai išsamiai aprašyti, tačiau šis parametras gali būti labai svarbus estrogeninio poveikio turinčias chemines medžiagas. 43 skirsnyje nenurodytų organų ir (arba) audinių stebėjimai neprivalomi (žr. 2 priedėlį).

45. Histopatologinių tyrimų gairėse (19) pateikta išsamios papildomos informacijos apie skrodimą, fiksavimą, pjaustymą ir endokrininių audinių histopatologiją.

46. Įgyvendinant tarptautinę bandymų programą gauta šiek tiek įrodymų, kad sunkiai pastebimo poveikio endokrininei sistemai turinčios cheminės medžiagos, menkai veikiančios lytinių hormonų homeostazę, gali būti nustatomos atsižvelgiant į lytinio ciklo sinchronizavimo trikdymą įvairiuose audiniuose ir iš dalies – į atvirus histopatologinius patelių lytinių organų pakitimus. Nors galutinių įrodymų dėl tokio poveikio negauta, rekomenduojama aiškinant kiaušidžių (folikulų, apvalkalų ir kiaušidžių grūdėtųjų ląstelių), gimdos, gimdos kaklelio ir makšties histopatologinių tyrimų rezultatus atsižvelgti į galimo lytinio ciklo asinchroniškumą. Jeigu vertinamas ciklo etapas, nustatomas imant makšties tepinėlius, į jį taip pat galima atsižvelgti atliekant šį palyginimą.

▼M4

Histopatologinis tyrimas

47. Turėtų būti atliktas išsamus histopatologinis visų kontrolinės grupės ir didžiausiąją dozę gavusios grupės gyvūnų konservuotų organų ir audinių tyrimas. Jeigu nustatoma, kad didžiausiąją dozę gavusioje grupėje atsirado su dozės davimu susijusių pakitimų, turėtų būti atlikti ir visų kitų dydžių dozes gavusių grupių gyvūnų histopatologiniai tyrimai.

48. Ištiriami visi labai pakitę audiniai.

49. Jei naudojama pagalbinė grupė, turėtų būti atliekamas histopatologinis audinių ir organų, dėl kurių, ištyrus dozę gavusias grupes, nustatyta, kad jiems buvo padarytas poveikis, tyrimas.

DUOMENYS IR ATASKAITOS

Duomenys

50. Turėtų būti pateikiami kiekvieno gyvūno duomenys. Be to, visi duomenys turėtų būti apibendrinti lentelėse, pagal kiekvieną bandomąją grupę nurodant pradedant bandymą turėtų gyvūnų skaičių, atliekant bandymą nugaišusių arba dėl humaniškų priežasčių numarintų gyvūnų skaičių ir kiekvienos žūties arba numarinimo dėl humaniškų priežasčių laiką, gyvūnų su toksiškumo požymiais skaičių, pastebėtų toksiškumo požymių aprašymą, įskaitant kiekvieno toksinio poveikio pasireiškimo laiką, trukmę ir sunkumą, gyvūnų su audinių pakitimais skaičių, pakitimų tipą ir gyvūnų su kiekvieno tipo pakitimais procentinę dalį.

51. Jeigu įmanoma, skaitiniai rezultatai turėtų būti įvertinti taikant tinkamą visuotinai pripažintą statistinį metodą. Lyginant poveikį pagal dozių intervalą turėtų būti vengiama taikyti įvairius t kriterijus. Statistiniai metodai turėtų būti parenkami planuojant tyrimą.

52. Siekiant užtikrinti kokybės kontrolę, siūloma surinkti istorinius kontrolinius duomenis ir skaitiniams duomenims apskaičiuoti variacijos koeficientus, ypač parametrams, susijusiems su endokrininei sistemai kenksmingų medžiagų nustatymu. Šie duomenys gali būti naudojami palyginimo tikslais, kai vertinami faktiniai tyrimai.

Bandymo ataskaita

53. Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga

— Fizinė būsena, grynumas, fizinės ir cheminės savybės,

— identifikavimo duomenys.

Nešiklis (jeigu naudojamas)

— Nešiklio, jeigu tai ne vanduo, pasirinkimo pagrindimas.

Bandomieji gyvūnai

— Naudota rūšis ir (arba) padermė,

— gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,

— šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.,

— kiekvieno gyvūno masė pradedant bandymą,

— rūšies, jeigu tai ne žiurkės, pasirinkimo pagrindimas.

Bandymo sąlygos

— Dozės dydžio pasirinkimo pagrindimas,

— išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos ir (arba) pašaro paruošimą, gautą koncentraciją, preparato stabilumą ir homogeniškumą,

▼M4

— išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos davimo būdą,

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos (ppm) pašare arba geriamajame vandenyje perskaičiavimas į faktinę dozę (mg/kg kūno masės per parą), jeigu taikytina,

— išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę.

Neprivalomos tirti, bet ištirtos pasekmės

— Neprivalomų tirti, bet ištirtų pasekmių sąrašas.

Rezultatai

— Kūno masė ir (arba) kūno masės pokyčiai,

— maisto ir, jeigu taikytina, vandens suvartojimas,

— toksinės reakcijos duomenys pagal lytį ir dozės dydį, nurodant toksiškumo požymius,

— klinikinių požymių pobūdis, sunkumas ir trukmė (grįžtami ar negrįžtami),

— jutiminio aktyvumo, spaudimo (jėgos) stiprumo ir judėjimo aktyvumo įvertinimai,

— hematologiniai tyrimai remiantis atitinkamomis pamatinėmis vertėmis,

— klinikiniai biocheminiai tyrimai remiantis atitinkamomis pamatinėmis vertėmis,

— kūno masė numarinimo metu ir organų masė,

— skrodimo išvados,

— išsamus visų histopatologinio tyrimo rezultatų aprašymas,

— sugerties duomenys, jeigu yra,

— statistinis rezultatų apdorojimas, jeigu taikytina.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

▼M4

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Androgeniškumas – cheminės medžiagos geba veikti žinduolio organizme kaip natūralus androgeninis hormonas (pvz., testosteronas).

Antiandrogeniškumas – cheminės medžiagos geba slopinti natūralaus androgeninio hormono (pvz., testosterono) veikimą žinduolio organizme.

Antiestrogeniškumas – cheminės medžiagos geba slopinti natūralaus estrogeninio hormono (pvz., 17-beta-estradiolio) veikimą žinduolio organizme.

Antitiroidinis veiklumas – cheminės medžiagos geba slopinti natūralaus skydliaukės hormono (pvz., T_3) veikimą žinduolio organizme.

Dozuotė – bendroji sąvoka, apimanti dozę, jos davimo dažnumą ir trukmę.

Dozė – duodamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama bandomosios cheminės medžiagos mase, per parą tenkančia vienam bandomojo gyvūno kūno masės vienetui (pvz., mg/kg kūno masės per parą), arba pastovia koncentracija pašare.

Akivaizdus toksiškumas – bendroji sąvoka, apibūdinanti aiškius toksiškumo požymius, pastebimus davus bandomosios cheminės medžiagos. Šie požymiai turėtų būti pakankami įvertinti pavojų ir turėtų būti tokie, kad padidinus duodamą dozę būtų galima tikėtis sunkaus toksiškumo požymių ir galbūt gyvūnų gaišimo.

NNPL – „nepastebimo neigiamo poveikio lygio“ santrumpa. Tai didžiausioji dozė, kurią duodant nepastebima neigiamų rezultatų.

Estrogeniškumas – cheminės medžiagos geba veikti žinduolio organizme kaip natūralus estrogeninis hormonas (pvz., 17–beta-estradiolis).

Bandomoji cheminė medžiaga – pagal šį bandymo metodą bandoma cheminė medžiaga arba mišinys.

Tiroidinis veiklumas – cheminės medžiagos geba veikti žinduolio organizme kaip natūralus skydliaukės hormonas (pvz., T_3).

Patikimumo patvirtinimas – mokslinis procesas, skirtas apibūdinti bandymo metodo procedūrinius reikalavimus ir apribojimus ir įrodyti bandymo metodo patikimumą bei tinkamumą tam tikram tikslui.

▼M4

2 priedėlis

Pasekmės, rekomenduojamos taikyti pagal B.7 metodą nustatant endokrininei sistemai kenksmingas medžiagas

Privalomos pasekmės	Neprivalomos pasekmės
Masė	
— Sėklidžių	— Kiaušidžių
— Sėklidžių prielipų	— Gimdos su gimdos kakleliu
— Antinksčių	— Skydliaukės
— Prostatos ir sėklinių pūslelių su koaguliatorių liaukomis	
Histopatologinis tyrimas	
— Lytinių liaukų:	— Makšties tepinėlių
— Sėklidžių	— Patinų pieno liaukų
— Kiaušidžių	— Hipofizės
— Kitų lytinių organų:	
— Sėklidžių prielipų	
— Prostatos ir sėklinių pūslelių su koaguliatorių liaukomis	
— Gimdos su gimdos kakleliu	
— Antinksčių	
— Skydliaukės	
— Makšties	
Hormonų matavimai	
	— Cirkuliaciniai T3, T4 lygiai
	— Cirkuliaciniai TSH lygiai

LITERATŪRA

1. OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

2. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

3. Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.

4. Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691–704.

5. Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.

6. Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

▼M4

7. Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599–609.

8. OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

9. OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

10. OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

11. OECD (2012).Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html

12. OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

13. OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

14. OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/-MONO(2000)7.

15. Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404–407.

16. Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52–85.

17. Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524–533.

18. OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

19. OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

B.8. **POŪMIS TOKSIŠKUMAS ĮKVĖPUS. 28 DIENŲ TYRIMAS**

SANTRAUKA

Šis atnaujintasis B.8 bandymo metodas parengtas tam, kad būtų galima išsamiai apibūdinti bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą, pasireiškiantį neilgą (28 dienų) laikotarpį duodant kartotinę dozę per kvėpavimo takus, ir gauti duomenų, reikalingų kiekybiniams inhaliacinės rizikos vertinimams. Ne mažiau kaip penkių patinų ir penkių patelių grupės 28 dienų laikotarpiu šešias valandas per parą veikiamos a) bandomąja chemine medžiaga, taikant tris arba daugiau koncentracijos lygių, b) išvalytu oru (neigiama kontrolė) ir (arba) c) nešikliu (nešiklio kontrolė). Paprastai gyvūnai veikiami penkias dienas per savaitę, tačiau galima taikyti ir septynių dienų per savaitę poveikį. Bandymai visada atliekami ir su patinais, ir su patelėmis, tačiau, jeigu žinoma, kad kurios nors lyties gyvūnai yra jautresni tam tikrai bandomajai cheminei medžiagai, patinams ir patelėms gali būti taikomi skirtingi koncentracijos lygiai. Šis metodas tyrimo vadovui suteikia lanksčią galimybę įtraukti pagalbines (grįžtamumo tyrimų) grupes, taikyti bronchoalveolinį plovimą (BAP), atlikti neurologinius tyrimus ir papildomus klinikinius patologinius bei histopatologinius tyrimus, kad būtų galima geriau apibūdinti bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą.

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka OECD „Test Guideline“ 412 (OECD bandymo gairės Nr. 412) (2009). Originalios poūmio toksiškumo įkvėpus bandymo gairės „Test Guideline“ 412 (TG 412) priimtos 1981 m. (1). Šis (B.8) bandymo metodas (lygiavertis atnaujintosioms TG 412) atnaujintas siekiant jį suderinti su mokslo pasiekimais ir patenkinti dabartines ir būsimas reglamentavimo reikmes.

2. Šis metodas suteikia galimybę apibūdinti neigiamą poveikį, sukeltą 28 dienas kasdien per kvėpavimo takus duodant kartotinę bandomosios cheminės medžiagos dozę. Atlikus 28 dienų poūmio toksiškumo įkvėpus tyrimus gauti duomenys gali būti naudojami kokybiniams rizikos vertinimams [jeigu po to neatliekamas 90 dienų pusiau lėtinio toksiškumo įkvėpus tyrimas (šio priedo B.29 skyrius)]. Šie duomenys taip pat gali suteikti informacijos dėl koncentracijų parinkimo ilgesnio laikotarpio tyrimams, pvz., 90 dienų pusiau lėtinio toksiškumo įkvėpus tyrimui. Šis bandymo metodas nėra specialiai skirtas nanomedžiagų bandymams. Aprašant šį bandymo metodą vartojamos apibrėžtys pateiktos šio skyriaus pabaigoje ir rekomendaciniame dokumente Nr. 39 (2).

PIRMINIAI ASPEKTAI

3. Siekdama užtikrinti aukštesnę tyrimo kokybę ir kaip galima labiau sumažinti gyvūnų naudojimą, bandymų laboratorija, prieš atlikdama tyrimą, turėtų įvertinti visą turimą informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą. Pasirinkti tinkamas bandymų koncentracijas gali padėti informacija apie bandomosios cheminės medžiagos tapatumą, cheminę struktūrą, fizines ir chemines savybes, taip pat toksiškumo bandymų *in vitro* arba *in vivo* rezultatai, numatomas (-i) panaudojimo būdas (-ai) ir galimas poveikis žmogui, turimi (Q)SAR duomenys ir toksikologiniai duomenys apie panašios struktūros chemines medžiagas, taip pat duomenys, gauti atlikus ūmaus toksiškumo įkvėpus bandymus. Jeigu yra tikėtinas arba jeigu atliekant tyrimą pastebimas neurotoksinis poveikis, tyrimo vadovas gali nuspręsti įtraukti atitinkamus vertinimus, pvz., funkcinių stebėjimų rinkinį (FSR) ir judėjimo aktyvumo vertinimą. Nors gali būti labai svarbu užtikrinti tinkamą su konkrečiais tyrimais susijusių dozių davimo laiką, ši papildoma veikla neturėtų trukdyti įgyvendinti pagrindinio tyrimo planą.

▼M4

4. Ėsdinančių arba dirginančių bandomųjų cheminių medžiagų tirpalai gali būti bandomi taikant koncentracijas, kurioms esant pasiekiamas reikiamas toksiškumo lygis [žr. RD Nr. 39 (2)]. Tačiau veikiant gyvūnus šiomis medžiagomis taikytinos tikslinės koncentracijos turėtų būti gana mažos, kad nesukeltų ženklaus skausmo ir kančių, bet pakankamos, kad būtų galima pratęsti koncentracijos ir reakcijos tarpusavio priklausomybės kreivę iki tokių lygių, kuriems esant būtų pasiektas reglamentavimo arba mokslinis tikslas, kurio siekiama bandymu. Šios koncentracijos turėtų būti parenkamos atsižvelgiant į konkretų atvejį ir, pageidautina, remiantis tinkamai suplanuotu ribų nustatymo tyrimu, suteikiančiu informacijos apie pavojingas pasekmes, dirginimo ribinę vertę ir poveikio pasireiškimo laiką (žr. 11–13 skirsnius). Turėtų būti pateiktas koncentracijos pasirinkimo pagrindimas.

5. Gaištantys gyvūnai arba skausmą ar sunkias ilgalaikes kančias akivaizdžiai patiriantys gyvūnai turėtų būti humaniškai numarinami. Gaištantys gyvūnai laikomi atliekant bandymą nugaišusiais gyvūnais. Sprendimo numarinti gaištančius arba sunkiai kenčiančius gyvūnus priėmimo kriterijai ir numatomos arba neišvengiamos žūties nustatymo rekomendacijos yra pateikti OECD rekomendaciniame dokumente dėl pasekmių žmonėms (3).

METODO APRAŠYMAS

Gyvūnų rūšies parinkimas

6. Turėtų būti naudojami sveiki, jauni, bet suaugę plačiai naudojamų laboratorinių padermių graužikai. Tinkamiausia rūšis yra žiurkės. Jeigu naudojama kita rūšis, turėtų būti pateiktas jos naudojimo pagrindimas.

Gyvūnų paruošimas

7. Patelės turėtų būti dar be vados ir neapvaisintos. Atsitiktinės atrankos dieną gyvūnai turėtų būti jauni, bet suaugę, 7–9 savaičių amžiaus. Kūno masė pagal kiekvieną lytį turėtų ± 20 % tikslumu atitikti vidutinę tos lyties gyvūnų masę. Gyvūnai atrenkami atsitiktine tvarka, paženklinami, kad būtų įmanoma identifikuoti kiekvieną gyvūną, ir ne mažiau kaip penkias paras iki bandymo pradžios laikomi savo narveliuose, kad priprastų prie laboratorinių sąlygų.

Gyvūnų laikymas

8. Kad būtų patogiau stebėti ir kad būtų išvengta painiavos, kiekvienas gyvūnas turėtų būti išskirtinai paženklintas, jeigu įmanoma, naudojant poodinius atsakiklius. Bandomųjų gyvūnų laikymo patalpos temperatūra turėtų būti 22 ± 3 °C. Tinkamiausias santykinis drėgnis – 30–70 %, bet jis gali būti nepasiekiamas, jeigu naudojamas nešiklis nėra vanduo. Prieš dozės davimą ir davus dozę gyvūnai turėtų būti laikomi narveliuose suskirstyti grupėmis pagal lytį ir koncentraciją; narvelyje laikomų gyvūnų skaičius turėtų būti toks, kad būtų galima aiškiai stebėti kiekvieną gyvūną ir kad būtų patiriama kuo mažiau žalos dėl kanibalizmo ir grumtynių. Jeigu dozė gyvūnams duodama tik per nosį, gali reikėti juos pripratinti prie uždaromųjų vamzdelių. Uždaromieji vamzdeliai gyvūnams neturėtų kelti didelės fizinės, terminės arba suvaržymo įtampos. Varžymas gali turėti fiziologinių pasekmių, pvz., turėti poveikio kūno temperatūrai (hipertermija) ir (arba) per minutę įkvepiamam tūriui. Jeigu yra bendrųjų duomenų, rodančių, kad tokių pastebimų pokyčių neįvyksta, pripratinimas prie uždaromųjų vamzdelių nebūtinas. Gyvūnai, kurių visas kūnas veikiamas aerozoliu, poveikio laikotarpiu turėtų būti laikomi atskirai, kad bandomasis aerozolis nebūtų filtruojamas per kitų narvelyje esančių gyvūnų kailį. Išskyrus poveikio laikotarpį, gyvūnams šerti tinka įprastas ir sertifikuotas laboratorijose naudojamas pašaras, duodant neribotą geriamo vandens kiekį. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, taikant 12 h šviesos ir 12 h tamsos seką.

▼M4

Inhaliacinės kameros

9. Parenkant inhaliacinę kamerą, turėtų būti atsižvelgiama į bandomosios cheminės medžiagos pobūdį ir bandymo tikslą. Pirmenybė teikiama dozės davimui tik per nosį (ši sąvoka apima sąvokas „tik per galvą“, „tik per nosį“ ir „tik per šnipą“). Pirmenybė dozės davimui tik per nosį paprastai teikiama tiriant skystųjų arba kietųjų dalelių aerozolius ir garus, kurie gali kondensuotis ir tapti aerozoliais. Specialieji tyrimo tikslai gali būti sėkmingiau pasiekti taikant poveikio per visą kūną metodą, tačiau tai turi būti pagrįsta tyrimo ataskaitoje. Siekiant užtikrinti atmosferos pastovumą naudojant poveikio per visą kūną kamerą, visa bandomųjų gyvūnų užimama erdvė turėtų neviršyti 5 % kameros tūrio. Poveikio tik per nosį ir poveikio per visą kūną metodų principai ir konkretūs šių metodų privalumai bei trūkumai aprašyti RD Nr. 39 (2).

TOKSIŠKUMO TYRIMAI

Ribinės koncentracijos

10. Kitaip nei ūmaus poveikio tyrimams, 28 dienų poūmio toksiškumo įkvėpus tyrimams ribinių koncentracijų nenustatyta. Didžiausioji bandytina koncentracija turėtų būti nustatoma atsižvelgiant į šiuos dalykus: 1) didžiausiąją pasiekiamą koncentraciją, 2) „blogiausiu atveju“ taikytiną poveikio žmonėms lygį, 3) poreikį užtikrinti tinkamą deguonies tiekimą ir (arba) 4) gyvūnų gerovės aspektus. Jeigu nėra duomenimis pagrįstų ribų, gali būti taikomos Reglamente (EB) Nr. 1272/2008 (13) nustatytos ūmaus poveikio ribos (t. y. neviršijant 5 mg/l koncentracijos, jeigu tai aerozoliai, 20 mg/l, jeigu tai garai, ir 20 000 ppm, jeigu tai dujos); žr. RD Nr. 39 (2). Jeigu atliekant dujų arba labai lakių bandomųjų cheminių medžiagų (pvz., šaldymo medžiagų) bandymus būtina viršyti šias ribas, turi būti pateiktas pagrindimas. Ribinė koncentracija turėtų sukelti akivaizdų toksiškumą nesukeldama pernelyg didelio streso gyvūnams ir netrumpindama jų gyvenimo trukmės (3).

Ribų nustatymo tyrimas

11. Prieš pradedant pagrindinį tyrimą, gali reikėti atlikti ribų nustatymo tyrimą. Ribų nustatymo tyrimas yra išsamesnis už orientacinį tyrimą, nes jis susijęs ne tik su koncentracijų parinkimu. Per ribų nustatymo tyrimą gautos žinios gali padėti sėkmingai atlikti pagrindinį tyrimą. Pvz., ribų nustatymo tyrimas gali suteikti techninės informacijos apie analizės metodus, dalelių dydžius, toksinio poveikio mechanizmų nustatymą, klinikinės patologijos ir histopatologinių tyrimų duomenis ir apytikrius vertinimus, koks NNPL ir kokia didžiausioji leidžiama koncentracija (DLK) galėtų būti taikomi atliekant pagrindinį tyrimą. Tyrimo vadovas gali nuspręsti atlikti ribų nustatymo tyrimą, kad nustatytų kvėpavimo takų dirginimo ribinę vertę (pvz., atliekant histopatologinį kvėpavimo takų tyrimą, plaučių funkcijos tyrimus arba bronchoalveolinį plovimą), didžiausiąją koncentraciją, kuri būtų leidžiama kaip nesukelianti pernelyg didelio streso gyvūnams, ir parametrus, kuriais būtų geriausiai apibūdinamas bandomosios cheminės medžiagos toksiškumas.

12. Ribų nustatymo tyrimas gali būti atliekamas taikant vieną arba daugiau koncentracijos lygių. Kiekvienas koncentracijos lygis turėtų būti bandomas naudojant ne daugiau kaip tris patinus ir tris pateles. Ribų nustatymo tyrimas turėtų trukti ne mažiau kaip penkias dienas, bet paprastai – ne ilgiau kaip 14 dienų. Tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateiktas per pagrindinį tyrimą taikytinų koncentracijų parinkimo pagrindimas. Pagrindinio tyrimo tikslas – įrodyti koncentracijos ir reakcijos tarpusavio priklausomybę remiantis numanoma sunkiausia pasekme. Tinkamiausia mažiausioji koncentracija – nepastebimo neigiamo poveikio lygio koncentracija, didžiausioji – akivaizdų toksiškumą sukelianti koncentracija, nesukelianti pernelyg didelio streso gyvūnams ir netrumpinanti jų gyvenimo trukmės (3).

▼M4

13. Parenkant per ribų nustatymo tyrimą taikytinus koncentracijos lygius, turėtų būti atsižvelgiama į visą turimą informaciją, įskaitant struktūros ir savybių ryšius ir duomenis apie panašias chemines medžiagas (žr. 3 skirsnį). Ribų nustatymo tyrimu gali būti patikrintos ir (arba) atmestos pasekmės, kurios laikomos sunkiausiomis mechaniniu požiūriu vertinamomis pasekmėmis, pvz., cholinesterazės inhibavimas organiniais fosforo junginiais, methemoglobino susidarymas veikiant eritrocitotoksinėms medžiagoms, skydliaukės hormonų (T_3, T_4) reakcija į tirotoksines medžiagas, poveikis baltymams, laktatdehidrogenazei arba neutrofilams atliekant bronchoalveolinį plovimą, siekiant pašalinti nekenksmingas prastai tirpstančias daleles arba plaučius dirginančius aerozolius.

Pagrindinis tyrimas

14. Pagrindinis poūmio toksiškumo tyrimas paprastai atliekamas taikant tris koncentracijos lygius ir prireikus taikant vienalaikę neigiamą kontrolę (naudojant orą) ir (arba) nešiklio kontrolę (žr. 17 skirsnį). Parenkant poveikio lygius turėtų būti pasitelkiami visi turimi duomenys, įskaitant sisteminio toksiškumo tyrimų rezultatus, metabolizmo ir kinetinių savybių duomenis (labai svarbu užtikrinti, kad nebūtų taikomos tokios didžiausiosios koncentracijos, kuriomis būtų įsotinti kinetiniai procesai). Kiekviena bandomoji grupė sudaroma iš ne mažiau kaip dešimties graužikų (penkių patinų ir penkių patelių), kurie keturių savaičių laikotarpiu (bendra tyrimo trukmė – 28 dienos) penkias dienas per savaitę šešias valandas per parą veikiami bandomąja chemine medžiaga. Gyvūnai gali būti veikiami ir septynias dienas per savaitę (pvz., tiriant įkvepiamus vaistus). Jeigu žinoma, kad kurios nors lyties gyvūnai yra jautresni konkrečiai bandomajai cheminei medžiagai, siekiant nustatyti kuo tikslesnę koncentracijos ir reakcijos tarpusavio priklausomybę, kaip aprašyta 15 skirsnyje, skirtingų lyčių gyvūnams gali būti taikomi skirtingi koncentracijos lygiai. Jeigu naudojant kitos rūšies graužikus nei žiurkės dozė duodama tik per nosį, ilgiausia poveikio trukmė gali būti pakoreguojama siekiant sumažinti tos rūšies gyvūnų patiriamą kančią. Jeigu taikomas trumpesnis nei šešių valandų per parą poveikis arba jeigu būtina atlikti ilgalaikio (pvz., 22 valandų per parą) poveikio per visą kūną tyrimą, turėtų būti pateiktas atitinkamas pagrindimas [žr. RD Nr. 39 (2)]. Poveikio metu gyvūnas neturėtų būti šeriamas, išskyrus atvejus, kai poveikio trukmė ilgesnė kaip šešios valandos. Vandens gali būti duodama per visą poveikio per visą kūną laikotarpį.

15. Turėtų būti nurodyta, kokiam organui (-ams) skirtos pasirinktos tikslinės koncentracijos, ir taikant šias koncentracijas turėtų būti užtikrinta aiški koncentracijos ir reakcijos tarpusavio priklausomybė:

— taikant didžiausiąją koncentraciją turėtų būti padarytas toksinis poveikis, tačiau neturėtų pasireikšti ilgalaikių požymių arba gyvūnai neturėtų nugaišti, nes tokiu atveju nebūtų galima atlikti prasmingo vertinimo,

— tarpinis (-iai) koncentracijos lygis (-iai) turėtų skirtis tiek, kad būtų galima nustatyti toksinio poveikio lygius tarp mažiausiosios ir didžiausiosios koncentracijos,

— taikant mažiausiąją koncentraciją neturėtų būti daroma toksinio poveikio ir neturėtų būti pastebima jo požymių.

Pagalbinis (grįžtamumo) tyrimas

16. Siekiant nustatyti toksinio poveikio grįžtamumą, tvarumą arba delsą, reikiamos trukmės, bet ne ilgesniu kaip 14 dienų laikotarpiu po dozės davimo gali būti atliekamas pagalbinis (grįžtamumo) tyrimas. Pagalbinės (grįžtamumo tyrimų) grupės sudaromos iš penkių patinų ir penkių patelių, kurie per pagrindinį tyrimą veikiami kartu su bandomaisiais gyvūnais. Pagalbinės (grįžtamumo) grupės turėtų būti veikiamos didžiausiąja bandomosios cheminės medžiagos koncentracija; prireikus turėtų būti taikoma vienalaikė kontrolė naudojant orą ir (arba) nešiklį (žr. 17 skirsnį).

▼M4

Kontroliniai gyvūnai

17. Su vienalaikės neigiamos kontrolės (naudojant orą) gyvūnais turėtų būti elgiamasi taip pat, kaip su bandomosios grupės gyvūnais, išskyrus tai, kad jie veikiami išvalytu oru, o ne bandomąja chemine medžiaga. Jeigu siekiant palengvinti bandymo atmosferos sukūrimą naudojamas vanduo arba kita cheminė medžiaga, atliekant tyrimą naudojama nešiklio kontrolės grupė, o ne neigiamos kontrolės (naudojant orą) grupė. Jeigu įmanoma, kaip nešiklis turėtų būti naudojamas vanduo. Jeigu kaip nešiklis naudojamas vanduo, kontroliniai gyvūnai turėtų būti veikiami oru, kurio drėgnis turėtų būti toks pat, koks taikomas grupėms, kurioms duodama dozė. Tinkamas nešiklis turėtų būti parenkamas remiantis tinkamai atliktu išankstiniu tyrimu arba istoriniais duomenimis. Jeigu nešiklio toksiškumas nėra gerai žinomas, tyrimo vadovas gali nuspręsti taikyti ir neigiamą kontrolę (naudojant orą), ir nešiklio kontrolę, tačiau primygtinai rekomenduojama to nedaryti. Jeigu istoriniai duomenys rodo, kad nešiklis netoksiškas, neigiamos kontrolės (naudojant orą) grupės naudoti nebūtina, turėtų būti taikoma tik nešiklio kontrolė. Jeigu atlikus nešiklyje paruoštos bandomosios cheminės medžiagos išankstinį tyrimą nustatoma, kad medžiaga nėra toksiška, vadinasi, ir nešiklis, esant ištirtai koncentracijai, nėra toksiškas, todėl turėtų būti taikoma kontrolė naudojant šį nešiklį.

POVEIKIO SĄLYGOS

Koncentracijų taikymas

18. Gyvūnai veikiami bandomąja medžiaga dujų, garų, aerozolių arba jų mišinių pavidalu. Per tyrimą naudotina fizinė būsena priklauso nuo fizinių ir cheminių bandomosios cheminės medžiagos savybių, pasirinktos koncentracijos ir (arba) fizinio pavidalo, kuris veikiausiai bus tvarkant ir naudojant bandomąją cheminę medžiagą. Higroskopinės ir chemiškai reaguojančios bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti bandomos sauso oro sąlygomis. Turėtų būti imamasi atsargumo priemonių, kad būtų išvengta sprogių koncentracijų susidarymo. Iš dalelių sudaryta medžiaga gali būti apdorojama mechaniškai, siekiant sumažinti dalelių dydį. Daugiau patarimų pateikta RD Nr. 39 (2).

Dalelių dydžio pasiskirstymas

19. Dalelių rūšiavimas pagal dydį turėtų būti taikomas visiems aerozoliams ir garams, kurie gali kondensuotis ir tapti aerozoliais. Kad poveikis būtų padarytas visoms svarbioms kvėpavimo takų sritims, rekomenduojama naudoti aerozolius, kurių masės medianinis aerodinaminis skersmuo (MMAS) yra 1–3 μm, o geometrinis standartinis nuokrypis (σ_g) – 1,5–3,0 (4). Nors turėtų būti imamasi pagrįstų priemonių, kad šio standarto būtų laikomasi, jeigu jo įgyvendinti neįmanoma, turėtų būti pateikta ekspertų nuomonė. Pvz., metalų garų dalelės gali būti mažesnės už šį standartą, o įelektrintų dalelių ir pluoštų – didesnės.

Bandomosios cheminės medžiagos paruošimas nešiklyje

20. Geriausia, kad bandomoji cheminė medžiaga būtų bandoma nenaudojant nešiklio. Jeigu būtina naudoti nešiklį norint pasiekti reikiamą bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją ir užtikrinti reikiamą dalelių dydį, pirmenybė turėtų būti teikiama vandeniui. Visuomet, kai bandomoji cheminė medžiaga ištirpinama nešiklyje, turėtų būti įrodytas jos stabilumas.

POVEIKIO SĄLYGŲ STEBĖJIMAS

Oro srautas kameroje

21. Kiekvieno poveikio metu turėtų būti atidžiai reguliuojamas, nuolat stebimas ir ne rečiau kaip kartą per valandą registruojamas per poveikio kamerą tekantis oro srautas. Bandymo atmosferoje susidariusios koncentracijos (arba jos pastovumo laiko atžvilgiu) stebėjimas realiuoju laiku yra vienas iš visų dinaminių parametrų matavimų, suteikiantis galimybę netiesiogiai kontroliuoti visus svarbius dinaminius inhaliacinius parametrus. Jeigu koncentracija stebima tiesiogiai, oro srautų matavimo dažnumas gali būti

▼M4

sumažintas iki vieno matavimo kiekvieną dieną per kiekvieną poveikio seansą. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas tam, kad būtų išvengta pakartotinio įkvėpimo dozės davimo tik per nosį kamerose. Deguonies koncentracija turėtų būti ne mažesnė kaip 19 %, anglies dioksido – ne didesnė kaip 1 %. Jeigu yra pagrindo manyti, kad šio standarto įgyvendinti neįmanoma, turėtų būti matuojamos deguonies ir anglies dioksido koncentracijos. Jeigu pirmąją poveikio dieną atlikti matavimai rodo, kad šių dujų lygiai yra tinkami, daugiau matavimų atlikti nebūtina.

Kameros temperatūra ir santykinis drėgnis

22. Kameroje turėtų būti palaikoma 22 ± 3 °C temperatūra. Ir dozę duodant tik per nosį, ir per visą kūną, jeigu įmanoma, per kiekvieną poveikio seansą turėtų būti nuolat stebimas ir kas valandą registruojamas santykinis drėgnis gyvūnų kvėpavimo zonoje. Tinkamiausias santykinis drėgnis – 30–70 %, tačiau jis gali būti nepasiekiamas (pvz., bandant vandens pagrindo mišinius) arba neišmatuojamas dėl trukdžių, atsirandančių bandomajai cheminei medžiagai taikant bandymo metodą.

Bandomoji cheminė medžiaga. Vardinė koncentracija

23. Jeigu įmanoma, turėtų būti apskaičiuota ir užregistruota vardinė koncentracija poveikio kameroje. Vardinė koncentracija yra sukurtos bandomosios cheminės medžiagos masės ir viso oro srauto, perleisto per inhaliacinių kamerų sistemą, tūrio santykis. Vardinė koncentracija nėra naudojama apibūdinti poveikį gyvūnui, tačiau, vardinę koncentraciją palyginus su faktine, nustatomas generavimo, kurį užtikrina bandymų sistema, efektyvumas, kuriuo remiantis galima nustatyti generavimo problemas.

Bandomoji cheminė medžiaga. Faktinė koncentracija

24. Faktinė koncentracija yra bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, nustatyta paėmus ėminį iš inhaliacinėje kameroje esančios gyvūno kvėpavimo zonos. Faktines koncentracijas galima nustatyti specialiaisiais metodais (pvz., taikant tiesioginio ėminių ėmimo, adsorbcijos arba cheminių reakcijų metodus ir tada atliekant analizinį apibūdinimą) arba nespecialiaisiais metodais, pvz., atliekant gravimetrinę analizę naudojant filtrus. Gravimetrinė analizė gali būti taikoma tik vienos sudedamosios dalies miltelių aerozoliams arba mažo lakumo skystųjų dalelių aerozoliams ir turėtų būti grindžiama tinkamais prieš tyrimą atliktais bandomosios cheminės medžiagos savybių apibūdinimais. Iš daugiau kaip vienos sudedamosios dalies sudarytų miltelių aerozolių koncentracijos taip pat gali būti nustatomos atliekant gravimetrinę analizę. Tačiau tam reikalingi analitiniai duomenys, įrodantys, kad ore esančios medžiagos sudėtis panaši į pirminės medžiagos sudėtį. Jeigu tokios informacijos nėra, tyrimo metu gali reikėti vienodais intervalais atlikti pakartotinę bandomosios cheminės medžiagos (geriausia, kad ji būtų ore) analizę. Jeigu aerozolinės medžiagos gali garuoti arba sublimuoti, turėtų būti įrodyta, kad pasirinktu metodu surinktos visos fazės.

25. Jeigu įmanoma, per visą tyrimą turėtų būti naudojama viena bandomosios cheminės medžiagos partija, o bandomasis ėminys turėtų būti laikomas tokiomis sąlygomis, kad būtų išsaugotas jo grynumas, homogeniškumas ir stabilumas. Prieš pradedant tyrimą reikėtų apibūdinti bandomosios cheminės medžiagos savybes, įskaitant jos grynumą ir, jeigu tai techniškai įmanoma, tapatumą, taip pat nustatytų teršalų ir priemaišų kiekius. Be kitų duomenų, tai galima pagrįsti šiais duomenimis: sulaikymo trukme ir susijusia didžiausios koncentracijos sritimi, molekuline mase, nustatyta atlikus spektroskopinę arba dujų chromatografijos analizę, arba kitais įverčiais. Nors bandomojo ėminio tapatumo nustatymas nėra bandymų laboratorijos pareiga, bandymų laboratorijai gali būti naudinga patvirtinti bent kai kurias pateikėjo nurodytas savybes (pvz., spalvą, fizinę būseną ir t. t.).

▼M4

26. Jeigu įmanoma, turėtų būti palaikoma pastovi poveikio atmosfera. Poveikio sąlygų pastovumui įrodyti gali būti naudojamas stebėjimo realiuoju laiku prietaisas, pvz., aerozoliams gali būti naudojamas aerozolių fotometras, garams – bendro angliavandenilių kiekio analizatorius. Faktinė kameroje susidariusi koncentracija turėtų būti matuojama kiekvieną poveikio dieną, ne mažiau kaip tris kartus pagal kiekvieną poveikio lygį. Jeigu tai neįmanoma dėl nedidelių oro srauto greičių arba mažų koncentracijų, gali būti imamas vienas ėminys per vieną poveikio laikotarpį. Būtų geriausia, kad tokiu atveju šis ėminys būtų imamas per visą poveikio laikotarpį. Atskiri kameroje susidariusios koncentracijos ėminiai neturėtų nukrypti nuo vidutinės kameroje susidariusios koncentracijos daugiau kaip ± 10 %, kai tiriamos dujos ir garai, arba daugiau kaip ± 20 %, kai tiriami skystųjų arba kietųjų dalelių aerozoliai. Turėtų būti apskaičiuotas ir ataskaitoje nurodytas pusiausvyros nusistovėjimo kameroje laikotarpis (t_{95}). Poveikio laikotarpis apima bandomosios cheminės medžiagos sukūrimo trukmę. Į šį laikotarpį įtraukiamas pusiausvyros nusistovėjimo kameroje laikotarpis (t_{95}) ir irimo laikas. t_{95} apskaičiavimo gairės pateiktos RD Nr. 39 (2).

27. Jeigu tiriami labai sudėtingi mišiniai, sudaryti iš dujų ir (arba) garų, ir aerozoliai (pvz., deginimo atmosferos ir bandomosios cheminės medžiagos, pučiamos iš specialiai varomų galutinio naudojimo produktų arba prietaisų), kiekvienos fazės veikimas inhaliacinėje kameroje gali būti skirtingas. Todėl iš kiekvienos fazės (dujų ir (arba) garų ir aerozolio) turėtų būti parinkta bent viena indikacinė cheminė medžiaga (analitė); paprastai šiuo tikslu pasirenkama pagrindinė veiklioji mišinio cheminė medžiaga. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga yra mišinys, turėtų būti nurodyta viso mišinio, o ne tik veikliosios sudedamosios dalies arba indikacinės cheminės medžiagos (analitės) analizinė koncentracija. Daugiau informacijos apie faktines koncentracijas pateikta RD Nr. 39 (2).

Bandomoji cheminė medžiaga. Dalelių dydžio pasiskirstymas

28. Aerozolių dalelių dydžio pasiskirstymas turėtų būti nustatomas bent kartą per savaitę pagal kiekvieną koncentracijos lygį, naudojant pakopinį ėmiklį arba alternatyvų prietaisą, pvz., aerodinaminį dalelių rūšiuotuvą (ADR). Jeigu galima įrodyti, kad pakopiniu ėmikliu ir alternatyviu prietaisu gaunami lygiaverčiai rezultatai, atliekant tyrimą gali būti naudojamas alternatyvus prietaisas.

29. Siekiant įsitikinti pagrindinio prietaiso surenkamuoju veiksmingumu, kartu su pagrindiniu prietaisu turėtų būti naudojamas antrasis prietaisas, pvz., gravimetrinis filtras, gaudyklė arba barboteris. Atlikus dalelių dydžio analizę nustatyta masės koncentracija turėtų neviršyti priimtinų filtruojamosios analizės būdu nustatytos masės koncentracijos ribų [žr. RD Nr. 39 (2)]. Jeigu, taikant visas bandomas koncentracijas, lygiavertiškumą galima įrodyti pradiniame tyrimo etape, tolesnius patvirtinamuosius matavimus galima praleisti. Gyvūnų gerovės sumetimais turėtų būti imamasi priemonių, kad būtų kuo mažiau negalutinių duomenų, dėl kurių galėtų reikėti pakartoti tyrimą.

30. Garuose esančios dalelės turėtų būti rūšiuojamos tuo atveju, jeigu bent kiek tikėtina, kad susidarant aerozoliui gali kondensuotis garai, arba jeigu garų atmosferoje aptinkama dalelių, dėl kurių gali susidaryti mišrių fazių.

STEBĖJIMAI

31. Prieš poveikio laikotarpį, poveikio laikotarpiu ir pasibaigus poveikio laikotarpiui, turėtų būti atliekami klinikiniai gyvūnų stebėjimai. Atsižvelgiant į gyvūnų reakciją poveikio laikotarpiu, stebėjimus gali reikėti atlikti dažniau. Jeigu gyvūnų stebėjimą apsunkina gyvūnų uždaromųjų vamzdelių naudojimas, prastas poveikio per visą kūną kamerų apšvietimas arba neskaidrios atmosferos, gyvūnai turėtų būti atidžiai apžiūrimi po dozės davimo. Stebėjimais prieš kitos dienos poveikį galima įvertinti toksinio poveikio grįžtamumą arba pasunkėjimą.

▼M4

32. Visi stebėjimai registruojami, išsaugant atskirus įrašus apie kiekvieną gyvūną. Kai gyvūnai numarinami dėl humaniškų priežasčių arba randami nugaišę, kiek įmanoma tiksliau užregistruojamas žūties laikas.

33. Narveliuose turėtų būti stebimi odos ir kailio, akių ir gleivinės, kvėpavimo ir kraujotakos sistemų, centrinės nervų sistemos, somatomotorinės veiklos ir elgsenos pakitimai. Ypač reikėtų stebėti, ar nepasireiškia drebulys, traukuliai, viduriavimas, mieguistumas, miego ir komos būsenos, ar neteka seilės. Matuojant temperatūrą tiesiojoje žarnoje, galima gauti patvirtinamųjų sulėtėjusio kvėpavimo arba nukritusios ar pakilusios temperatūros įrodymų, susijusių su dozės davimu arba izoliavimu. Į tyrimo protokolą gali būti įtraukti papildomi vertinimai, pvz., kinetikos, biomonitoringo, plaučių funkcijos, plaučių audinyje besikaupiančių mažo tirpumo medžiagų užsilaikymo ir elgsenos pokyčių.

KŪNO MASĖ

34. Kiekvieno gyvūno masė turėtų būti registruojama prieš pat pirmąjį poveikį (nulinę dieną), o vėliau – dukart per savaitę (pvz., pirmadieniais ir penktadieniais, siekiant įrodyti gyvūnų atsigavimą per savaitgalį, kai nedaroma poveikio, arba tokiais laiko intervalais, kad būtų galima įvertinti sisteminį toksiškumą) ir kai gyvūnas nugaišta arba yra numarinamas. Jeigu per pirmąsias dvi savaites nepasireiškia jokio poveikio, likusiu tyrimo laikotarpiu kūno masė gali būti matuojama kas savaitę. Pagalbiniai (grįžtamumo tyrimų) gyvūnai (jeigu naudojami) atsigavimo laikotarpiu turėtų būti ir toliau sveriami kas savaitę. Baigus tyrimą, visi gyvūnai turėtų būti pasverti netrukus po numarinimo, kad būtų galima tiksliai apskaičiuoti organų ir kūno masių santykius.

PAŠARŲ IR VANDENS SUVARTOJIMAS

35. Pašarų suvartojimas turėtų būti matuojamas kas savaitę. Gali būti matuojamas ir vandens suvartojimas.

KLINIKINĖ PATOLOGIJA

36. Klinikinės patologijos vertinimai turėtų būti taikomi visiems gyvūnams, įskaitant kontrolinius ir pagalbinius (grįžtamumo tyrimų) gyvūnus, kai jie numarinami. Turėtų būti užregistruotas laikotarpis nuo poveikio pabaigos iki kraujo paėmimo, ypač jeigu tiriama pasekmė sparčiai nyksta. Ėminių ėmimas baigus duoti dozę būtinas pagal tuos parametrus, kuriems būdingas trumpas plazmos pusinės eliminacijos laikas (pvz., COHb, CHE ir MetHb).

37. 1 lentelėje nurodyti klinikinės patologijos parametrai, kurie paprastai privalomi atliekant visus toksikologinius tyrimus. Nereikalaujama visada atlikti šlapimo analizę, tačiau ji gali būti atliekama, jeigu manoma, kad tai būtų naudinga atsižvelgiant į numatomą arba nustatytą toksiškumą. Kad būtų geriau apibūdintas bandomosios cheminės medžiagos toksiškumas, tyrimo vadovas gali nuspręsti įvertinti papildomus parametrus (pvz., cholinesterazė, lipidai, hormonai, rūgščių ir bazių balansas, methemoglobinas arba Heinco kūneliai, kreatino kinazė, mieloidų ir eritroidų santykis, troponinai, arterinio kraujo dujos, laktato dehidrogenazė, sorbitolio dehidrogenazė, glutamato dehidrogenazė ir gamaglutamiltranspeptidazė.

▼M4

1 lentelė

Įprastiniai klinikinės patologijos parametrai

Hematologiniai tyrimai	
Eritrocitų kiekis	Bendras leukocitų kiekis
Hematokritas	Įvairių leukocitų kiekiai
Hemoglobino koncentracija	Trombocitų kiekis
Vidutinis hemoglobino kiekis eritrocituose	Krešėjimo aktyvumas (pasirinkti vieną rodiklį):
Vidutinis eritrocito tūris	— Protrombino laikas
Vidutinė eritrocitų hemoglobino koncentracija	— Krešėjimo laikas
Retikulocitai	— Dalinis tromboplastino laikas
Klinikinės chemijos tyrimai	
Gliukozė (*)	Alanino aminotransferazė
Bendras cholesterolio kiekis	Aspartato aminotransferazė
Trigliceridai	Šarminė fosfatazė
Kraujo šlapalo azoto kiekis	Kalis
Bendras bilirubino kiekis	Natris
Kreatininas	Kalcis
Bendras baltymų kiekis	Fosforas
Albuminas	Chloridas
Globulinas	
Šlapimo analizė (neprivaloma)	
Išvaizda (spalva ir drumstumas)	Bendras baltymų kiekis
Tūris	Gliukozė
Savitasis svoris arba osmosinis slėgis	Kraujas ir (arba) kraujo kūneliai
pH	

(*) Kadangi dėl ilgo nešėrimo laikotarpio gali atsirasti gliukozės kiekio matavimo skirtumų, lyginant gavusius dozę ir kontrolinius gyvūnus, tyrimo vadovas turėtų nustatyti, ar reikėtų nešerti gyvūnų. Jeigu taikomas nešėrimo laikotarpis, jis turėtų būti pritaikytas naudojamai rūšiai; žiurkėms turėtų būti taikomas 16 val. laikotarpis (nešėrimas per naktį). Gliukozės kiekis nešeriamų gyvūnų organizme gali būti nustatomas po nešėrimo per naktį paskutiniąją poveikio savaitę arba po nešėrimo per naktį prieš skrodimą (pastaruoju atveju – kartu su visais kitais patologijos parametrais).

38. Jeigu yra įrodymų, kad pagrindinė kaupimosi ir užsilaikymo vieta yra apatiniai kvėpavimo takai (t. y. alveolės), tada, norint kiekybiškai išanalizuoti prielaidomis pagrįsto dozės poveikio parametrus, daugiausia dėmesio skiriant alveolitui, plaučių uždegimui ir fosfolipidozei, būtų galima rinktis bronchoalveolinio plovimo (BAP) metodą. Šis metodas suteikia galimybę tinkamai ištirti dozės ir reakcijos tarpusavio priklausomybę ir per tam tikrą laiką įvykusius alveolių pažeidimų pokyčius. BAP skystis gali būti analizuojamas siekiant nustatyti įvairių leukocitų kiekius, bendrą baltymų kiekį ir laktato dehidrogenazę. Kiti parametrai, į kuriuos būtų galima atsižvelgti, yra parametrai, rodantys lizosomų pažeidimus, fosfolipidozę, fibrozę ir dirginamąjį arba alerginį uždegimą, galbūt įtraukiant uždegimą sukeliančių citokinų ir (arba) chemokinų tyrimą. BAP matavimais paprastai papildomi histopatologinių tyrimų rezultatai, tačiau BAP matavimai negali atstoti šių tyrimų rezultatų. Plaučių plovimo gairės pateiktos RD Nr. 39 (2).

▼M4

BENDROJI PATOLOGIJA IR ORGANŲ MASĖ

39. Turėtų būti visiškai nuleidžiamas visų bandomųjų gyvūnų, įskaitant nugaišusius atliekant bandymą arba numarintus ir pašalintus iš tyrimo gyvūnų gerovės sumetimais, kraujas (jeigu įmanoma) ir atliekamas šių gyvūnų bendrasis skrodimas. Turėtų būti užregistruotas laikas nuo kiekvieno paskutinio dozės davimo kiekvienam gyvūnui iki to gyvūno numarinimo. Jeigu skrodimo negalima atlikti iš karto po to, kai aptinkamas nugaišęs gyvūnas, gyvūnas turėtų būti laikomas pakankamai šaltoje vietoje (bet neužšaldomas), siekiant kuo labiau pristabdyti autolizę. Skrodimai turėtų būti atliekamai kaip galima anksčiau, paprastai – per dieną arba dvi. Visi dideli patologiniai pakitimai turėtų būti užregistruojami pagal kiekvieną gyvūną, ypatingą dėmesį skiriant kvėpavimo takų pakitimams.

40. 2 lentelėje nurodyti organai ir audiniai, kurie turėtų būti užkonservuojami atliekant bendrąjį skrodimą, naudojant histopatologiniam tyrimui tinkamą fiksavimo terpę. Skliausteliuose ([…]) nurodyti organai ir audiniai, taip pat kai kurie kiti organai ir audiniai, dėl kurių konservavimo sprendžia tyrimo vadovas. **Paryškintuoju** šriftu nurodytieji organai turėtų būti nuvalyti ir pasverti kaip galima greičiau po atskyrimo, kol neišdžiuvo. Skydliaukė ir sėklidžių prielipai turėtų būti sveriami tik esant reikalui, nes valymo įrankiai gali pakenkti histopatologiniam tyrimui. Audiniai ir organai turėtų būti fiksuojami 10 % buferiniame formaline arba kitokiame tinkamame fiksatyve kaip galima greičiau po skrodimo, ne mažiau kaip 24–48 valandos iki valymo, atsižvelgiant į ketinamą naudoti fiksatyvą.

2 lentelė

Atliekant bendrąjį skrodimą konservuojami organai ir audiniai

Antinksčiai	Sėklinės pūslelės
Kaulų čiulpai (ir (arba) šviežiai paruošta punkcija)	Stuburo smegenys (sprando, krūtinės ląstos ir juosmens)
Smegenys (įskaitant didžiųjų smegenų, smegenėlių ir pailgųjų smegenų (smegenų tilto) išpjovas)	**Blužnis**
[Akys (tinklainė, regos nervas) ir akių vokai]	Skrandis
Širdis	**Sėklidės**
Inkstai	**Užkrūčio liauka**
Gerklos (trys lygiai, į vieną lygį įtraukiant antgerklio pagrindą)	Skydliaukė
Kepenys	Trachėja (ne mažiau kaip du lygiai, iš kurių vienas – išilginis keteros pjūvis ir vienas – skersinis pjūvis
Plaučiai (visos vieno lygmens skiltys, įskaitant pagrindinius bronchus)	[Šlapimo pūslė]
Limfmazgiai, imami iš plaučių vartų srities, ypač jeigu tiriamos mažo tirpumo kietųjų dalelių bandomosios cheminės medžiagos. Atliekant nuodugnesnius tyrimus, per kuriuos nagrinėjami imuniniai aspektai, gali būti imama daugiau mazgų, pvz., iš tarpuplaučio, kaklo, pažandžių ir (arba) ausų sričių.	Gimda
	Visi labai pakitę audiniai
Nosiaryklės audiniai (ne mažiau keturių lygių; į vieną lygį įtraukiant nosiaryklės latakus ir nosies limfinius audinius (NLA))	
Stemplė	
[Uoslės receptoriai]	
Kiaušidės	

▼M4

41. Plaučiai turėtų būti išimami sveiki, pasveriami ir apdorojami tinkamu fiksatyvu užtikrinant 20–30 cm vandens sluoksnio slėgį, kad būtų išsaugota plaučių struktūra (5). Išpjovos turėtų būti imamos iš visų vieno lygmens skilčių, įskaitant pagrindinius bronchus, bet, jeigu atliekamas plaučių plovimas, neišplautos skiltys turėtų būti išpjaunamos trimis lygmenimis (ne iš eilės).

42. Tiriami ne mažiau kaip keturi nosiaryklės audinių lygiai; vienas iš jų turėtų apimti nosinę ryklės angą (5, 6, 7, 8, 9), kad būtų galima tinkamai ištirti ragėjantįjį, pereinamąjį (be blakstienėlių, kvėpuojamąjį), kvėpuojamąjį (su blakstienėlėmis, kvėpuojamąjį) ir uodžiamąjį epitelius bei limfodrenažinį audinį (NALT; 10, 11). Turėtų būti ištirti trys gerklų lygiai; vienas iš jų turėtų apimti antgerklio pagrindą. Turėtų būti ištirti ne mažiau kaip du trachėjos lygiai; vienas iš jų turėtų būti išilginis pagrindinių bronchų išsišakojimo keteros pjūvis ir vienas – skersinis pjūvis.

HISTOPATOLOGINIS TYRIMAS

43. Turėtų būti atliktas visų 2 lentelėje nurodytų organų ir audinių histopatologinis tyrimas, apimantis kontrolinę ir didžiausiosios koncentracijos grupes, taip pat visus gyvūnus, kurie tyrimo metu nugaišo arba buvo numarinti. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas kvėpavimo takams, tiksliniams organams ir labai pakitusiems audiniams. Visose grupėse turėtų būti tiriami didžiausiosios koncentracijos grupės gyvūnų organai ir audiniai, dėl kurių nustatyta pakitimų. Norėdamas įrodyti aiškią reakciją į tam tikrą koncentraciją, tyrimo vadovas gali nuspręsti atlikti papildomų grupių histopatologinius tyrimus. Jeigu naudojama pagalbinė (grįžtamumo tyrimų) grupė, atliekant histopatologinį tyrimą turėtų būti tiriami visi audiniai ir organai, kuriems padarytas poveikis dozę gavusiose grupėse. Jeigu didžiausiosios koncentracijos grupėje nebaigus bandymo nugaišta labai daug gyvūnų ar kyla kitokių problemų, mažinančių duomenų reikšmingumą, turėtų būti atliktas kito pagal dydį (mažesnio) koncentracijos lygio histopatologinis tyrimas. Reikėtų mėginti rasti sąsajų tarp bendrųjų stebėjimų ir mikroskopinės analizės rezultatų.

DUOMENYS IR ATASKAITOS

Duomenys

44. Turėtų būti pateikti kiekvieno gyvūno kūno masės, pašarų suvartojimo, klinikinės patologijos tyrimų, organų masės ir histopatologinių tyrimų duomenys. Klinikinių stebėjimų duomenys turėtų būti apibendrinti lentelėse, pagal kiekvieną bandomąją grupę nurodant naudotų gyvūnų skaičių, gyvūnų, kuriems pasireiškė toksiškumo požymių, skaičių, atliekant bandymą nugaišusių arba dėl humaniškų priežasčių numarintų gyvūnų skaičių, kiekvieno gyvūno žūties laiką, taip pat pateikiant toksinio poveikio aprašymą, pasireiškimo laiką ir grįžtamumą, skrodimo išvadas. Visi rezultatai – kiekybiniai ir papildomi – turėtų būti įvertinti taikant tinkamą statistinį metodą. Gali būti taikomas bet kuris visuotinai pripažintas statistinis metodas; statistiniai metodai turėtų būti parenkami planuojant tyrimą.

Bandymo ataskaita

45. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikta tokia informacija (jeigu taikytina):

Bandomieji gyvūnai ir jų laikymas

— Laikymo sąlygų aprašymas, nurodant gyvūnų skaičių narvelyje (arba skaičiaus pokytį), kraiko medžiagą, aplinkos temperatūrą ir santykinį drėgnį, šviesos ir tamsos kaitą paros metu ir šėrimo režimą.

▼M4

— Naudota rūšis (padermė) ir, jeigu tai ne žiurkės, kitos rūšies naudojimo pagrindimas. Gali būti pateikti pirminiai ir istoriniai duomenys, jeigu jie gauti tiriant gyvūnus, kuriems buvo taikomos panašios poveikio, laikymo ir nešėrimo sąlygos.

— Gyvūnų skaičius, amžius ir lytis.

— Atsitiktinės atrankos metodas.

— Prieš bandymą sudarytų sąlygų aprašymas, nurodant šėrimo režimą, izoliavimo ir apsaugos nuo ligų būdą.

Bandomoji cheminė medžiaga

— Fizinė būsena, grynumas ir, jeigu taikytina, fizinės ir cheminės savybės (įskaitant izomeriją).

— Identifikavimo duomenys ir Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos (angl. CAS) registracijos numeris, jeigu jis žinomas.

Nešiklis

— Nešiklio naudojimo pagrindimas ir nešiklio parinkimo pagrindimas (jeigu tai ne vanduo).

— Istoriniai arba vienalaikiai duomenys, įrodantys, kad nešiklis nedaro neigiamo poveikio tyrimo rezultatams.

Inhaliacinė kamera

— Išsamus inhaliacinės kameros aprašas, nurodant tūrį ir pateikiant diagramą.

— Įrangos, naudotos darant poveikį gyvūnams ir kuriant atmosferą, šaltinis ir aprašas.

— Temperatūros, drėgnio, dalelių dydžio ir faktinės koncentracijos matavimo įranga.

— Oro šaltinis ir kondicionavimo sistema.

— Įrangos kalibravimo siekiant užtikrinti homogenišką bandymo atmosferą metodai.

— Slėgių skirtumas (teigiamas ar neigiamas).

— Kameroje esančios dozės davimo angos (jeigu dozė duodama tik per nosį); gyvūnų vieta kameroje (jeigu dozė duodama per visą kūną).

— Bandymo atmosferos pastovumas.

— Temperatūros ir drėgnio jutiklių vieta ir kameroje sukurtos bandymo atmosferos ėminių ėmimas.

— Tiekiamo ir (arba) ištraukiamo oro apdorojimas.

— Oro srauto greičiai, per dozės davimo angą tekančio oro srauto greitis (jeigu dozė duodama tik per nosį) arba gyvūnų kiekis kameroje (jeigu dozė duodama per visą kūną).

— Inhaliacinės kameros pusiausvyros pasiekimo laikas (t_{95}).

— Tūrio pokyčių kiekis per valandą.

— Matavimo prietaisai (jeigu naudojami).

Poveikio duomenys

— Tikslinės koncentracijos parinkimo pagrindiniam tyrimui pagrindimas.

▼M4

— Vardinės koncentracijos (inhaliacinėje kameroje sukurtos bandomosios cheminės medžiagos bendrosios masės ir viso per kamerą perleisto oro srauto tūrio santykis).

— Faktinės bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, nustatytos gyvūnų kvėpavimo zonoje; jeigu bandomi mišiniai, įgaunantys įvairias fizines būsenas (dujos, garai, aerozoliai), kiekviena iš šių būsenų gali būti analizuojama atskirai.

— Visos koncentracijos ore turėtų būtų nurodomos masės vienetais (pvz., mg/l, mg/m^3 ir t. t.), o ne tūrio vienetais (pvz., ppm, ppb ir t. t.).

— Dalelių dydžio pasiskirstymas, masės medianinis aerodinaminis skersmuo (MMAS) ir geometrinis standartinis nuokrypis (σ_g), nurodant jų apskaičiavimo metodus. Turėtų būti pateiktos atliktos atskiros dalelių dydžio analizės.

Bandymo sąlygos

— Išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos paruošimą, nurodant procedūras, taikytas siekiant sumažinti kietųjų medžiagų dalelių dydį arba paruošti bandomosios cheminės medžiagos tirpalus.

— Įrangos, naudotos kuriant bandymo atmosferą ir veikiant gyvūnus bandymo atmosfera, aprašas (pageidautina, pateikiant diagramą).

— Išsami informacija apie įrangą, naudotą stebėti kameros temperatūrą, drėgnį ir oro srautą kameroje (t. y. kalibravimo kreivės nubrėžimas).

— Išsami informacija apie įrangą, naudotą imti ėminius, skirtus nustatyti kameroje susidariusią koncentraciją ir dalelių dydžio pasiskirstymą.

— Išsami informacija apie taikytą cheminės analizės metodą ir metodo tinkamumo patvirtinimą (nurodant bandomosios cheminės medžiagos regeneravimo iš ėminių ėmimo terpės veiksmingumą).

— Atsitiktinės atrankos, taikytos suskirstant gyvūnus į bandomąją ir kontrolinę grupes, metodas.

— Išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę (nurodant pašaro tipą ir (arba) šaltinį, vandens šaltinį).

— Bandomųjų koncentracijų parinkimo pagrindimas.

Rezultatai

— Kameros temperatūrų, drėgnio ir oro srautų lentelės.

— Kameros vardinės ir faktinės koncentracijos duomenų lentelės.

— Dalelių dydžių lentelės, pateikiant analizinių ėminių ėmimo duomenis, dalelių dydžių pasiskirstymą ir MMAS bei σ_g skaičiavimus.

— Kiekvieno gyvūno reakcijos duomenų ir koncentracijos lygio lentelės (t. y. gyvūnų, kuriems pasireiškė toksiškumo požymių, įskaitant gaištamumą, poveikio pobūdį, sunkumą, pasireiškimo laiką ir trukmę).

▼M4

— Kiekvieno gyvūno masės lentelės.

— Pašaro suvartojimo lentelės.

— Klinikinės patologijos duomenų lentelės.

— Kiekvieno gyvūno skrodimo išvados ir histopatologinių tyrimų rezultatai, jeigu yra.

— Visų kitų išmatuotų parametrų lentelės.

Rezultatų aptarimas ir aiškinimas

— Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas metodų, taikytų siekiant laikytis šio bandymo metodo kriterijų, pvz., susijusių su ribine koncentracija arba dalelių dydžiu, aprašymui.

— Atsižvelgiant į bendruosius rezultatus, turėtų būti aprašyta dalelių įkvėpimo galimybė, ypač jeigu nebuvo įmanoma taikyti dalelių dydžio kriterijaus.

— Pateikiant bendrąjį tyrimo vertinimą, turėtų būti nurodytas metodų, taikytų nustatyti vardines ir faktines koncentracijas, nuoseklumas ir faktinės koncentracijos santykis su vardine koncentracija.

— turėtų būti aprašyta tikėtina žūties priežastis ir vyraujantis veikimo būdas (sisteminis ar vietinis).

— Atsižvelgiant į OECD rekomendaciniame dokumente dėl pasekmių žmonėms (3) nustatytus kriterijus, turėtų būti pateiktas paaiškinimas, ar kilo poreikis humaniškai numarinti gyvūnus, patiriančius skausmą arba sunkią ilgalaikę kančią.

— Turėtų būti nurodytas (-i) tikslinis (-iai) organas (-ai).

— Turėtų būti apibrėžti nepastebimo neigiamo poveikio lygis (NNPL) ir mažiausio pastebimo neigiamo poveikio lygis (MPNPL).

LITERATŪRA

1. OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

2. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

3. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in SAFEty Evaluation, Environmental Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

4. Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

5. Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229–258.

6. Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309–312.

7. Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231–238.

▼**M4**

8. Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215–263.

9. Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353–372.

10. Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219–224.

11. Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140–141: 281–285.

12. Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419–428.

13. 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353, 2008 12 31, p. 1.

▼**M4**

1 priedėlis

APIBRĖŽTIS

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

▼C1

B.9. **KARTOTINIŲ DOZIŲ (28 DIENŲ) TOKSIŠKUMAS (PER ODĄ)**

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Žr. Bendrojo įvado B dalies A skirsnį.

1.2. APIBRĖŽTYS

Žr. Bendrojo įvado B dalies B skirsnį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandomoji medžiaga 28 dienas kiekvieną dieną dedama ant odos fiksuoto dydžio dozėmis kelioms eksperimentinių gyvūnų grupėms, viena dozė – vienai grupei. Veikimo laikotarpiu gyvūnai stebimi kiekvieną dieną toksiškumo požymiams nustatyti. Gyvūnams, kurie nugaišta bandymo metu, atliekama nekroskopija, bandymą užbaigus išlikusiems gyvūnams taip pat atliekama nekroskopija.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Pasirengimas**

Gyvūnai laikomi eksperimentinėmis laikymo ir šėrimo sąlygomis ne trumpiau kaip penkias dienas iki eksperimento pradžios. Prieš bandymą sveiki jauni gyvūnai atrenkami „aklos atrinkties“ metodu ir paskiriami į poveikio ir kontrolines grupes. Prieš pat bandymą nuo bandomųjų gyvūnų kūno sprando srityje nukerpamas kailis. Galima ir skusti, bet tai turėtų būti atliekama apytikriai prieš 24 valandas iki bandymo. Pakartotinai kirpti arba skusti paprastai reikia apytikriai kas savaitę. Jeigu kailis kerpamas arba skutamas, reikia stengtis nesubraižyti odos. Bandomajai medžiagai uždėti turėtų būti nukerpama ne mažiau kaip 10 % kūno paviršiaus. Sprendžiant, nuo kokio dydžio ploto pašalinti kailį, turėtų būti atsižvelgiama į gyvūno kūno svorį, ir į apdangalo dydį. Jeigu bandomos kietosios medžiagos, kurios prireikus gali būti susmulkinamos į miltelius, bandomoji medžiaga turėtų būti pakankamai sudrėkinama vandeniu arba, tam tikrais atvejais, atitinkamu nešikliu, kad būtų užtikrintas geras sąlytis su oda. Skystos bandomosios medžiagos paprastai naudojamos neskiestos. Medžiaga dedama ant odos nuo penkių iki septynių kartų per savaitę.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

1.6.2.1. *Bandomieji gyvūnai*

Gali būti naudojamos suaugusios žiurkės, triušiai arba jūrų kiaulytės. Gali būti naudojamos kitos rūšys, bet jų naudojimas turėtų būti pagrindžiamas.

▼C1

Bandymo pradžioje naudojamų gyvūnų svorio intervalas turėtų būti ne daugiau kaip ± 20 % atitinkamo vidutinio svorio.

1.6.2.2. *Skaičius ir lytis*

Kiekvieno dydžio dozė bandoma su ne mažiau 10 gyvūnų (penkios patelės ir penki patinėliai), turinčių sveiką odą. Patelės turėtų būti neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos. Jeigu numatoma, kad bandymo eigoje dalį gyvūnų teks numarinti, pradinis jų skaičius atitinkamai padidinamas. Be to, papildomai 10 gyvūnų grupei (po penkis kiekvienos lyties gyvūnus) galima skirti didelę medžiagos dozę 28 dienas ir 14 dienų po veikimo medžiaga stebėti toksinio poveikio grįžtamumą, pastovumą ar uždelstumą. Taip pat naudojama papildoma 10 kontrolinių gyvūnų grupė (po penkis kiekvienos lyties gyvūnus).

1.6.2.3. *Dozavimas*

Reikalingos ne mažiau kaip trys dozės, kontrolinė grupė arba nešiklio kontrolinė grupė, jeigu naudojamas nešiklis. Veikimo laikas turėtų būti ne trumpesnis kaip šešios valandos per dieną. Bandomoji medžiaga turėt būti uždedama panašiu laiku kiekvieną dieną ir tam tikrais intervalais (kas savaitę arba kas dvi savaites) suderinami taip, kad gyvūno kūno svorio atžvilgiu būtų išlaikoma pastovi dozė. Su kontrolinės grupės gyvūnais reikia elgtis lygiai taip pat kaip ir su bandomaisiais gyvūnais, išskyrus tai, kad jie negauna bandomosios medžiagos. Didžiausia dozė turėtų būti tokia, kad sukeltų toksinį poveikį, bet nesukeltų gyvūnų žūties (arba tik nedidelį gaištamumą). Mažiausia dozė turėtų būti tokia, kad nebūtų pastebėta jokių toksiškumo požymių. Jeigu yra tinkamas poveikio žmogui įvertinimas, mažiausia dozė turėtų būti šiek tiek didesnė už poveikio žmogui dozę. Būtų geriausia, jeigu vidurinė dozė būtų tokia, kad sukeltų mažiausią pastebimą toksinį poveikį. Jeigu naudojama daugiau tarpinių dozių, jos turėtų būti išskirstomos intervalais taip, kad toksinis poveikis būtų laipsniškas. Mažų ir tarpinių dozių bei kontrolinėje grupėse gaištamumas turėtų būti nedidelis, kad būtų galima prasmingai įvertinti rezultatus.

Jeigu uždėta bandomoji medžiaga sukelia stiprų odos dirginimą, koncentracijos turėtų būti sumažinamos, ir dėl to gali susilpnėti kitas toksinis poveikis ar jo iš viso gali nebūti gavus didelę medžiagos dozę. Be to, jeigu oda labai stipriai pažeidžiama, bandymą gali reikėti nutraukti ir pradėti naują bandymą naudojant mažesnės koncentracijos dozes.

1.6.2.4. *Ribinis bandymas*

Jeigu preliminarus bandymas naudojant 1 000 mg/kg dozę arba didesnę dozę, susijusią su tikėtinu poveikiu žmogui, jeigu toks žinomas, nesukelia aiškaus toksinio poveikio, bandymo galima nebetęsti.

1.6.2.5. *Stebėjimo laikotarpis*

Bandomieji gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną, siekiant nustatyti toksiškumo požymius. Turėtų būti registruojamas nugaišimo laikas ir laikas, kada atsirado ir išnyko toksiškumo požymiai.

▼C1

1.6.3. **Bandymo eiga**

Gyvūnai turėtų būti laikomi atskiruose narveliuose. Gyvūnai veikiami bandomąja medžiaga 28 dienas, geriausiai septynias dienas per savaitę. Gyvūnai, esantys papildomoje grupėje, skirtoje toliau stebėti, turėtų būti laikomi dar 14 dienų jiems neduodant bandomosios medžiagos, kad būtų galima nustatyti atsigavimą po toksinio poveikio arba tokio poveikio užsitęsimą. Veikimo bandomąja medžiaga trukmė turi būti ne trumpesnė kaip šešios valandos per dieną.

Bandomoji medžiaga turėtų būti tolygiai uždedama ant plotelio, kurio dydis sudaro apie 10 % viso kūno paviršiaus. Jeigu medžiagos labai toksiškos, veikiamas paviršius gali būti mažesnis, bet kaip galima didesnis plotas turėtų būti padengiamas kuo plonesniu ir tolygesniu sluoksniu.

Veikimo laikotarpiu bandomoji medžiaga turėtų būti laikoma ant odos akytu marlės tvarsčiu ir nedirginančia lipnia juostele. Bandomoji vieta apdengiama papildomai, kad laikytųsi marlės tvarstis su bandomąja medžiaga, ir būtų užtikrinama, kad gyvūnai nepraris bandomosios medžiagos. Gali būti naudojami ribotuvai, kad bandomoji medžiaga nebūtų praryjama, bet visiško imobilizavimo metodas nerekomenduojamas. Gali būti taikomas ir „apsauginio antkaklio“ metodas.

Pasibaigus veikimo laikotarpiui, bandomosios medžiagos likutis turėtų būti pašalinamas, jeigu tinka – naudojant vandenį ar kokį kitą tinkamą odos valymo būdą.

Visi gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną, o toksiškumo požymiai registruojami nurodant jų pasireiškimo laiką, laipsnį ir trukmę. Turėtų būti stebimi odos ir kailio, akių ir akies gleivinės pokyčiai, taip pat kvėpavimo, kraujo apytakos, vegetacinės ir centrinės nervų sistemų pokyčiai, somatomotorinio aktyvumo ir elgsenos sutrikimai. Kiekvieną savaitę turėtų būti nustatomas gyvūnų svoris. Taip pat rekomenduojama kiekvieną savaitę matuoti suvartoto pašaro kiekį. Reguliarus gyvūnų stebėjimas yra reikalingas tam, kad būtų užtikrinama, jog bandomieji gyvūnai nebus prarasti dėl tokių priežasčių kaip kanibalizmas, audinių autolizė arba narvo pastatymas netinkamoje vietoje. Bandymo laikotarpio pabaigoje išlikusiems ne pagalbinės grupės gyvūnams atliekama nekroskopija. Gaištantys gyvūnai ir gyvūnai, kenčiantys dideles kančias ar skausmą, kai tik pastebima, turėtų būti pašalinami iš bandymo, humaniškai numarinami ir atliekama jų nekroskopija.

Bandymo pabaigoje visiems gyvūnams, taip pat ir kontroliniams, atliekami tokie tyrimai:

1) hematologija, taip pat bent jau kraujo kūnelių, hemoglobino koncentracijos, eritrocitų kiekio apskaičiavimas, visas ir diferencinis leukocitų kiekis ir krešėjimo matavimas;

2) klinikinė kraujo biochemija, įskaitant ne mažiau kaip vieną kepenų ir inkstų funkcijų parametrą: alanino aminotransferazės serumas (anksčiau žinomas kaip glutamo piruvo transaminazė), aspartate aminotransferazės serumas (anksčiau žinomas kaip glutamo oksalato transminazė), šlapimo azotas, albuminas, kraujo kreatininas, visas bilirubino kiekis ir visas serumo baltymų kiekis.

Kitus tyrimus, kurie gali būti reikalingi kompetentingam toksikologiniam įvertinimui atlikti, sudaro kalcio, fosforo, chloro, natrio, kalio, badavimo gliukozės nustatymas, lipidų, hormonų, rūgščių/šarmų pusiausvyros, methemoglobino, cholinesterazės aktyvumo analizė.

▼C1

Atitinkamais atvejais gali būti atliekami papildomi klinikinės biochemijos tyrimai siekiant išsamiau ištirti pastebėtą toksinį poveikį.

1.6.4. **Bendroji nekroskopija**

Visiems bandomiesiems gyvūnams turėtų būti atliekama visa bendroji nekroskopija. Bent jau kepenys, inkstai, antinksčiai ir sėklidės turėtų būti pasveriami drėgni tuojau pat po nekroskopijos, kad neišdžiūtų. Organai ir audiniai (tai yra tie organai, kurie turi didelių matomų pakenkimų arba kurių dydis pakitęs) turėtų būti konservuojami atitinkamoje terpėje galimam histopatologiniam ištyrimui ateityje.

1.6.5. **Histopatologinis ištyrimas**

Turėtų būti atliekamas didelės dozės grupės ir kontrolinės grupės gyvūnų užkonservuotų organų ir audinių histologinis ištyrimas. Bandomosios medžiagos pažeisti didžiausios koncentracijos grupės gyvūnų organai ir audiniai turėtų būti ištiriami visose mažesnių dozių grupėse. Visi papildomos grupės gyvūnai turėtų būti ištiriami histologiškai, ypatingą dėmesį skiriant tiems organams ir audiniams, kurie buvo paveikti bandomųjų gyvūnų atveju.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti apibendrinami lentelėse, nurodant kiekvienos bandomosios grupės gyvūnų skaičių bandymo pradžioje ir gyvūnų, kuriems pasireiškė kiekvienos rūšies pakenkimai, skaičių.

Visi stebėti rezultatai turi būti įvertinami naudojant atitinkamą statistikos metodą. Gali būti naudojamas bet kuris pripažintas statistikos metodas.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

— duomenys apie gyvūnus (rūšis, veislė, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras ir pan.),

— bandymo sąlygos (taip pat tvarstymo būdas: nepralaidus ar pralaidus),

— dozės (nurodant nešiklį, jeigu naudotas) ir koncentracijos,

— poveikio nesukelianti dozė, jeigu įmanoma,

— duomenys apie toksines reakcijas pagal lytį ir dozę,

— nugaišimo laikas bandymo metu arba nurodant, ar gyvūnas išgyveno iki pabaigos,

— toksinis arba kitoks poveikis,

— visų nenormalių požymių pastebėjimo laikas ir tolesnė eiga,

— duomenys apie pašarą ir kūno svorį,

— naudoti hematologiniai tyrimai ir jų rezultatai,

▼C1

— naudoti klinikiniai biocheminiai tyrimai ir jų rezultatai,

— nekroskopijos duomenys,

— išsamus visų histopatologinių duomenų aprašymas,

— statistinis duomenų apdorojimas, jeigu įmanomas,

— duomenų aptarimas,

— duomenų aiškinimas.

3.2. DUOMENŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalies D skirsnį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalies E skirsnį.

▼M7

B.10. ŽINDUOLIŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJŲ IN VITRO BANDYMAS

ĮVADAS

Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) 473 (2016). Jis yra genetinės toksikologijos metodų serijos dalis. Yra parengtas EBPO dokumentas, kuriame glaustai pateikiama informacijos apie genetinės toksikologijos bandymus ir naujausių šių gairių pakeitimų apžvalga (1).

Chromosomų aberacijų tyrimo *in vitro* tikslas – identifikuoti chemines medžiagas, sukeliančias žinduolių ląstelių kultūros chromosomų aberacijas (2) (3) (4). Struktūrinės aberacijos gali būti 2 tipų: chromosominės ar chromatidinės. Atliekant chromosomų aberacijų tyrimus *in vitro* galėtų atsirasti poliploidija (įskaitant endoreduplikaciją). Nors aneugeninės cheminės medžiagos gali sukelti poliploidiją, pati poliploidija nerodo aneugeninio potencialo ir gali tiesiog rodyti ląstelių ciklo sutrikimą arba citotoksiškumą (5). Šis bandymas nenumatytas aneuploidijai matuoti. Aneuploidijai aptikti būtų galima rekomenduoti *in vitro* mikrobranduolių bandymą (6).

Tiriant chromosomų aberacijas *in vitro*, galima naudoti gerai žinomų ląstelių linijų arba žmogaus ar graužikų kilmės pirminių ląstelių kultūras. Naudojamas ląsteles reikėtų pasirinkti pagal jų gebėjimą augti kultūroje, kariotipo stabilumą (įskaitant chromosomų skaičių) ir chromosomų aberacijų spontaninį dažnumą. Atsižvelgiant į šiuo metu turimus duomenis, neįmanoma pateikti patikimų rekomendacijų, bet svarbu patarti, kad, įvertinant cheminius pavojus, reikėtų atsižvelgti į bandymams pasirinktų ląstelių *p53* būseną, genetinį (kariotipo) stabilumą, DNR atkūrimo gebą ir kilmę (graužikų, palyginti su žmogaus). Todėl šio bandymo metodo naudotojai raginami atsižvelgti į šių ir kitų ląstelių charakteristikų įtaką ląstelių linijos savybėms aptinkant chromosomų aberacijų atsiradimą, nes šios srities žinių visą laiką daugėja.

Vartojamų terminų apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

Bandymus atliekant *in vitro* paprastai reikia naudoti egzogeninį metabolinio aktyvinimo šaltinį, išskyrus atvejus, kai ląstelės yra metaboliškai pajėgios bandomųjų cheminių medžiagų atžvilgiu. Egzogeninė metabolinio aktyvinimo sistema nevisiškai atkartoja *in vivo* sąlygas. Reikėtų stengtis išvengti sąlygų, kurioms esant būtų gauti dirbtinai teigiami rezultatai, t. y. chromosomos būtų pažeistos ne dėl tiesioginės sąveikos tarp bandomųjų cheminių medžiagų ir chromosomų; tokias sąlygas sudaro pH ar osmolialumo pokyčiai (8) (9) (10), sąveika su terpės komponentais (11) (12) ar per didelis citotoksiškumo lygis (13) (14) (15) (16).

Šis bandymas naudojamas aptikti chromosomų aberacijas, kurios gali atsirasti dėl klastogeninio poveikio reiškinių. Chromosomų aberacijos atsiradimo analizė turėtų būti atliekama naudojant metafazės ląsteles. Todėl svarbu, kad įvyktų apdorotos ir neapdorotos kultūrų ląstelių mitozė. Pramoninėms nanomedžiagoms gali prireikti tam tikro šio bandymų metodo pakeitimų, kurie šiame bandymų metode neaprašyti.

Prieš taikant bandymų metodą mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį.

▼M7

BANDYMO PRINCIPAS

Žmogaus arba kitų žinduolių kilmės ląstelių kultūros veikiamos bandomąja chemine medžiaga naudojant egzogeninį metabolinio aktyvinimo šaltinį ar jo nenaudojant, jei naudojamos reikiamą metabolinę gebą turinčios ląstelės (žr. 13 pastraipą). Tam tikrais iš anksto nustatytais tarpais nuo ląstelių kultūrų veikimo bandomąja chemine medžiaga pradžios ląstelės apdorojamos metafazę stabdančia chemine medžiaga (pvz., kolcemidu arba kolchicinu), surenkamos, dažomos, o metafazės ląstelės tiriamos mikroskopu, kad būtų nustatytos chromatidinės ir chromosominės aberacijos.

METODO APRAŠYMAS

Parengiamieji darbai

Ląstelės

Galima naudoti įvairias ląstelių linijas (pvz., kiniškojo žiurkėno kiaušidžių (CHO), kiniškojo žiurkėno plaučių V79, kiniškojo žiurkėno plaučių (CHL)/IU, TK6 ląsteles) arba pirmines ląstelių kultūras, įskaitant žmogaus ar kitų žinduolių periferinio kraujo limfocitus (7). Naudojamų ląstelių linijų pasirinkimą reikėtų moksliškai pagrįsti. Naudojant pirmines ląsteles, dėl gyvūnų gerovės priežasčių reikėtų atsižvelgti į galimybę naudoti, jei įmanoma, žmogiškos kilmės pirmines ląsteles, ir ėminius imti atsižvelgiant į žmonių etikos principus ir taisykles. Žmogaus periferinio kraujo limfocitus reikėtų gauti iš jaunų (maždaug 18–35 metų amžiaus), nerūkančių žmonių, kurie nesirgtų ar kurie nebūtų neseniai paveikti genotoksiniais agentais (pvz., cheminėmis medžiagomis, jonizuojančiąja spinduliuote) tokiu mastu, kad tai padidintų chromosomų aberacijų foninį dažnumą. Tai užtikrintų, kad chromosomų aberacijų foninis dažnumas būtų mažas ir pastovus. Chromosomų aberacijų dažnumo atskaitos vertė didėja senstant ir ši tendencija labiau pasireiškia moterims nei vyrams (17) (18). Jei naudojamos ląstelės paimamos daugiau kaip iš vieno donoro, turėtų būti nurodytas donorų skaičius. Būtina įrodyti, kad ląstelės dalijosi nuo ląstelių ėminio apdorojimo bandomąja chemine medžiaga pradžios. Ląstelių kultūros laikomos eksponentinio ląstelių augimo fazėje (ląstelių linijos) arba stimuliuojamos dalytis (pirminės limfocitų kultūros), kad ląstelės būtų veikiamos skirtingose ląstelės ciklo stadijose, nes ląstelių stadijų jautris bandomosioms cheminėms medžiagoms gali būti nežinomas. Pirminės ląstelės, kurias reikia stimuliuoti mitogeniniais agentais, kad jos pradėtų dalytis, paprastai daugiau nesinchronizuojamos jas veikiant bandomąja chemine medžiaga (pvz., žmogaus limfocitai po 48 h mitogeninio stimuliavimo). Naudoti sinchronizuotas ląsteles apdorojimo metu nerekomenduojama, bet gali būti priimtina, jei būtų pagrįsta.

Terpės ir kultūros sąlygos

Prižiūrimoms kultūroms reikėtų naudoti reikiamą kultūros terpę ir inkubavimo sąlygas (kultūros indus, drėkinamąją 5 % CO_2 atmosferą, jei tinka, inkubavimo temperatūrą – 37 °C). Ląstelių linijos turėtų būti reguliariai tikrinamos, ar nesikeičia modalinis chromosomų skaičius ir nėra mikoplazmos užkrato (7) (19), o užkrėstos arba pakitusio modalinio chromosomų skaičiaus ląstelės neturėtų būti naudojamos. Turėtų būti nustatyta bandymo laboratorijoje naudojamų ląstelių linijų ar pirminių kultūrų normalaus ląstelių ciklo trukmė ir ji turėtų atitikti paskelbtas ląstelių charakteristikas (20).

Kultūrų paruošimas

Ląstelių linijos: ląstelės yra dauginamos iš kamieninių kultūrų, sėjamos kultūros terpėje tokiu tankiu, kad ląstelių suspensijos ar monosluoksniai visą laiką iki pat surinkimo momento augtų eksponentiškai (pvz., reikėtų vengti monosluoksniuose augančių ląstelių susiliejimo).

▼M7

Limfocitai: viso kraujo ėminys, apdorotas antikoaguliantu (pvz., heparinu), ar iš to kraujo atskirti limfocitai auginami (pvz., žmogaus limfocitai – 48 h) esant mitogeno (pvz., žmogaus limfocitams – fitohemagliutinino (PHA)), kad ląstelės pradėtų dalytis prieš jas paveikiant bandomąja chemine medžiaga.

Metabolinis aktyvinimas

Kai naudojamos nepakankamos endogeninės metabolinės gebos ląstelės, reikėtų naudoti egzogenines metabolizavimo sistemas. Jei nebūtų pagrįsta kita sistema, dažniausiai kaip numatytoji rekomenduojama sistema yra kofaktoriumi papildyta pomitochondrinė frakcija (S9), ruošiama iš graužikų (paprastai žiurkių) kepenų, apdorotų fermentų aktyvumą skatinančiais agentais, pvz,. *Aroclor* 1254 (21) (22) (23) ar fenobarbitalio ir β-naftoflavono derinys (24) (25) (26) (27) (28) (29). Pastarasis derinys neprieštarauja Stokholmo konvencijai dėl patvariųjų organinių teršalų (30) ir pasirodė esąs toks pat veiksmingas kaip *Aroclor* 1254 mišrių funkcijų oksidazėms skatinti (24) (25) (26) (28). S9 frakcija paprastai naudojama nuo 1 % iki 2 % (tūrio) koncentracijos, bet galutinio bandymo terpėje gali būti padidinta iki 10 % (tūrio). Apdorojant reikėtų vengti naudoti produktus, kurie mažina mitozinį indeksą, ypač su kalciu kompleksus sudarančius produktus (31). Naudojamos egzogeninės metabolinio aktyvinimo sistemos ar metabolizmo skatinimo priemonės tipo ir koncentracijos pasirinkimui įtakos gali turėti bandomų cheminių medžiagų klasė.

Bandomosios cheminės medžiagos ruošimas

Prieš apdorojant ląsteles, kietąsias chemines medžiagas reikėtų ištirpinti atitinkamuose tirpikliuose ir, jei reikia, praskiesti (žr. 23 pastraipą). Skystąsias chemines medžiagas galima dėti tiesiogiai į bandymo sistemą ir (arba) praskiesti prieš apdorojant bandymo sistemą. Dujos ar lakiosios bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti bandomos atitinkamai pakeitus standartinius protokolus, pvz., apdorojimas sandariuose kultūros induose (32) (33) (34). Bandomųjų cheminių medžiagų preparatus reikėtų ruošti prieš pat apdorojimą, išskyrus atvejus, kai stabilumo duomenys rodo galimybę laikyti.

Bandymo sąlygos

Tirpikliai

Tirpiklį reikėtų pasirinkti taip, kad būtų optimizuotas bandomosios cheminės medžiagos tirpumas, bet nebūtų daroma neigiama įtaka tyrimo eigai, pvz., kistų ląstelių augimas, būtų paveiktas bandomosios cheminės medžiagos vientisumas, vyktų reakcija su kultūros indais, būtų pakenkta metabolinio aktyvinimo sistemai. Jei įmanoma, rekomenduojama naudoti vandeninį tirpiklį (ar kultūros terpę). Gerai ištirti tirpikliai yra, pvz., vanduo ar dimetilsulfoksidas. Paprastai organinio tirpiklio koncentracija galutinio apdorojimo terpėje neturėtų būti didesnė kaip 1 % (tūrio), o vandeninių tirpiklių (natrio chlorido tirpalo ar vandens) – 10 % (tūrio). Jei naudojami tinkamai neištirti tirpikliai (pvz., etanolis ar acetonas), jų naudojimas turėtų būti pagrįstas duomenimis, rodančiais, kad tirpiklis yra suderinamas su bandomosiomis cheminėmis medžiagomis bei bandymo sistema ir kad naudojama koncentracija nesukelia genetinio toksiškumo. Jei tokių patvirtinančių duomenų nebūtų, svarbu įtraukti neapdorotus kontrolinius ėminius (žr. 1 priedėlį), kurie įrodytų, kad pasirinktas tirpiklis nesukelia žalingo arba klastogeninio poveikio.

Ląstelių proliferacijos bei citotoksiškumo matavimas ir apdorojimo koncentracijos verčių parinkimas

Nustatant didžiausią bandymui naudojamą bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją reikėtų vengti koncentracijos, galinčios sukelti dirbtinį teigiamą atsaką, pvz., kuri sukeltų per didelį citotoksiškumą (žr. 22 pastraipą), nuosėdų kultūros terpėje (žr. 23 pastraipą) ar žymius pH arba osmolialumo pokyčius

▼M7

(žr. 5 pastraipą). Jei bandomosios cheminės medžiagos pridėjimo metu žymiai pakinta terpės pH vertė, ją būtų galima reguliuoti buferuojant galutinio apdorojimo terpę, kad būtų išvengta dirbtinių teigiamų rezultatų ir būtų užtikrintos tinkamos kultūros sąlygos.

Ląstelių proliferacija matuojama siekiant įsitikinti, ar bandymo metu pakankamas apdorotų ląstelių skaičius pasiekė mitozę ir ar apdorojama esant reikiamam citotoksiškumo lygiui (žr. 18 ir 22 pastraipas). Citotoksiškumą reikėtų nustatyti pagrindinio bandymo metu pagal atitinkamus ląstelių žūties ir augimo rodiklius, esant ir nesant metaboliniam aktyvinimui. Nors citotoksiškumo įvertinimas atliekant pradinį bandymą gali būti naudingas pagrindinio bandymo koncentracijos vertėms geriau apibrėžti, pradinis bandymas nėra privalomas. Jei jis būtų atliekamas, jis neturėtų pakeisti citotoksiškumo matavimo atliekant pagrindinį bandymą.

Santykinis populiacijos padvigubėjimas (RPD) ar santykinis ląstelių skaičiaus padidėjimas (RICC) yra tinkami metodai citotoksiškumui įvertinti atliekant citogenetinius bandymus (13) (15) (35) (36) (55) (formules žr. 2priedėlyje). Jei apdorojimas yra ilgalaikis, o ėminių ėmimo laikas nuo apdorojimo pradžios yra daugiau kaip 1,5 karto ilgesnis nei normalaus ląstelių ciklo trukmė (t. y. iš viso yra daugiau kaip 3 kartus ilgesnis nei ląstelių ciklo trukmė), citotoksiškumo įvertis taikant RPD galėtų būti per mažas (37). Šiomis aplinkybėmis geresnis matas galėtų būti RICC arba naudingas įvertis galėtų būti ir RPD, citotoksiškumą įvertinant praėjus laikui, kuris būtų 1,5 karto ilgesnis nei normalaus ląstelių ciklo trukmė.

Jei kaip pirminė kultūra naudojami limfocitai, kurių citotoksinio ar citostatinio poveikio matas yra mitozinis indeksas (MI), jam įtaką daro matavimo laikas po apdorojimo, naudojamas mitogenas ir galimas ląstelių ciklo nutrūkimas. Tačiau MI yra priimtinas, nes kiti citotoksiškumo matavimai gali būti sudėtingi ir praktiškai neįmanomi bei gali netikti stimuliuojant PHA augančiai limfocitų tikslinei populiacijai.

Nors rekomenduojami ląstelių linijų citotoksiškumo parametrai yra RICC ir RPD, o pirminės limfocitų kultūros – MI, kiti rodikliai (pvz., ląstelių vientisumas, apoptozė, nekrozė, ląstelių ciklas) galėtų suteikti naudingos papildomos informacijos.

Reikėtų įvertinti ne mažiau kaip tris bandymo koncentracijos vertes (neįskaitant tirpiklio ir teigiamų kontrolinių ėminių), kurios atitinka priimtinumo kriterijus (reikiamas citotoksiškumas, ląstelių skaičius ir kt.). Neatsižvelgiant į ląstelių tipą (ląstelių linijos ar pirminės limfocitų kultūros), galima naudoti kiekvienos bandymo koncentracijos kartotines ar pavienes apdorotas kultūras. Nors patariama naudoti kartotines kultūras, pavienės kultūros taip pat priimtinos, jei vertinamas vienodas suminis pavienės ar kartotinės kultūros ląstelių skaičius. Naudoti pavienę kultūrą ypač tinka, kai vertinamos daugiau kaip 3 koncentracijos vertės (žr. 31 pastraipą). Nepriklausomoms kartotinėms kultūroms gauti tam tikros koncentracijos rezultatai gali būti sutelkti bendrai duomenų analizei (38). Jei bandomoji cheminė medžiaga rodo mažą citotoksiškumą arba jo visai nėra, paprastai tiktų maždaug nuo 2 iki 3 kartų besiskiriančios koncentracijos intervalai. Jei citotoksiškumas nustatomas, pasirinktos koncentracijos vertės turėtų aprėpti intervalą nuo koncentracijos, kuriai esant citotoksiškumas pasireiškia,

▼M7

kaip aprašyta 22 pastraipoje, įtraukiant koncentracijos vertes, kurioms esant gaunamas vidutinis citotoksiškumas ar jo visai nėra. Daugelio bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos atsako kreivės kyla staigiai, todėl norint gauti mažo arba vidutinio citotoksiškumo duomenis arba išsamiai ištirti dozės ir atsako santykį, būtina naudoti arčiau išdėstytas ir (arba) daugiau kaip tris koncentracijos vertes (pavienių ar kartotinių kultūrų), ypač tomis aplinkybėmis, kai reikia atlikti kartotinį bandymą (žr. 47 pastraipą).

Jei maksimali koncentracija pagrįsta citotoksiškumu, didžiausiai koncentracijai reikėtų pasiekti 55 ± 5 % citotoksiškumą, taikant rekomenduotus citotoksiškumo parametrus (t. y. ląstelių linijų RICC bei RPD sumažėjimą ir pirminių limfocitų kultūrų MI sumažėjimą iki 45 ± 5 % vienalaikio neigiamo kontrolinio ėminio). Reikėtų atsargiai aiškinti teigiamus rezultatus, kurie būtų gauti tik viršutiniam šio 55 ± 5 % citotoksiškumo intervalo galui (13).

Jei mažai tirpios bandomosios cheminės medžiagos nėra citotoksiškos, kai koncentracija yra mažesnė nei mažiausia netirpumo koncentracija, paveikimo bandomąja chemine medžiaga pabaigoje, esant didžiausiai analizuojamai koncentracijai, turėtų atsirasti drumstumas arba nuosėdos, matomos plika akimi arba per inversinį mikroskopą. Netgi jei citotoksiškumas pasireiškia, kai koncentracija yra didesnė nei mažiausia netirpumo koncentracija, patartina bandyti tik esant vienai drumstumą ar matomas nuosėdas sukeliančiai koncentracijai, nes nuosėdos gali daryti dirbtinį poveikį. Esant koncentracijai, kurioje susidaro nuosėdos, reikėtų imtis priemonių užtikrinti, kad nuosėdos netrukdytų atlikti bandymą (pvz., dažymą ar įvertinimą). Gali padėti tirpumo nustatymas kultūros terpėje prieš atliekant bandymą.

Jei nuosėdų ar ribinio citotoksiškumo nestebima, didžiausia bandymo koncentracija turėtų atitikti 10 mmol/l, 2 mg/ml ar 2 µl/ml, pasirenkant mažiausią (39) (40) (41). Jei bandomoji cheminė medžiaga yra neapibrėžtos sudėties, pvz., nežinomos ar kintamos sudėties medžiaga, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinė medžiaga (UVCB) (42), iš aplinkos ekstrahuojamas ėminys ir kt., nesant pakankamam citotoksiškumui, gali prireikti didesnės didžiausios koncentracijos (pvz., 5 mg/ml), kad būtų didesnė kiekvieno iš komponentų koncentracija. Reikėtų pažymėti, kad žmonėms skirtiems vaistiniams preparatams šie reikalavimai gali būti skirtingi (43).

Kontroliniai ėminiai

Kiekvieną kartą surenkant kultūrą, reikėtų įtraukti vienalaikius neigiamus kontrolinius ėminius (žr. 15 pastraipą), sudarytus vien tik iš tirpiklio apdorojimo terpėje ir apdorotus taip pat, kaip apdorojamos kultūros.

Vienalaikiai teigiami kontroliniai ėminiai yra būtini siekiant įrodyti laboratorijos gebėjimą naudojamo bandymų protokolo sąlygomis identifikuoti klastogenus ir egzogeninės metabolinio aktyvinimo sistemos efektyvumą, jei tinka. Teigiamų kontrolinių ėminių pavyzdžiai pateikiami toliau 1 lentelėje. Galima naudoti alternatyvias teigiamas kontrolines chemines medžiagas, jei tai būtų pagrįsta. Kadangi žinduolių ląstelių genetinio toksiškumo *in vitro* bandymai yra pakankamai standartizuoti, teigiamų kontrolinių ėminių naudojimas gali apsiriboti klastogenais, kuriems būtinas metabolinis aktyvinimas. Jei jis atliekamas vienu metu su neaktyvinto ėminio bandymu naudojant vienodą apdorojimo trukmę, šis vienas teigiamos kontrolės atsakas įrodys metabolinio aktyvinimo sistemos aktyvumą ir bandymo sistemos jautrį. Tačiau ilgalaikiam apdorojimui (be S9) reikėtų turėti savo teigiamą kontrolinį ėminį, nes apdorojimo trukmė skirsis nuo metabolinį aktyvinimą naudojančio bandymo trukmės. Kiekvienas teigiamas kontrolinis ėminys turėtų būti naudojamas vienos arba kelių koncentracijos verčių, kurioms esant būtų galima tikėtis gauti atkuriamą ir aptinkamą didesnį nei fonas atsaką, kad būtų galima įrodyti bandymo sistemos jautrį (t. y. poveikis yra aiškus, bet tyrėjui ne iš karto atskleidžiama užkoduotų objektinių stiklelių tapatybė), ir atsako neturėtų sutrikdyti citotoksiškumas, kuris viršytų bandymo metodui nustatytas ribas.

▼M7

1 lentelė.

Etaloninės cheminės medžiagos, rekomenduojamos laboratorijos kvalifikacijai vertinti ir teigiamiems kontroliniams ėminiams pasirinkti.

Kategorija	Cheminė medžiaga	CAS Nr.
1. Klastogenai, aktyvūs be metabolinio aktyvinimo		
	Metilmetansulfonatas	66-27-3
	Mitomicinas C	50-07-7
	4-nitrochinolin-N-oksidas	56-57-5
	Citozino arabinozidas	147-94-4
2. Klastogenai, kuriems reikia metabolinio aktyvinimo		
	Benz(a)pirenas	50-32-8
	Ciklofosfamidas	50-18-0

PROCEDŪRA

Paveikimas bandomąja chemine medžiaga

Proliferuojančios ląstelės veikiamos bandomąja chemine medžiaga esant metabolinio aktyvinimo sistemai arba jos nesant.

Kultūrų surinkimo laikas

Siekiant atlikti išsamų įvertinimą, kurio prireiktų neigiamam rezultatui patvirtinti, visos šios trys Bandymo sąlygos turėtų būti įgyvendintos, taikant trumpalaikį apdorojimą su metaboliniu aktyvinimu ir be jo bei ilgalaikį apdorojimą be metabolinio aktyvinimo (žr. 43, 44 ir 45 pastraipas):

— ląstelės turėtų būti veikiamos bandomąja chemine medžiaga be metabolinio aktyvinimo 3–6 h ir surenkamos nuo apdorojimo pradžios praėjus laikui, kuris būtų maždaug 1,5 karto ilgesnis nei normalaus ląstelių ciklo trukmė (18),

— ląstelės turėtų būti veikiamos bandomąja chemine medžiaga esant metaboliniam aktyvinimui 3–6 h ir surenkamos nuo apdorojimo pradžios praėjus laikui, kuris būtų maždaug 1,5 karto ilgesnis nei normalaus ląstelių ciklo trukmė (18),

— ląstelės turėtų būti nepertraukiamai veikiamos be metabolinio aktyvinimo ir surenkamos praėjus laikui, kuris būtų maždaug 1,5 karto ilgesnis nei normalaus ląstelių ciklo trukmė. Tam tikras chemines medžiagas (pvz., nukleozidų analogus) galima aptikti lengviau, jei apdorojimo ar surinkimo laikas yra daugiau kaip 1,5 karto ilgesnis nei normalaus ląstelių ciklo trukmė (24).

Jei esant kuriai nors vienai iš pirmiau nurodytų bandymo sąlygų gaunamas teigiamas atsakas, gali būti nebūtina tirti kurią nors kitą apdorojimo schemą.

Chromosomų paruošimas

Paprastai likus 1–3 h iki surinkimo ląstelių kultūros yra veikiamos kolcemidu ar kolchicinu. Kiekviena ląstelių kultūra surenkama ir atskirai apdorojama chromosomoms paruošti. Ruošiant chromosomas ląstelės apdorojamos hipotoniniu tirpalu, fiksuojamos ir dažomos. 3–6 h trukmės apdorojimo pabaigoje monosluoksniuose gali būti mitozinių ląstelių (atpažįstamų iš apvalios formos ir atsiskyrimo nuo paviršiaus). Kadangi šios mitozinės ląstelės lengvai atsiskiria, jos gali

▼M7

būti prarastos šalinant terpę su bandomąja chemine medžiaga. Jei yra įrodymų dėl esminio mitozinių ląstelių skaičiaus padidėjimo palyginti su kontroliniais ėminiais, rodančio galimą ląstelių sulaikymą mitozės etape, ląsteles reikėtų surinkti centrifugavimu ir grąžinti į kultūras, kad surinkimo metu nebūtų prarastos mitozės etapo ląstelės, kurioms kyla chromosomų aberacijos rizika.

Analizė

Prieš atliekant chromosomų aberacijų mikroskopinę analizę, visi objektiniai stikleliai turėtų būti nepriklausomai užkoduoti, įskaitant teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių stiklelius. Kadangi fiksavimo metu dalis metafazės ląstelių praranda chromosomas, todėl suskaičiuotos ląstelės turės tam tikrą skaičių centromerų, lygų modaliniam skaičiui ± 2.

Ne mažiau kaip 300 gerai matomų metafazių turėtų būti suskaičiuotos kiekvienai koncentracijai ir kontroliniam ėminiui, norint padaryti išvadą, kad bandomoji cheminė medžiaga yra aiškiai neigiama (žr. 45 pastraipą). 300 ląstelių turėtų būti vienodai paskirstytos tarp kartotinių ėminių, jei naudojami kartotiniai kultūrų ėminiai. Kai vienai koncentracijai naudojama pavienė kultūra (žr. 21 pastraipą), šioje pavienėje kultūroje turėtų būti suskaičiuota ne mažiau kaip 300 gerai matomų metafazių. 300 ląstelių skaičiaus pranašumas – padidėja bandymo statistinė galia, be to, retai būtų stebimos nulinės vertės (manoma, kad jos sudarytų tik 5 %) (44). Skaičiuojamų metafazių skaičių galima sumažinti, kai stebimas didelis ląstelių su chromosomų aberacijomis skaičius ir bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai teigiama.

Reikėtų skaičiuoti ląsteles su chromosomų struktūrine (-ėmis) aberacija (-omis), įskaitant plyšius ir jų neįskaitant. Trūkiai ir plyšiai apibrėžti 1 priedėlyje pagal (45) (46). Chromatidinė ir chromosominė aberacijos turėtų būti registruojamos atskirai ir klasifikuojamos pagal potipius (trūkius, mainus). Laboratorijoje taikomos procedūros turėtų užtikrinti, kad chromosomų aberacijų analizę atlieka tinkamai apmokyti skaičiuotojai ir, jei reikia, ją peržiūrėtų ekspertai.

Nors tyrimo tikslas yra nustatyti chromosomų struktūrines aberacijas, svarbu registruoti poliploidijos bei endoduplikacijos dažnumą, kai šie įvykiai yra matomi (žr. 2 pastraipą).

Laboratorijos kvalifikacija

Siekdama įgyti pakankamos bandymo atlikimo patirties prieš jį taikydama įprastiniams tyrimams, laboratorija turėtų būti atlikusi etaloninių teigiamų cheminių medžiagų bandymų seriją, joms veikiant pagal skirtingus mechanizmus ir su įvairiais neigiamais kontroliniais ėminiais (naudojant įvairius tirpiklius ir nešiklius). Šių teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių atsakas turėtų atitikti literatūros duomenis. Tai netaikoma patirties turinčioms laboratorijoms, t. y. kurios turi istorinių duomenų bazę, prieinamą kaip apibrėžta 37 pastraipoje.

Teigiamų kontrolinių cheminių medžiagų rinkinį (žr. 26 pastraipos 1 lentelę) reikėtų tirti atliekant trumpalaikį ir ilgalaikį apdorojimą be metabolinio aktyvinimo, taip pat trumpalaikį apdorojimą esant metaboliniam aktyvinimui, kad būtų galima įrodyti kvalifikaciją aptikti klastogenines chemines medžiagas ir nustatyti metabolinio aktyvinimo sistemos efektyvumą. Pasirinktų cheminių medžiagų koncentracijos verčių intervalas turėtų būti pasirinktas taip, kad, siekiant įrodyti bandymo sistemos jautrį ir dinaminį diapazoną, būtų gautas atkuriamas ir su koncentracija susijęs padidėjimas palyginti su fonu.

▼M7

Istorinių kontrolinių ėminių duomenys

Laboratorija turėtų nustatyti:

— istorinių teigiamų kontrolinių ėminių intervalą ir pasiskirstymą,

— istorinių neigiamų kontrolinių ėminių (neapdorotų, tirpiklio) intervalą ir pasiskirstymą.

Pirmą kartą gaunant duomenis, skirtus istorinių neigiamų kontrolinių ėminių pasiskirstymui, vienalaikiai neigiami kontroliniai ėminiai turėtų atitikti paskelbtus kontrolinius duomenis, jei jie yra. Kontrolinių ėminių pasiskirstymą papildant vis didesniu bandymų duomenų kiekiu, būtų gerai, kad vienalaikiai neigiami kontroliniai ėminiai patektų į to skirstinio 95 % kontrolines ribas (44) (47). Laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazę iš pradžių turėtų sudaryti ne mažiau kaip 10 bandymų, bet būtų geriau, jei tokių palyginamosiomis Bandymo sąlygomis atliktų bandymų skaičius būtų ne mažesnis kaip 20. Laboratorijos turėtų taikyti kokybės kontrolės metodus, tokius kaip kontrolinės diagramos (pvz., C tipo ar X juostinės diagramos (48)), kad galėtų nustatyti savo teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių duomenų kintamumą ir įrodyti metodikos „valdomumą“ savo laboratorijoje (44). Papildomas rekomendacijas, kaip kurti ir naudoti istorinius duomenis (t. y. duomenų įtraukimo ir pašalinimo iš istorinių duomenų kriterijus ir tam tikro bandymo priimtinumo kriterijus) galima rasti literatūroje (47).

Į visus bandymų protokolo pakeitimus reikėtų žiūrėti atsižvelgiant į jų suderinamumą su esamomis laboratorijos istorinių kontrolinių ėminių duomenų bazėmis. Esant didesnėms neatitiktims, turėtų būti kuriama nauja istorinių kontrolinių ėminių duomenų bazė.

Neigiamų kontrolinių ėminių duomenis turėtų sudaryti pavienės kultūros ląstelių su chromosomų aberacijomis skaičius arba kartotinių kultūrų skaičių suma, kaip aprašyta 21 pastraipoje. Būtų gerai, kad vienalaikiai neigiami kontroliniai ėminiai patektų į laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazės skirstinio 95 % kontrolines ribas (44) (47). Jei vienalaikių neigiamų kontrolinių ėminių duomenys nepatenka į 95 % kontrolines ribas, jie gali būti tinkami įtraukti į istorinių kontrolinių ėminių skirstinį, jei nėra kraštiniai riktai ir yra įrodymų, kad bandymo sistema „valdoma“ (žr. 37 pastraipą) ir kad nėra techninių ar žmogaus klaidų.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų pateikimas

Turėtų būti gautas ląstelių, turinčių struktūrines chromosomų aberacijas, įvertis procentais. Bandymo ir kontrolinių ėminių kultūrų chromatidinė ir chromosominė aberacijos, klasifikuojamos pagal potipius (trūkius, mainus), turėtų būti registruojamos atskirai, nurodant jų skaičių ir dažnumą. Plyšiai registruojami ir pateikiami ataskaitoje atskirai, bet neįtraukiami į suminį aberacijų buvimo dažnumą. Ataskaitoje pateikiama poliploidinių ir (arba) endoreduplikuotų ląstelių, kai matomos, procentinė dalis.

Turėtų būti registruojami vienalaikiai visų apdorotų, neigiamų ir teigiamų kontrolinių ėminių citotoksiškumo duomenys, gauti atliekant pagrindinį (-ius) aberacijos bandymą (-us).

Turėtų būti pateikti atskiri kiekvienos kultūros duomenys. Be to, visi duomenys turi būti suvesti į lenteles.

Priimtinumo kriterijai

Bandymo priimtinumas pagrįstas šiais kriterijais:

— vienalaikis neigiamas kontrolinis ėminys laikomas tinkamu įtraukti į laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazę, kaip aprašyta 39 pastraipoje;

▼M7

— vienalaikiai teigiami kontroliniai ėminiai (žr. 26 pastraipą) turėtų sukelti atsakus, kurie yra suderinami su rastais istorinių teigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazėje, ir duoti statistiškai reikšmingą padidėjimą palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu;

— turėtų atitikti ląstelių proliferacijos tirpiklio kontroliniame ėminyje kriterijus (17 ir 18 pastraipos);

— bandoma esant visoms trims Bandymo sąlygoms, nebent vienai iš jų gaunami teigiami rezultatai (žr. 28 pastraipą);

— analizuojamas pakankamas ląstelių ir koncentracijos verčių skaičius (31 ir 21 pastraipa).

— didžiausios koncentracijos pasirinkimo kriterijai atitinka aprašytus 22, 23 ir 24 pastraipose.

Rezultatų įvertinimas ir aiškinimas

Jei įvykdomi visi priimtinumo kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai teigiama, jei, esant kuriai nors ištirtai bandymo sąlygai (žr. 28 pastraipą):

a) bent vienai bandymo koncentracijai gaunamas statistiškai reikšmingas padidėjimas palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu,

b) padidėjimas yra susijęs su doze, kai įvertinama pagal atitinkamą tendencijos kriterijų,

c) kuris nors iš rezultatų yra už istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų skirstinio ribų (pvz., Puasono skirstinio 95 % kontrolinių ribų; žr. 39 pastraipą).

Atitinkant visus šiuos kriterijus, laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga gali sukelti šios bandymų sistemos žinduolių ląstelių kultūros chromosomų aberacijas. Rekomendacijų dėl tinkamiausių statistinių metodų galima rasti literatūroje (49) (50) (51).

Jei įvykdomi visi priimtinumo kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai neigiama, jei visomis ištirtomis bandymo sąlygomis (žr. 28 pastraipą):

a) jokiai bandymo koncentracijai negaunamas statistiškai reikšmingas padidėjimas palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu,

b) nėra su koncentracija susijusio padidėjimo, kai įvertinama pagal atitinkamą tendencijos kriterijų,

c) visi rezultatai patenka tarp istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų skirstinio ribų (pvz., Puasono skirstinio 95 % kontrolinių ribų; žr. 39 pastraipą).

Tada laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga negali sukelti šios bandymų sistemos žinduolių ląstelių kultūros chromosomų aberacijų.

Nėra reikalavimo patikrinti aiškų teigiamą ar neigiamą atsaką.

Jei atsakas nėra aiškiai neigiamas ar aiškiai teigiamas, kaip apibūdinta pirmiau, arba, siekiant padėti nustatyti rezultato biologinę svarbą, duomenys turėtų būti įvertinti pateikiant ekspertų nuomonę ir (arba) atliekant papildomus tyrimus. Galėtų būti naudingas papildomų ląstelių skaičiavimas (jei tinka) arba kartotinis bandymas galbūt modifikuotomis bandymo sąlygomis (pvz., tarpai tarp koncentracijos verčių, kitos metabolinio aktyvinimo sąlygos (t. y. S9 koncentracija ar S9 kilmė)).

Retais atvejais, kai netgi atlikus papildomus tyrimus, gautų duomenų rinkinio nepakaks padaryti išvadą, ar rezultatai yra teigiami ar neigiami, bus priimtas sprendimas, kad cheminės medžiagos atsakas yra dviprasmis.

▼M7

Poliploidinių ląstelių skaičiaus padidėjimas gali rodyti, kad bandomoji cheminė medžiaga gali slopinti mitozinius procesus ir sukelti kiekybines chromosomų aberacijas (52). Ląstelių su endoreduplikuotomis chromosomomis skaičiaus padidėjimas gali rodyti, kad bandomosios cheminės medžiagos gali slopinti ląstelių ciklo eigą (53) (54) (žr. 2 pastraipą). Todėl poliploidinių ląstelių ir ląstelių su endoreduplikuotomis chromosomomis dažnumas turėtų būti registruojamas atskirai.

Bandymo ataskaita

Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— šaltinis, partijos numeris, galiojimo pabaigos data, jei yra;

— pačios bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, jei žinomas;

— bandomosios cheminės medžiagos tirpumas tirpiklyje ir stabilumas, jei yra žinomas;

— pH, osmolialumo ir nuosėdų matavimas kultūros terpėje, į kurią bandomoji cheminė medžiaga buvo pridėta, jei reikia.

Vienkomponentė medžiaga:

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;

— cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų identifikavimas, jei tinka ir praktiškai įmanoma, kt.

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

— kiek įmanoma išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.

Tirpiklis:

— tirpiklio pasirinkimo pagrindimas,

— taip pat reikėtų nurodyti tirpiklio galutinėje kultūros terpėje procentinę dalį.

Ląstelės

— ląstelių tipas ir šaltinis,

— naudojamo tipo ląstelių kariotipo ypatybės ir tinkamumas,

— ar nėra mikoplazmos, jei naudojamos ląstelių linijos;

— informacija apie ląstelių ciklo trukmę, dvigubėjimo trukmę ar proliferacijos indeksą, jei naudojamos ląstelių linijos;

— kraujo donorų lytis, amžius ir visa tinkama informacija apie donorą, visas kraujas ar atskirti limfocitai, naudotas mitogenas;

— ląstelių sėjimų skaičius, jei žinomas, kai naudojamos ląstelių linijos;

— ląstelių kultūros priežiūros metodai, jei naudojamos ląstelių linijos;

— modalinis chromosomų skaičius, jei naudojamos ląstelių linijos.

▼**M7**

Bandymo sąlygos:

— metafazę stabdančios cheminės medžiagos pavadinimas, koncentracija ir ląstelių veikimo trukmė;

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, išreikšta kaip galutinė koncentracija kultūros terpėje (pvz., µg ar mg/ml ar mmol/l kultūros terpės).

— koncentracijos verčių ir kultūrų skaičiaus pasirinkimo pagrindimas, įskaitant, pvz., citotoksiškumo duomenis ir tirpumo apribojimus;

— terpių sudėtis, CO_2 koncentracija, jei tinka, drėgmės lygis;

— tirpiklio ir bandomosios cheminės medžiagos, pridėtos į kultūros terpę, koncentracija (ir (arba) tūris);

— inkubavimo temperatūra;

— inkubavimo trukmė;

— apdorojimo trukmė;

— surinkimo laikas po apdorojimo,

— ląstelių tankis sėjimo metu, jei tinka,

— metabolinio aktyvinimo sistemos tipas ir sudėtis (S9 šaltinis, S9 mišinio paruošimo metodas, S9 mišinio ir S9 galutinėje kultūros terpėje koncentracija ar tūris, S9 kokybės kontrolės ėminiai);

— teigiamos ir neigiamos kontrolinės cheminės medžiagos, galutinės koncentracijos vertės esant kiekvienai apdorojimo sąlygai;

— objektinių stiklelių ruošimo metodai ir taikytas dažymo būdas;

— tyrimų priimtinumo kriterijai;

— aberacijų įvertinimo kriterijai,

— ištirtų metafazių skaičius,

— citotoksiškumo matavimo metodai,

— visa papildoma informacija, susijusi su citotoksiškumu ir taikomu metodu;

— tyrimo vertinimo kaip teigiamo, neigiamo ar dviprasmio kriterijai,

— pH, osmolialumo ir nusėdimo nustatymo metodai.

Rezultatai:

— kiekvienos kultūros apdorotų ląstelių skaičius ir surinktų ląstelių skaičius, kai naudojamos ląstelių linijos;

— citotoksišumo matavimai, pvz., RPD, RICC, MI, kiti stebėjimai, jei yra;

— informacija apie ląstelių ciklo trukmę, dvigubėjimo trukmę arba proliferacijos indeksą, jei naudojamos ląstelių linijos;

— nusėdimo požymiai ir nustatymo laikas;

▼M7

— aberacijų, įskaitant plyšius, apibūdinimas,

— įvertintų ląstelių skaičius, ląstelių su chromosomų aberacijomis skaičius ir chromosomų aberacijų tipas, pateikiamas atskirai kiekvienai apdorotai ir kontrolinei kultūrai, įtraukiant ir neįtraukiant plyšių;

— ploidiškumo pokyčiai (atskirai nurodomos poliploidinės ląstelės ir ląstelės su endoreduplikuotomis chromosomomis), jei matomi;

— koncentracijos ir atsako priklausomybė, jei įmanoma,

— vienalaikio neigiamo (tirpiklio) ir teigiamo kontrolinio ėminio duomenys (koncentracijos vertės ir tirpikliai);

— istorinių neigiamų (tirpiklio) ir teigiamų kontrolinių ėminių duomenys, intervalai, vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai bei skirstinio 95 % kontrolinės ribos, taip pat duomenų skaičius;

— statistinės analizės duomenys, p vertės, jei yra.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

LITERATŪRA

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Evans, H.J. (1976), „Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens“, in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York and London, pp. 1-29

(3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), „The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture“ in *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. *et al*. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York- Oxford, pp. 427-432.

(4) Galloway, S.M. *et al*. (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

(5) Muehlbauer, P.A. *et al*. (2008), Improving dose selection and identification of aneugens in the *in vitro* chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, pp. 318-327.

(6) Šio priedo B.49 skyrius. *In Vitro žinduolių ląstelės mikrobranduolio bandymas.*

(7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.

(8) Scott, D. *et al*. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, pp. 147-204.

(9) Morita, T. *et al*. (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, pp. 297-305.

(10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagen*esis, Vol. 8/6, pp. 789-886.

▼**M7**

(11) Long, L.H. *et al*. (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* Vol. 634/1-2, pp. 177-183.

(12) Nesslany, F. *et al*. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, pp. 439-452.

(13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 191-201.

(14) Kirkland, D. *et al*. (2005), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, pp. 1–256.

(15) Greenwood, S. *et al*. (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, pp. 36–44.

(16) Hilliard, C.A. *et al*. (1998), Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, pp. 316–326.

(17) Hedner K. *et al*. (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, pp. 305-309.

(18) Ramsey M.J. *et al*. (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, pp. 95-106.

(19) Coecke S. *et al*. (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, pp. 261-287.

(20) Henderson, L. *et al*. (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, pp.163-167.

(21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, pp. 347-363.

(22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.

(23) Natarajan, A.T. *et al*. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res*earch, Vol. 37/1, pp. 83-90.

(24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, pp. 277-290.

(25) Ong, T.-m. *et al*. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, pp. 55-65.

(26) Elliot, B.M. *et al*. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, pp. 175-177.

▼M7

(27) Matsushima, T. *et al*. (1976), „A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems“, in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al*. (eds.), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(28) Galloway, S.M. *et al*. (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 241-261.

(29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28/1, pp. 51-59.

(30) UNEP (2001), Stokholmo konvencija dėl patvariųjų organinių teršalų, Jungtinių Tautų aplinkos programa (UNEP). Pateikiama adresu http://www.pops.int/.

(31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, pp. 225-8.

(32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids“, in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.

(33) Zamora, P.O. *et al*. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.

(34) Asakura, M. *et al*. (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.

(35) Lorge, E. *et al*. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.

(36) Galloway, S. *et al*. (2011), Workshop summary: Top concentration for *in vitro* mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for *in vitro* cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 77-83.

(37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1-2, pp. 86-87.

(38) Richardson, C. *et al*. (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(39) OECD (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Available upon request.

(40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research/-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, pp. 32-56.

(41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis,* Vol. 54/1, pp. 36-43.

▼M7

(42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Disponible à l'adresse: https://federalregister.gov/a/2012-13774.

(44) OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS)“, Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

(45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.

(46) Scott, D. *et al*. (1990), „Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*“, in *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 62-86.

(47) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.

(49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.

(50) Galloway, S.M. *et al*. (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

(51) Richardson, C. *et al*. (1989), „Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays“, in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 29-46.

(53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, Vol. 119/3, pp. 403-413.

(54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Vol. 43/3, pp. 1362-1364

(55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Res*earch, Vol. 312, pp. 139-149.

▼M7

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Aneuploidija – vienos arba daugiau kaip vienos chromosomų, bet ne viso (-ų) jų rinkinio (-ų) (poliploidija) nukrypimas nuo normalaus diploidinio (arba haploidinio) chromosomų skaičiaus.

Apoptozė – užprogramuota ląstelių žūtis, kuriai būdinga serija etapų, per kuriuos ląstelės suyra į membrana apsuptas daleles, kurios vėliau pašalinamos fagocitoze arba numetimo būdu.

Ląstelių proliferacija – ląstelių skaičiaus didėjimas dėl mitozinio jų dalijimosi.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Chromatidžių trūkis – atskiros chromatidės nevientisumas, kai yra aiškus vienos iš chromatidžių nesutapimas.

Chromatidinis plyšys – nedažoma (achromatinė) vienos chromatidės sritis, kurioje yra mažiausias skaičius klaidingai suporuotų bazių.

Chromatidinė aberacija – struktūrinis chromosomos pažeidimas, pasireiškiantis kaip vienos iš chromatidžių trūkis arba kaip chromatidžių trūkis ir susijungimas.

Chromosominė aberacija – struktūrinis chromosomos pažeidimas, pasireiškiantis kaip abiejų chromatidžių trūkis arba kaip trūkis ir susijungimas toje pačioje vietoje.

Klastogenas – cheminė medžiaga, kuris sukelia ląstelių arba eukariotinių organizmų populiacijų struktūrines chromosomų aberacijas.

Koncentracijos vertės – bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kultūros terpėje galutinės vertės.

Citotoksiškumas – jei šio bandymo metodo tyrimams naudojamos ląstelių linijos, citotoksiškumas nustatomas kaip apdorotų ląstelių santykinio populiacijos padvigubėjimo (RPD) sumažėjimas ar santykinis ląstelių skaičiaus padidėjimas (RICC) palyginti su neigiamu kontroliniu ėminiu (žr. 17 pastraipą ir 2 priedėlį). Jei šio bandymo metodo tyrimams naudojamos pirminės limfocitų kultūros, citotoksiškumas nustatomas kaip apdorotų ląstelių mitozinio indekso (MI) sumažėjimas palyginti su neigiamu kontroliniu ėminiu (žr. 18 pastraipą ir 2 priedėlį).

Endoreduplikacija – procesas, kurio metu pasibaigus DNR replikacijos S periodui, branduolys nepradeda dalytis mitozės būdu, bet prasideda naujas S periodas. Taip atsiranda chromosomos, turinčios 4, 8, 16 … chromatidžių.

Genotoksinis – bendrasis terminas, kuriuo išreiškiamas visų tipų DNR arba chromosomų pažeidimas, įskaitant trūkius, delecijas, aduktus, nukleotidų modifikacijas ir ryšius, pergrupavimus, genų mutacijas, chromosomų aberacijas ir aneuploidiją. Ne visų tipų genotoksiniai poveikiai sukelia mutacijas ar pastovų chromosomų pažeidimą.

Mitozinis indeksas (MI) – metafazės ląstelių skaičiaus ir ląstelių populiacijos stebimų ląstelių suminio skaičiaus dalmuo, kuris rodo tos ląstelių populiacijos proliferacijos laipsnį.

Mitozė – ląstelės branduolio dalijimasis, paprastai į profazę, prometafazę, metafazę, anafazę ir telofazę.

Mutageninis – sukeliantis paveldimą DNR bazinės poros sekos (-ų) pokytį genuose arba chromosomų struktūroje (chromosomų aberacijas).

▼M7

Kiekybinė aberacija – chromosomų skaičiaus pokytis palyginti su naudojamų ląstelių būdingu normaliu chromosomų skaičiumi.

Poliploidija – kiekybinės chromosomų aberacijos ląstelėse arba organizmuose, apimančios visą (-us) chromosomų rinkinį (-us), skirtingai nei atskirą (-as) chromosomą (-as) (aneuploidija).

p53 būsena – p53 baltymo dalyvavimas reguliuojant ląstelių ciklą, apoptozę ir DNR atkūrimą. Ląstelės, kurioms trūksta funkcinio p53 baltymo ir negali sustabdyti ląstelių ciklo arba pašalinti pažeistų ląstelių per apoptozę arba kitais mechanizmais (pvz., DNR atkūrimo skatinimą), susijusiais su p53 funkcijomis atsakant į DNR pažaidą, teoriškai turėtų būti labiau linkusios genų mutacijai ar chromosomų aberacijoms.

Santykinis ląstelių skaičiaus padidėjimas (*angl.* RICC) – ląstelių skaičiaus padidėjimas chemine medžiaga veikiamose kultūrose, palyginti su padidėjimu neapdorotose kultūrose, santykį išreiškiant procentine dalimi.

Santykinis populiacijos padvigubėjimas (*angl.* RPD) – populiacijos padvigubėjimų skaičiaus padidėjimas chemine medžiaga veikiamose kultūrose, palyginti su neapdorotomis kultūromis, santykį išreiškiant procentine dalimi.

S9 kepenų frakcija – skystis virš kepenų homogenato, gautas po centrifugavimo esant 9 000 *g*, t. y. žalių kepenų ekstraktas.

S9 mišinys – S9 kepenų frakcijos ir fermentų metaboliniam aktyvumui būtinų kofaktorių mišinys.

Tirpiklio kontrolinis ėminys – bendras terminas, apibūdinantis kontrolines kultūras, į kurias dedama vien tik tirpiklio, naudoto bandomajai cheminei medžiagai ištirpinti.

Struktūrinė aberacija – chromosomos struktūros pokytis, kurį galima nustatyti dalijimosi ciklo metafazės ląsteles tiriant mikroskopu; jis pasireiškia kaip delecijos ir fragmentai, pokyčiai grandinių viduje ar tarp grandinių.

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Neapdorotieji kontroliniai ėminiai – kultūros, kurios neapdorojamos (t. y. nededama bandomosios cheminės medžiagos ar tirpiklio), bet yra tiriamos vienu metu su kultūromis, į kurias dedama bandomoji cheminė medžiaga.

▼M7

2 priedėlis

CITOTOKSIŠKUMO VERTINIMO FORMULĖS

Mitozinis indeksas (MI):

$$\mathbf{MI}(\%) = \frac{\text{Mitozinių ląstelių skaičius}}{\text{Suminis skaičiuotų ląstelių skaičius}} \times 100$$

Rekomenduojama naudoti **santykinį ląstelių skaičiaus padidėjimą (RICC)** ar **santykinį populiacijos padvigubėjimą (RPD)**, nes abiem atvejais atsižvelgiama į padalytų ląstelių populiacijos dalį.

$$\mathbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{Apdorotų kultūrų ląstelių skaičiaus padidėjimas(pabaiga – pradžia)})}{(\text{Kontrolinių kultūrų ląstelių skaičiaus padidėjimas(pabaiga – pradžia)})} \times 100$$

$$\mathbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{Apdorotų kultūrų populiacijos dvigubėjimų skaičius})}{(\text{Kontrolinių kultūrų populiacijos dvigubėjimų skaičius})} \times 100$$

čia:

Populiacijos padvigubėjimas = [log (ląstelių skaičius po apdorojimo ÷ pradinis ląstelių skaičius)] ÷ log 2

Pvz., 53 % RICC ar RPD rodo 47 % citotoksiškumą ar citostazę, o 55 % citotoksiškumas ar citostazė matuojant MI reiškia, kad faktinis MI yra 45 % kontrolinio ėminio.

Visais atvejais reikėtų išmatuoti ląstelių skaičių prieš apdorojimą ir apdorojamose bei neigiamų kontrolinių ėminių kultūrose jis turėtų būti vienodas.

Nors praeityje kaip citotoksiškumo parametras buvo naudojamas RCC (t. y. apdorotų kultūrų ląstelių skaičius/ kontrolinių kultūrų ląstelių skaičius), jis daugiau nerekomenduojamas, nes gali būti gautas per mažas citotoksiškumo įvertis.

Neigiamų kontrolinių kultūrų populiacijos padvigubėjimas turėtų būti suderinamas su reikalavimu imti ląstelių ėminius nuo apdorojimo praėjus laikui, kuris būtų maždaug 1,5 karto ilgesnis nei normalaus ląstelių ciklo trukmė, o mitozinis indeksas turėtų būti gana didelis, kad būtų gautas pakankamas mitozės etapo ląstelių skaičius ir būtų galima patikimai apskaičiuoti 50 % sumažėjimą.

▼M7

B.11. ŽINDUOLIŲ KAULŲ ČIULPŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJŲ BANDYMAS

ĮVADAS

Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) 475 (2014). Jis yra genetinės toksikologijos metodų serijos dalis. Yra parengtas EBPO dokumentas, kuriame glaustai pateikiama informacijos apie genetinės toksikologijos bandymus ir naujausių šių gairių pakeitimų apžvalga (1).

Žinduolių kaulų čiulpų chromosomų aberacijų bandymas *in vivo* ypač tinka genotoksiškumui vertinti, nes, nors skirtingų gyvūnų rūšių chromosomos gali skirtis, *in vivo* metabolizmo veiksniai, farmakokinetika ir DNR atkūrimo procesai yra aktyvūs ir prisideda prie atsakų. Tyrimas *in vivo* taip pat naudingas toliau tiriant *in vitro* sistemoje nustatytą genotoksiškumą.

Žinduolių chromosomų aberacijų tyrimas *in vivo* naudojamas nustatant struktūrines chromosomų aberacijas, kurias bandomoji cheminė medžiaga sukelia žinduolių, paprastai graužikų, kaulų čiulpų ląstelėse (2) (3) (4) (5). Struktūrinės chromosomų aberacijos gali būti dviejų tipų – chromosominės arba chromatidinės. Nors dauguma genotoksinių cheminių medžiagų sukeltų aberacijų yra chromatidinės, tačiau pasitaiko ir chromosominių aberacijų. Chromosomų pažeidimas ir su juo susiję reiškiniai yra daugumos genetiškai paveldimų žmonių ligų priežastis ir yra esminių įrodymų, kad, kai šie pažeidimai ir susiję reiškiniai sukelia onkogenų bei navikų supresorinių genų pokyčius, jie prisideda prie žmonių ir bandymų sistemų vėžio atsiradimo. Atliekant chromosomų aberacijų tyrimus *in vivo* galėtų atsirasti poliploidija (įskaitant endoreduplikaciją). Tačiau pati padidėjusi poliploidija nerodo aneugeninio potencialo ir ji tiesiog gali rodyti ląstelių ciklo sutrikimą ar citotoksiškumą. Šis bandymas nenumatytas aneuploidijai matuoti. Žinduolių eritrocitų mikrobranduolių bandymas *in vivo* (šio priedo B.12 skyrius) arba žinduolių ląstelių mikrobranduolių bandymas *in vitro* (šio priedo B.49 skyrius) būtų *in vivo* ir *in vitro* bandymai, rekomenduojami aneuploidijai aptikti.

Vartojamų terminų apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI

Šiam bandymui atlikti paprastai naudojami graužikai, bet kai kuriais atvejais gali tikti kitos rūšys, jei jų naudojimas būtų moksliškai pagrįstas. Šio bandymo tikslinis audinys yra kaulų čiulpai, kadangi jis yra gausiai vaskuliarizuotas audinys ir turi sparčiai besidauginančių ląstelių, kurias galima atskirti ir apdoroti, populiaciją. Kitų nei žiurkės ar pelės rūšių naudojimas turėtų būti moksliškai pagrįstas ataskaitoje. Jei naudojamos kitos nei graužikai rūšys, rekomenduojama kaulų čiulpų chromosomų aberacijos matavimą įtraukti į kitą tinkamą toksiškumo bandymą.

Jei yra duomenų, kad bandomoji (-osios) cheminė (-ės) medžiaga (-os) ar jos arba jų metabolitas (-ai) nepasieks tikslinio audinio, jis gali būti netinkamas naudoti šiame bandyme.

Prieš šiuo bandymų metodu bandant mišinį, siekiant gauti duomenų numatomo reglamentavimo tikslais, reikėtų apsvarstyti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus, ir, jei taip, dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį.

▼M7

BANDYMŲ METODO PRINCIPAS

Gyvūnai veikiami bandomąja chemine medžiaga tinkamu veikimo būdu ir reikiamu momentu po paveikimo humaniškai numarinami. Prieš numarinant gyvūnai paveikiami agentu, stabdančiu metafazę (pvz., kolchicinu ar kolcemidu). Tada iš kaulų čiulpų ląstelių ruošiami chromosomų preparatai, jie dažomi, ir metafazės ląstelės tiriamos mikroskopu chromosomų aberacijoms nustatyti.

LABORATORIJOS KVALIFIKACIJOS TIKRINIMAS

Kvalifikacijos tyrimai

Siekdama įgyti pakankamos tyrimo atlikimo patirties prieš jį taikydama įprastiniams bandymams, laboratorija turėtų įrodyti gebėjimą atkurti paskelbtų duomenų (pvz., (6)) tikėtinus chromosomų aberacijų dažnumo rezultatus, naudodama ne mažiau kaip dvi teigiamas kontrolines chemines medžiagas (įskaitant mažos dozės teigiamų kontrolinių ėminių sukeltus silpnus atsakus), pvz., išvardytas 1 lentelėje, ir suderinamų tirpiklių ir (arba) nešiklių kontrolinius ėminius (žr. 22 pastraipą). Atliekant šiuos bandymus, reikėtų naudoti dozes, kurioms esant tiriamajame audinyje (kaulų čiulpuose) gaunami atkuriami ir su doze susiję padidėjimai, ir įrodyti bandymų sistemos jautrį ir dinaminį diapazoną, pasitelkiant laboratorijoje taikomą vertinimo metodą. Šis reikalavimas netaikomas patirties turinčioms laboratorijoms, t. y. toms, kurios turi istorinių duomenų bazę, prieinamą kaip apibrėžta 10–14 pastraipose.

Istorinių kontrolinių ėminių duomenys

Atlikdama kvalifikacijos tyrimus, laboratorija turėtų nustatyti:

— istorinių teigiamų kontrolinių ėminių intervalą ir pasiskirstymą,

— istorinių neigiamų kontrolinių ėminių intervalą ir pasiskirstymą.

Pirmą kartą gaunant duomenis, skirtus istorinių neigiamų kontrolinių ėminių pasiskirstymui, vienalaikiai neigiami kontroliniai ėminiai turėtų atitikti paskelbtus kontrolinius duomenis, jei jie yra. Istorinių kontrolinių ėminių pasiskirstymą papildant vis didesniu bandymų duomenų kiekiu, būtų gerai, kad vienalaikiai neigiami kontroliniai ėminiai patektų į to skirstinio 95 % kontrolines ribas. Laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazė turėtų būti statistiškai patikima, kad būtų užtikrintas laboratorijos gebėjimas vertinti savo neigiamų kontrolinių ėminių duomenų pasiskirstymą. Literatūroje daroma prielaida, kad gali prireikti ne mažiau kaip 10 bandymų, bet būtų geriau, jei palyginamosiomis Bandymo sąlygomis atliktų bandymų skaičius būtų ne mažesnis kaip 20. Laboratorijos turėtų taikyti kokybės kontrolės metodus, tokius kaip kontrolinės diagramos (pvz., C tipo ar X juostinės diagramos (7)), kad galėtų nustatyti savo duomenų kintamumą ir įrodyti metodikos „valdomumą“ savo laboratorijoje. Papildomas rekomendacijas, kaip kurti ir naudoti istorinius duomenis (t. y. duomenų įtraukimo ir pašalinimo iš istorinių duomenų kriterijus ir tam tikro bandymo priimtinumo kriterijus) galima rasti literatūroje (8).

Jei, atliekant 9 skirsnyje aprašytus kvalifikacijos tyrimus, laboratorijai nepakanka bandymų skaičiaus statistiškai patikimam neigiamų kontrolių ėminių skirstiniui gauti (žr. 11 pastraipą), priimtina skirstinį papildyti atliekant pirmuosius įprastinius bandymus. Taikant šį būdą, reikėtų laikytis literatūroje nurodytų rekomendacijų (8), o atliekant šiuos bandymus gauti neigiamų kontrolinių ėminių rezultatai turėtų būti suderinami su paskelbtais neigiamų kontrolinių ėminių duomenimis.

▼M7

Į visus bandymų protokolo pakeitimus reikėtų žiūrėti atsižvelgiant į jų poveikį gaunamiems duomenims, kurie turi likti suderinami su esamomis laboratorijos istorinių kontrolinių ėminių duomenų bazėmis. Tik esant didesnėms neatitiktims turėtų būti kuriama nauja istorinių kontrolinių ėminių duomenų bazė, jei, atsižvelgiant į ekspertų nuomonę, nustatoma, kad ji skiriasi nuo ankstesnio skirstinio (žr. 11 pastraipą). Atkūrimo metu atliekamam bandymui gali neprireikti visos neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazės, jei laboratorija gali įrodyti, kad vienalaikių neigiamų kontrolinių ėminių vertės ir toliau yra suderinamos su ankstesne duomenų baze arba su atitinkamais paskelbtais duomenimis.

Neigiamų kontrolinių ėminių duomenis turėtų sudaryti kiekvieno gyvūno struktūrinės chromosomų aberacijos dažnumas (išskyrus plyšius). Būtų gerai, kad vienalaikiai neigiami kontroliniai ėminiai patektų į laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazės skirstinio 95 % kontrolines ribas. Jei vienalaikių neigiamų kontrolinių ėminių duomenys nepatenka į 95 % kontrolines ribas, jie gali būti tinkami įtraukti į istorinių kontrolinių ėminių skirstinį, jei jie nėra kraštiniai riktai ir yra įrodymų, kad bandymo sistema yra „valdoma“ (žr. 11 pastraipą) ir kad nėra techninių ar žmogaus klaidų.

METODO APRAŠYMAS

Parengiamieji darbai

Gyvūnų rūšies parinkimas

Reikėtų tirti dažniausiai naudojamas sveikų jaunų suaugusių gyvūnų laboratorines veisles. Paprastai naudojamos žiurkės, nors taip pat gali tikti pelės. Galima naudoti kitas tinkamas žinduolių rūšis, jei ataskaitoje tai būtų moksliškai pagrįsta.

Gyvūnų laikymo ir šėrimo sąlygos

Temperatūra graužikų patalpoje turėtų būti 22 °C (± 3 °C). Nors geriausia būtų užtikrinti 50–60 % drėgmę, ji neturėtų būti mažesnė kaip 40 % ir būtų gerai, jei ji nebūtų didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos valymo laiką. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, taikant 12 h šviesos ir 12 h tamsos seką. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijose naudojamas pašaras, neribojant geriamojo vandens kiekio. Pašaro pasirinkimui gali turėti įtakos būtinybė užtikrinti tinkamą bandomosios cheminės medžiagos sumaišymą su pašaru, kai ji duodama tokiu būdu. Jei nesitikima agresyvaus elgesio, graužikus reikėtų laikyti nedidelėmis vienos lyties vienodai apdorojamomis grupėmis (ne daugiau kaip po penkis viename narvelyje), pageidautina narveliuose su kietomis grindimis ir esant atitinkamai pagerintai aplinkai. Tik moksliškai pagrįstais atvejais gyvūnus galima laikyti atskirai.

Gyvūnų paruošimas

Paprastai naudojami sveiki, jauni suaugę gyvūnai (geriausias graužikų amžius apdorojimo pradžioje yra 6–10 savaičių, nors leidžiama naudoti šiek tiek vyresnius gyvūnus), kurie atsitiktinai paskirstomi į kontrolines ir apdorojamas grupes. Kiekvienas gyvūnas humanišku minimaliai invaziniu būdu paženklinamas unikaliu ženklu (pvz., žieduojant, kabinant etiketę, naudojant mikrolustą ar biometrinį identifikavimą, bet ne ausų ar pėdų spaustukus) ir aklimatizuojami laboratorinėmis sąlygomis ne trumpiau kaip 5 paras. Narvelius reikėtų įrengti taip, kad jų išdėstymo poveikis būtų minimalus. Reikėtų vengti teigiamo kontrolinio ėminio ir bandomosios cheminės medžiagos kryžminės taršos. Tyrimo pradžioje gyvūnų masės skirtumas turėtų būti minimalus ir neviršyti ± 20 % kiekvienos lyties vidutinės gyvūno masės.

Dozių ruošimas

Kietąsias bandomąsias chemines medžiagas prieš dozuojant gyvūnams reikėtų ištirpinti atitinkamuose tirpikliuose ar nešikliuose, paruošti jų suspensiją arba įmaišyti į pašarą ar geriamąjį vandenį. Skystąsias bandomąsias chemines medžiagas galima dozuoti tiesiogiai arba prieš tai praskiesti. Jei bandomoji

▼M7

cheminė medžiaga patenka per kvėpavimo takus, ją, atsižvelgiant į jos fizikines ir chemines savybes, galima duoti dujų, garų arba kietojo ar skystojo aerozolio pavidalu. Reikėtų naudoti tik iš naujo paruoštus bandomosios cheminės medžiagos preparatus, nebent stabilumo duomenys rodo, kad laikymas priimtinas ir yra apibrėžtos tinkamos laikymo sąlygos.

Tirpiklis ir (arba) nešiklis

Neturėtų būti tirpiklio ar nešiklio toksinio poveikio, esant naudojamiems dozių dydžiams, ir neturėtų kilti įtarimų, kad galėtų vykti jų cheminė reakcija su bandomosiomis cheminėmis medžiagomis. Jei naudojami kiti nei gerai žinomi tirpikliai ar nešikliai, juos galima įtraukti tik pateikus suderinamumą rodančius etaloninius duomenis. Rekomenduojama visuomet iš pradžių atsižvelgti į galimybę naudoti vandeninį tirpiklį arba nešiklį. Dažniausiai naudojamų suderinamų tirpiklių ar nešiklių pavyzdžiai yra vanduo, fiziologinis tirpalas, metilceliuliozės tirpalas, karboksimetilceliuliozės natrio druskos tirpalas, alyvuogių ir kukurūzų aliejus. Jei nėra istorinių arba paskelbtų kontrolinių duomenų, kurie rodo, kad pasirinktas netipinis tirpiklis ar nešiklis nesukelia struktūrinių aberacijų ar kitokio žalingo poveikio, reikėtų atlikti pradinį tyrimą tirpiklio ar nešiklio kontrolinio ėminio priimtinumui nustatyti.

Kontroliniai ėminiai

Teigiami kontroliniai ėminiai

Paprastai į kiekvieną bandymą reikėtų įtraukti grupę gyvūnų, apdorotų teigiama kontroline chemine medžiaga. To galima atsisakyti, jei bandymų laboratorija įrodė kvalifikaciją atlikti bandymą ir nustatė istorinių teigiamų kontrolinių ėminių intervalą. Jei vienalaikių teigiamų kontrolinių ėminių grupė neįtraukiama, į kiekvieną bandymą reikėtų įtraukti vertinimo kontrolinius ėminius (fiksuotus ir nedažytus objektinius stiklelius). Juos galima gauti į tyrimo vertinimą įtraukiant atitinkamus etaloninius ėminius, kurie būtų gauti bandymų laboratorijoje periodiškai (pvz., kas 6–18 mėnesių) atliekant atskirą teigiamo kontrolinio ėminio bandymą, pvz., kvalifikacijos tyrimo metu ir reguliariai vėliau, jei būtina, ir tuos ėminius laikyti.

Teigiamos kontrolinės cheminės medžiagos turėtų patikimai sukelti ląstelių su struktūrinėmis chromosomų aberacijomis aiškų dažnumo padidėjimą, palyginti su savaiminiu lygiu. Reikėtų pasirinkti tokias teigiamų kontrolinių ėminių dozes, kad poveikis būtų ryškus, bet skaičiuotojui ne iškarto atsiskleistų užkoduotų ėminių tapatybė. Teigiamą kontrolinę cheminę medžiagą galima duoti kitu nei bandomoji cheminė medžiaga būdu, taikant skirtingą apdorojimo planą ir ėminius imant tik vienu laiko momentu. Be to, jei tinka, galima atsižvelgti į tos pačios cheminės klasės teigiamų kontrolinių cheminių medžiagų naudojimą. Teigiamų kontrolinių cheminių medžiagų pavyzdžiai pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė

Teigiamų kontrolinių cheminių medžiagų pavyzdžiai

Cheminė medžiaga	CAS Nr.
Etilmetansulfonatas	62-50-0
Metilmetansulfonatas	66-27-3
Etilnitrozokarbamidas	759-73-9
Mitomicinas C	50-07-7
Ciklofosfamidas (monohidratas)	50-18-0 (6055-19-2)
Trietilenmelaminas	51-18-3

▼M7

Neigiami kontroliniai ėminiai

Neigiamos kontrolinės grupės gyvūnus reikėtų įtraukti kiekvieną kartą imant ėminį ir su jais elgtis kaip su apdorojama grupe, išskyrus tai, kad gyvūnai nepaveikiami bandomąja chemine medžiaga. Jei bandomajai cheminei medžiagai duoti naudojamas tirpiklis ar nešiklis, kontrolinė grupė turėtų gauti šio tirpiklio ar nešiklio. Tačiau jei kiekvienam ėminių ėmimo laikui bandymų laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenys rodo pastovų kintamumą tarp gyvūnų ir ląstelių su struktūrinėmis aberacijomis dažnumą, gali pakakti paimti tik vieną neigiamą kontrolinį ėminį. Jei imamas tik vienas neigiamas kontrolinis ėminys, jis turėtų būti imamas pirmą kartą imant atliekamo tyrimo ėminį.

PROCEDŪRA

Gyvūnų skaičius ir lytis

Apskritai, vyriškos ir moteriškos lyties gyvūnų mikrobranduolių atsakas yra panašus (9) ir tikėtina, kad taip atsitiks tiriant struktūrines chromosomų aberacijas, todėl daugumą tyrimų būtų galima atlikti su bet kurios lyties gyvūnais. Jei duomenys rodytų esminius skirtumus tarp patinų ir patelių (pvz., sisteminio toksiškumo, metabolizmo, biologinio įsisavinamumo, toksiškumo kaulų čiulpams ir kt. skirtumus, įskaitant, pvz., intervalo nustatymo tyrimą), tai paskatintų naudoti abiejų lyčių gyvūnus. Šiuo atveju galbūt reikėtų atlikti tyrimą su abiejų lyčių gyvūnais, pvz., kaip kartotinės dozės toksiškumo tyrimo dalį. Jei naudojamos abi lytys, galbūt tiktų taikyti faktorinės analizės schemą. Išsami informacija, kaip analizuoti duomenis taikant šią schemą, pateikta 2 priedėlyje.

Reikėtų nustatyti grupių dydį tyrimo pradžioje, turint tikslą vienai grupei gauti ne mažiau kaip 5 analizei tinkamus vienos lyties gyvūnus arba kiekvienos lyties gyvūnus, jei naudojami abiejų lyčių gyvūnai. Jei cheminių medžiagų poveikis žmonėms gali priklausyti nuo lyties, pvz., kai kurių vaistų atveju, bandymas turėtų būti atliekamas su atitinkamos lyties gyvūnais. Atliekant kaulų čiulpų tyrimą, kai trijų dozių grupių ir vienos vienalaikio neigiamo kontrolinio ėminio grupės ėminiai imami du kartus, ir dar yra teigiamo kontrolinio ėminio grupė (kiekvieną grupę sudaro penki vienos lyties gyvūnai), rekomenduojamas tipinis maksimalus gyvūnų poreikis būtų 45 gyvūnai.

Dozių dydžiai

Jei atliekamas parengiamasis intervalo nustatymo tyrimas, nes nėra tinkamų duomenų, kurie padėtų pasirinkti dozę, jį reikėtų atlikti toje pačioje laboratorijoje, naudojant pagrindiniam tyrimui naudoti numatytą rūšį, veislę, lytį ir apdorojimo schemą (10). Tyrimo tikslas – nustatyti didžiausią toleruojamą dozę (MTD), apibrėžiamą kaip didžiausia dozė, kuri būtų toleruojama nesant tyrimą ribojančio toksiškumo požymių, susijusių su tyrimo laikotarpio trukme (pvz., sukeliant kūno masės sumažėjimą arba hematopoetinės sistemos citotoksiškumą, bet ne žūtį ar skausmo, kančių ar išsekimo požymius, dėl kurių gyvūną reikėtų humaniškai numarinti (11)).

Didžiausią dozę taip pat būtų galima apibrėžti kaip dozę, kuri būtų tam tikras toksiškumo kaulų čiulpams rodiklis.

Cheminės medžiagos, kurios rodo toksikokinetinių savybių prisotinimą arba po ilgalaikio veikimo sukelia detoksifikavimo procesus, galinčius mažinti poveikį, gali būti dozės nustatymo kriterijų išimtys ir turėtų būti įvertinamos kiekvienu atveju atskirai.

Siekiant gauti informacijos apie dozės ir atsako priklausomybę, į išsamų tyrimą reikėtų įtraukti neigiamo kontrolinio ėminio grupę ir ne mažiau kaip tris dozes, kurių dydžio skirtumo faktorius būtų 2, bet ne didesnis kaip 4. Jei cheminė medžiaga nerodo toksiškumo atliekant intervalo nustatymo tyrimą arba atsižvelgiant į turimus duomenis, didžiausia vienkartinio davimo dozė turėtų būti 2 000 mg/kg kūno masės. Tačiau jei bandomoji cheminė medžiaga yra toksiška,

▼M7

didžiausia duodama dozė turėtų būti MTD, o naudojami dozių dydžiai turėtų aprėpti intervalą nuo didžiausios dozės iki mažo toksiškumo arba visiškai jo nesukeliančios dozės. Kai toksiškumas tiksliniam audiniui (kaulų čiulpams) stebimas visiems bandomiems dozės dydžiams, patartina toliau tirti netoksines dozes. Tyrimams, kurių tikslas būtų išsamiau apibūdinti kiekybinę dozės ir atsako priklausomybės informaciją, gali prireikti papildomų dozių grupių. Tam tikrų tipų bandomųjų cheminių medžiagų (pvz., vaistų žmonėms), kurioms taikomi specifiniai reikalavimai, šios ribos gali skirtis.

Ribinis bandymas

Jei dozės intervalo nustatymo bandymai arba esami susijusių gyvūnų veislių duomenys rodo, kad apdorojimo režimu bent ribinė dozė (aprašyta toliau) nesukelia jokio toksinio poveikio (įskaitant tai, kad nėra kaulų čiulpų proliferacijos slopinimo ar kitų citotoksiškumo tiksliniam audiniui požymių) ir, jei atsižvelgiant *in vitro* genotoksiškumo tyrimus arba į giminingos struktūros cheminėms medžiagoms gautus duomenis, genotoksiškumo nereikėtų tikėtis, visas bandymas naudojant trijų dydžių dozes gali būti nebūtinas, jei būtų įrodyta, kad bandomoji (-osios) cheminė (-ės) medžiaga (-os) pasiekia tikslinį audinį (kaulų čiulpus). Tokiais atvejais gali pakakti vienos ribinio dydžio dozės. Jei davimo laikotarpis > 14 parų, ribinė dozė yra 1 000 mg/kg kūno masės per parą. Jei davimo laikotarpis – 14 parų arba trumpesnis, ribinė dozė yra 2 000 mg/kg kūno masės per parą.

Dozių davimas

Rengiant bandymo schemą, reikėtų atsižvelgti į numatomą poveikio žmogui būdą. Todėl galima pasirinkti pagrįstus veikimo būdus, pvz., duoti su pašaru, geriamuoju vandeniu, atlikti vietinę poodinę arba intraveninę injekciją, duoti per burną (per zondą), kvėpavimo takus, intubacinį vamzdelį ar implantuoti. Visais atvejais turėtų būti pasirinktas būdas, kuris užtikrintų reikiamą tikslinio (-ių) audinio (-ių) veikimą. Injekcija į pilvo ertmę paprastai nerekomenduojama, nes tai nėra numatytas poveikio žmogui būdas ir jį reikėtų naudoti, tik jei būtų specialiai moksliškai pagrįstas. Jei bandomoji cheminė medžiaga įmaišoma į pašarą ar į geriamąjį vandenį, ypač vienkartinio dozavimo atveju reikėtų imtis priemonių, kad laiko tarpas nuo maisto bei vandens vartojimo iki ėminių ėmimo būtų pakankamas poveikiui aptikti (žr. 33–34 pastraipas). Skysčio, kurį galima duoti per zondą arba įšvirkšti per vieną kartą, maksimalus tūris priklauso nuo bandymo gyvūno dydžio. Tūris neturėtų būti didesnis kaip 1 ml/100 g kūno masės, išskyrus vandeninius tirpalus, kurių galima duoti ne daugiau kaip po 2 ml/100 g kūno masės. Didesnio nei šis tūrio naudojimą reikėtų pagrįsti. Išskyrus dirginančias ar ėsdinančias bandomąsias chemines medžiagas, kurios, būdamos didesnės koncentracijos, paprastai sukeltų sunkesnį poveikį, bandymo tūrio kintamumas turėtų būti kuo mažesnis reguliuojant koncentraciją, kad būtų užtikrintas visų dydžių dozių tūrio pastovumas kūno masės atžvilgiu.

Apdorojimo planas

Paprastai bandomosios cheminės medžiagos duodamos per vieną kartą, bet, siekiant palengvinti didelių tūrių davimą, dozę galima padalyti (t. y. per vieną dieną apdoroti du arba daugiau kartų, tarp apdorojimų esant ne ilgesniam kaip 2–3 h tarpui). Šiomis aplinkybėmis arba tais atvejais, kai bandomoji cheminė medžiaga duodama ją įkvepiant, ėminių ėmimo tvarkaraštį reikėtų sudaryti atsižvelgiant į paskutinės dozės davimo arba veikimo pabaigos laiką.

Turima mažai duomenų apie kartotinės dozės protokolo tinkamumą šiam bandymui. Tačiau jei šį bandymą norima sujungti su kartotinės dozės toksiškumo bandymu, reikėtų imtis priemonių išvengti mitozinių ląstelių su pažeistomis chromosomomis nuostolių, kurių gali būti esant toksinėms dozėms. Toks sujungimas

▼M7

yra priimtinas, kai didžiausia dozė yra lygi ribinei dozei arba didesnė (žr. 29 pastraipą) ir dozės grupei duodama ribinė dozė visą apdorojimo laikotarpio trukmę. Į mikrobranduolių bandymą (B.12 bandymų metodas) galima žiūrėti kaip į geriausią chromosomų aberacijų bandymą *in vivo*, kai siekiama jungti su kitais tyrimais.

Kaulų čiulpų ėminiai turėtų būti imami atskirai du kartus po vienkartinio apdorojimo. Graužikų pirmasis ėminių ėmimo intervalas turėtų būti laikas, kuris yra būtinas, kad galėtų baigtis laikotarpis, 1,5 karto ilgesnis nei normalaus ląstelių ciklo trukmė (pastaroji paprastai yra 12–18 h po apdorojimo laikotarpio). Kadangi bandomosios (-ųjų) cheminės (-ių) medžiagos (-ų) sugertis ir metabolizmas, taip pat medžiagos (-ų) įtaka ląstelių ciklo kinetikai gali paveikti optimalų chromosomų aberacijos aptikimo laiką, rekomenduojama antrąjį ėminį paimti praėjus 24 h nuo pirmojo ėminio paėmimo. Imant ėminį pirmą kartą, visos dozių grupės turėtų būti apdorotos ir ėminiai paimti analizei, tačiau, imant ėminį kitą (-us) kartą (-us), duoti reikia tik didžiausią dozę. Jei moksliškai yra pagrįstos daugiau kaip vienos paros dozės davimo schemos, paprastai ėminius reikėtų imti vieną kartą, po galutinio apdorojimo praėjus laikui, maždaug 1,5 ilgesniam nei normalaus ląstelių ciklo trukmė.

Po apdorojimo ir prieš ėminių surinkimą gyvūnams suleidžiama injekcija į pilvo ertmę su metafazę stabdančios medžiagos (pvz., kolchicino ar kolcemido) reikiama doze, ir ėminiai surenkami po reikiamo laiko tarpo. Pelėms šis laiko tarpas prieš surinkimą yra maždaug 3–5 h, žiurkėms – 2–5 h. Ląstelės surenkamos iš kaulų čiulpų, brinkinamos, fiksuojamos, dažomos ir analizuojamos chromosomų aberacijoms nustatyti (12).

Stebėjimai

Reikėtų atlikti bendruosius bandymo gyvūnų klinikinius stebėjimus ir bent kartą per dieną registruoti klinikinius požymius, pageidautina kartą ar kelis kartus kasdien tuo pačiu laiku, atsižvelgiant į didžiausio numatomo poveikio laiką po dozės davimo. Mažiausiai du kartus per dieną dozavimo laikotarpiu visus gyvūnus reikėtų apžiūrėti siekiant nustatyti liguistumo ir gaištamumo požymius. Visi gyvūnai turėtų būti sveriami tyrimo pradžioje, bent kartą per savaitę kartotinės dozės tyrimų metu ir numarinant. Jei tyrimai atliekami ne trumpiau kaip vieną savaitę, bent kartą per savaitę reikėtų matuoti pašaro suvartojimą. Jei bandomoji cheminė medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu, suvartoto vandens kiekį reikėtų išmatuoti kaskart, kai vanduo keičiamas, ir bent kartą per savaitę. Gyvūnus, kuriems pasireiškia nemirtini pernelyg didelio toksiškumo požymiai, reikėtų humaniškai numarinti dar nesibaigus bandymo laikotarpiui (11).

Tikslinio audinio veikimas

Reikiamu laiku vieną ar kelis kartus reikėtų paimti kraujo ėminį bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijai plazmoje nustatyti, siekiant įsitikinti, ar kaulų čiulpai buvo paveikti, jei reikalaujama ir jei nėra kitų poveikio duomenų (žr. 44 pastraipą).

Kaulų čiulpų ir chromosomų preparatai

Iš karto po humaniško numarinimo gaunamos kaulų čiulpų ląstelės iš gyvūnų šlaunikaulių ar blauzdikaulių, veikiamos hipotoniniu tirpalu ir fiksuojamos. Metafazės ląstelės paskleidžiamos ant objektinių stiklelių ir dažomos nustatytais būdais (žr. (3) (12)).

▼M7

Analizė

Visi objektiniai stikleliai, įskaitant teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių, prieš analizę turėtų būti atskirai koduojami ir randomizuojami, kad skaičiuotojas nežinotų apdorojimo sąlygų.

Reikėtų nustatyti mitozinį indeksą kaip citotoksiškumo matą, įvertinant citotoksiškumą mažiausiai 1 000 ląstelių vienam gyvūnui, jį nustatant visiems apdorotiems gyvūnams (įskaitant teigiamus kontrolinius ėminius), neapdorotiems gyvūnams arba tirpiklio ar nešiklio neigiamų kontrolinių ėminių gyvūnams.

Reikėtų ištirti ne mažiau kaip 200 metafazės kiekvieno gyvūno ląstelių, kad būtų nustatytos struktūrinės chromosomų aberacijos, įtraukiant ir neįtraukiant plyšių (6). Tačiau jei istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazė rodo, kad bandymo laboratorijos vidutinis foninis struktūrinių chromosomų aberacijų dažnumas yra < 1 %, reikėtų atsižvelgti į galimybę skaičiuoti papildomas ląsteles. Chromatidinė ir chromosominė aberacijos turėtų būti registruojamos atskirai ir klasifikuojamos pagal potipius (trūkius, mainus). Laboratorijoje taikomos procedūros turėtų užtikrinti, kad chromosomų aberacijų analizę atlieka tinkamai apmokyti skaičiuotojai ir, jei reikia, ją peržiūrėtų ekspertai. Atsižvelgiant į tai, kad objektinių stiklelių ruošimo procedūrų dažnas rezultatas dėl gautų chromosomų nuostolių pakeičia metafazės ląstelių dalį, skaičiuojamų ląstelių centromerų skaičius turėtų būti ne mažesnis kaip $2n \pm 2$, kai n yra tos rūšies haploidinis chromosomų skaičius.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

Kiekvieno gyvūno bandymų rezultatai turėtų būti pateikiami lentelėse. Reikėtų įvertinti kiekvieno gyvūno mitozinį indeksą, suskaičiuotų metafazės ląstelių skaičių, aberacijų vienai metafazės ląstelei skaičių ir ląstelių su strūktūrine (-ėmis) chromosomų aberacija (-omis) procentinę dalį. Turėtų būti išvardyti apdorotų ir kontrolinių grupių gyvūnų skirtingi struktūrinių chromosomų aberacijų tipai, nurodant jų skaičių bei dažnumą. Plyšiai, taip pat poliploidinės ląstelės ir ląstelės su endoreduplikuotomis chromosomomis yra registruojamos atskirai. Plyšių dažnumas pateikiamas ataskaitoje, bet paprastai neįtraukiamas į suminio struktūrinių aberacijų dažnumo analizę. Jei nėra atsako skirtumo dėl lyties įrodymų, atliekant statistinę analizę duomenis galima apjungti. Ataskaitoje taip pat reikėtų pateikti toksiškumo gyvūnams ir klinikinių požymių duomenis.

Priimtinumo kriterijai

Apie bandymo priimtinumą sprendžiama pagal šiuos kriterijus:

a) vienalaikis neigiamas kontrolinis ėminys laikomas tinkamu įtraukti į laboratorijos istorinių kontrolinių duomenų bazę (žr. 11–14 pastraipas);

b) vienalaikiai teigiami kontroliniai ėminiai arba skaičiavimo kontroliniai ėminiai turėtų sukelti atsakus, kurie būtų suderinami su rastais istorinių teigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazėje, ir duoti statistiškai reikšmingą padidėjimą palyginti su neigiamu kontroliniu ėminiu (žr. 20–21 pastraipą);

c) atlikta reikiamo dozių ir ląstelių skaičiaus analizė;

d) didžiausios dozės pasirinkimo kriterijai atitinka aprašytus 25–28 pastraipose.

Rezultatų įvertinimas ir aiškinimas

Jei įvykdomi visi priimtinumo kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai teigiama, jei:

▼M7

a) bent viena iš apdorotų grupių rodo statistiškai reikšmingą ląstelių su struktūrinėmis chromosomų aberacijomis (išskyrus plyšius) dažnumo padidėjimą palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu;

b) padidėjimas bent vienam ėminio ėmimo laikui yra susijęs su doze, kai įvertinama pagal atitinkamą tendencijos kriterijų ir

c) kuris nors iš rezultatų yra už istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų skirstinio ribų (pvz., Puasono skirstinio 95 % kontrolinių ribų).

Jei tam tikru ėminio ėmimo laiku tiriama tik didžiausia dozė, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai teigiama, jei yra statistiškai reikšmingas padidėjimas, palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu, o rezultatai yra už istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų skirstinio ribų (pvz., Puasono skirstinio 95 % kontrolinių ribų). Rekomendacijų dėl tinkamų statistinių metodų galima rasti literatūroje (13). Atliekant dozės ir atsako priklausomybės analizę, reikėtų analizuoti ne mažiau kaip tris dozę gavusias grupes. Taikant statistinius kriterijus, bandymo vienetu turėtų būti gyvūnas. Teigiami chromosomų aberacijų bandymo rezultatai rodo, kad bandomoji cheminė medžiaga sukelia bandomųjų rūšių kaulų čiulpų struktūrines chromosomų aberacijas.

Jei įvykdomi visi priimtinumo kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai neigiama, jei visomis ištirtomis bandymo sąlygomis:

a) nei viena apdorota grupė nerodo statistiškai reikšmingo ląstelių su struktūrinėmis chromosomų aberacijomis (išskyrus plyšius) dažnumo padidėjimo palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu;

b) nėra su doze susijusio padidėjimo bet kuriuo ėminių ėmimo laiku, kai įvertinama pagal atitinkamą tendencijos kriterijų,

c) visi rezultatai patenka tarp istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų skirstinio ribų (pvz., Puasono skirstinio 95 % kontrolinių ribų) ir

d) kaulų čiulpai buvo veikiami bandomąja (-osiomis) chemine (-ėmis) medžiaga (-omis).

Rekomendacijų dėl tinkamiausių statistinių metodų galima rasti literatūroje (13). Kaulų čiulpų veikimo bandomąja chemine medžiaga įrodymu gali būti mitozinio indekso sumažėjimas arba bandomosios (-ųjų) cheminės (-ių) medžiagos (-ų) koncentracijos verčių plazmoje ar kraujyje matavimas. Jei cheminė medžiaga leidžiama į veną, įrodyti poveikio nebūtina. Siekiant įrodyti, kad kaulų čiulpai buvo paveikti, taip pat galima naudoti ADME (absorbcijos, pasiskirstymo, metabolizmo, šalinimo) duomenis, gautus atliekant nepriklausomą tyrimą, kuriame būtų naudojamas tas pats davimo būdas ir ta pati rūšis. Neigiami rezultatai rodo, kad tyrimo sąlygomis bandomoji cheminė medžiaga nesukelia chromosomų aberacijų bandytos gyvūnų rūšies kaulų čiulpuose.

Nėra reikalavimo patikrinti aiškų teigiamą ar aiškų neigiamą atsaką.

Tais atvejais, kai atsakas nėra aiškiai neigiamas ar teigiamas, ir siekiant padėti nustatyti rezultato biologinę svarbą (pvz., mažas ar tarpinis padidėjimas), duomenys turėtų būti įvertinti pateikiant ekspertų nuomonę ir (arba) papildomai tiriant esamus atliktus bandymus. Kai kuriais atvejais galėtų būti naudinga analizuoti didesnį ląstelių skaičių arba pakartoti bandymą šiek tiek pakeistomis bandymo sąlygomis.

▼M7

Retais atvejais, netgi atlikus papildomus tyrimus, nepakaks duomenų padaryti išvadą, ar gauti bandomosios cheminės medžiagos rezultatai yra teigiami ar neigiami, todėl bus priimtas sprendimas, kad tyrimas yra dviprasmis.

Poliploidinių ir endoreduplikuotų metafazės ląstelių dažnumas turėtų būti registruojamas atskirai. Poliploidinių ar endoreduplikuotų ląstelių skaičiaus padidėjimas gali rodyti, kad bandomoji cheminė medžiaga gali slopinti mitozinius procesus ar ląstelių ciklo eigą (žr. 3 pastraipą).

Bandymo ataskaita

Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Santrauka

Bandomoji cheminė medžiaga:

— kilmė, partijos numeris, galiojimo pabaigos data, jei yra;

— bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, jei žinomas.

Vienkomponentė cheminė medžiaga:

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;

— cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka ir praktiškai įmanoma, kt.

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

— kiek įmanoma išsamesnis sudedamųjų dalių cheminis pavadinimas (žr. pirmiau), kiekybinis paplitimas ir būdingos fizikinės ir cheminės savybės.

Bandomosios cheminės medžiagos ruošimas

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas;

— bandomosios cheminės medžiagos tirpumas ir stabilumas tirpiklyje ar nešiklyje, jei yra žinomas;

— preparatų su pašarais, geriamuoju vandeniu arba inhaliacinių preparatų ruošimas;

— preparatų analizinis nustatymas (pvz., stabilumo, vienalytiškumo, nominalių koncentracijos verčių), kai atliekamas.

Bandymo gyvūnai:

— rūšis ir (arba) veislė ir jų pasirinkimo pagrindimas;

— gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,

— kilmė, laikymo sąlygos, pašaras ir kt.,

— gyvūnų unikalaus identifikavimo būdas;

— kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje ir pabaigoje, atliekant trumpalaikius tyrimus; kiekvieno gyvūno masė bandymo eigoje ir pašaro suvartojimas, atliekant ilgesnius nei savaitės trukmės bandymus. Reikėtų įtraukti kiekvienos grupės kūno masės intervalą, vidurkį ir standartinį nuokrypį.

▼M7

Bandymo sąlygos:

— teigiami ir neigiami (nešiklio ir (arba) tirpiklio) kontroliniai ėminiai,

— intervalo nustatymo tyrimo, jei atliekamas, duomenys;

— dozės dydžio pasirinkimo pagrindimas;

— išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos paruošimą;

— išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos davimo būdą,

— davimo būdo ir trukmės pagrindimas;

— tikrinimo, ar bandomoji (-osios) cheminė (-ės) medžiaga (-os) pateko į kraujotakos sistemą ar kaulų čiulpus, metodai;

— faktinė dozė (mg/kg kūno masės per parą), apskaičiuota pagal bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją pašaruose ir (arba) geriamajame vandenyje (ppm) ir suvartojimą, jei tinka;

— išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę.

— numarinimo metodas;

— nuskausminimo metodas (jei taikomas);

— išsamus apdorojimo ir ėminių ėmimo tvarkaraščių aprašymas, pasirinkimo pagrindimas;

— objektinių stiklelių paruošimo metodai;

— toksiškumo matavimo metodai,

— metafazės tarpsnyje stabdančios cheminės medžiagos pavadinimas, jos koncentracija, dozė ir davimo laikas prieš ėminių ėmimą;

— ėminių izoliavimo ir konservavimo procedūros;

— aberacijų įvertinimo kriterijai,

— analizuotų metafazės ląstelių skaičius vienam gyvūnui ir mitoziniam indeksui nustatyti analizuotų ląstelių skaičius;

— tyrimo priimtinumo kriterijai;

— kriterijai, pagal kuriuos tyrimas laikomas teigiamu, neigiamu ar nedavusiu rezultato.

Rezultatai:

— gyvūnų būklė prieš bandymą ir visą bandymo laikotarpį, įskaitant toksiškumo požymius;

— mitozinis indeksas, nurodytas atskirai kiekvienam gyvūnui;

— aberacijų tipas bei skaičius ir ląstelių su aberacijomis skaičius, pateiktas atskirai kiekvienam gyvūnui;

— kiekvienos grupės suminis aberacijų skaičius, vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai;

— kiekvienos grupės ląstelių su aberacijomis skaičius, vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai;

— ploidiškumo pokyčiai, jei matomi, įskaitant poliploidinių ląstelių ir (arba) endoreduplikuotų ląstelių dažnumus;

▼M7

— dozės ir atsako priklausomybė, jei įmanoma nustatyti;

— statistinės analizės duomenys ir taikytas metodas.

— kaulų čiulpų poveikio patvirtinimo duomenys;

— vienalaikio neigiamo kontrolinio ėminio ir teigiamo kontrolinio ėminio duomenys, nurodant intervalus, vidurkius ir standartinius nuokrypius;

— istorinių neigiamų ir teigiamų kontrolinių ėminių duomenys, intervalai, vidurkiai, standartiniai nuokrypiai ir skirstinio 95 % kontrolinės ribos, taip pat apimamas laikotarpis ir stebėjimų skaičius;

— atitikti teigiamo ar neigiamo atsako kriterijai.

Rezultatų aptarimas.

Išvada.

Nuorodos.

LITERATŪRA

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Adler, I.D. (1984), „Cytogenetic Tests in Mammals“, in Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275-306.

(3) Preston, R.J. *et al*. (1987), Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, Vol. 189/2, pp. 157-165.

(4) Richold, M. *et al*. (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays“, in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

(5) Tice, R.R. *et al*. (1994), Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Vol. 312/3, pp. 305-312.

(6) Adler, I.D. *et al*. (1998), Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 417/1, pp. 19-30.

(7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(8) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(9) Hayashi, M. *et al*. (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.

(10) Fielder, R.J. *et al*. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.

▼**M7**

(11) OECD (2000), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N°19, OECD Publishing, Paris.

(12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, Vol. 1044, pp. 147-163.

(13) Lovell, D.P. *et al*. (1989), „Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays“, in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

▼M7

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Aneuploidija – vienos arba daugiau kaip vienos chromosomų, bet ne viso (-ų) jų rinkinio (-ų) (*žr.* poliploidija) nukrypimas nuo normalaus diploidinio (arba haploidinio) chromosomų skaičiaus.

Centromera – chromosomos regionas, su kuriuo ląstelės dalijimosi metu asocijuojasi verpstės siūlai ir dėl to dukterinės chromosomos tvarkingai išsidėsto dukterinių ląstelių poliuose.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Chromatidinė aberacija – struktūrinis chromosomos pažeidimas, pasireiškiantis kaip vienos iš chromatidžių trūkis arba kaip chromatidžių trūkis ir susijungimas.

Chromosominė aberacija – struktūrinis chromosomos pažeidimas, pasireiškiantis kaip abiejų chromatidžių trūkis arba kaip trūkis ir susijungimas toje pačioje vietoje.

Endoreduplikacija – procesas, kurio metu pasibaigus DNR replikacijos S periodui, branduolys nepradeda dalytis mitozės būdu, bet prasideda naujas S periodas. Taip atsiranda chromosomos, turinčios 4, 8, 16 ... chromatidžių.

Plyšys – achromatinė, mažesnė nei vienos chromatidės plotis, spraga, kurioje yra mažiausias skaičius klaidingai suporuotų bazių.

Mitozinis indeksas – santykis tarp metafazėje esančių ląstelių skaičiaus ir visų populiacijos ląstelių skaičiaus, kuris yra tos ląstelių populiacijos proliferacijos būsenos matas.

Chromosomų skaičiaus aberacija – naudojamų gyvūnų chromosomų skaičiaus pokytis palyginti su normaliu jų skaičiumi (aneuploidija).

Poliploidija – chromosomų skaičiaus aberacija ląstelėse arba organizmuose, apimanti viso chromosomų rinkinio skaičiaus pokytį, bet ne chromosomų rinkinio dalies skaičiaus pokytį (*žr.* aneuploidija).

Struktūrinė chromosomų aberacija – chromosomos struktūros pokytis, kurį galima nustatyti dalijimosi ciklo metafazės ląsteles tiriant mikroskopu; jis pasireiškia kaip delecijos ir fragmentai, pokyčiai grandinių viduje ar tarp grandinių.

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

▼M7

2 priedėlis

FAKTORINĖS ANALIZĖS SCHEMA LYČIŲ SKIRTUMAMS NUSTATYTI ATLIEKANT CHROMOSOMŲ ABERACIJŲ TYRIMĄ *IN VIVO*

Faktorinės analizės schema ir jos taikymas

Pagal šią schemą kiekvienai koncentracijos vertei bandomi ne mažiau kaip 5 patinai ir 5 patelės. Iš viso pagal schemą naudojama ne mažiau kaip 40 gyvūnų (20 patinų ir 20 patelių ir dar atitinkami teigiami kontroliniai ėminiai).

Schema, kuri yra viena iš paprastesnių faktorinės analizės schemų, atitinka dvifaktorinės dispersinės analizės schemą, kurios pagrindiniai veiksniai yra lytis ir koncentracijos vertė. Duomenis galima analizuoti naudojant daug standartinių statistinės programinės įrangos rinkinių, pvz., SPSS, SAS, STATA, Genstat taip pat naudojant programavimo kalbą R.

Atliekant analizę, duomenų rinkinio kintamumas perdalijamas į kintamumą tarp lyčių, tarp koncentracijos verčių ir į kintamumą, susijusį su sąveika tarp lyčių ir koncentracijos verčių. Kiekvienas iš narių tikrinamas tos pačios lyties kartotinių gyvūnų kintamumo grupių viduje įverčio atžvilgiu, esant vienodai koncentracijai. Išsami informacija apie bazinę metodiką pateikta daugelyje standartinių statistinių vadovėlių (žr. nuorodas) ir su statistiniais rinkiniais pateikiamose pagalbinėse priemonėse.

Analizė tęsiama tikrinant ANOVA lentelės *x* lyties ir koncentracijos sąveikos narį ([1]). Nesant reikšmingo sąveikos nario, lytims ar koncentracijos vertėms gautos jungtinės vertės duoda patikimus statistinius kriterijus tarp koncentracijos verčių, pagrįstus grupės jungtiniu ANOVA kintamumo nariu.

Atliekant analizę toliau, kintamumo tarp koncentracijos verčių įvertis dalijamas į kontrastus, taip gaunamas atsakų pagal koncentracijos vertes tiesinių ir kvadratinių kontrastų kriterijus. Kai yra reikšminga *x* lyties ir koncentracijos sąveika, šį narį taip pat galima padalyti į tiesinius *x* lyties ir kvadratinius x lyties sąveikos kontrastus. Šie nariai pateikia kriterijus, ar abiejų lyčių atsakas į koncentraciją yra lygiagretus, ar abiejų lyčių atsakas yra skirtuminis.

Grupės jungtinio kintamumo įvertis gali būti naudojamas skirtumų tarp vidurkių poriniams kriterijams gauti. Galima lyginti abiejų lyčių vidurkius ir skirtingoms koncentracijos vertėms gautus vidurkius, pvz., palyginimui su neigiamų kontrolinių ėminių vidurkiais. Jei sąveika yra reikšminga, galima lyginti vienos lyties skirtingoms koncentracijos vertėms gautus vidurkius ir vienos koncentracijos lytims gautus vidurkius.

Nuorodos

Yra daug statistikos vadovėlių, kuriuose aptariama faktorinės analizės schemų, nuo paprasčiausios dvifaktorinės analizės iki bandymų planavimo metodikoje naudojamų sudėtingesnių formų, teorija, projektavimas, metodika, analizė ir aiškinimas. Toliau pateikiamas sąrašas nėra išsamus. Kai kuriose knygose pateikiami palyginamųjų schemų pavyzdžiai su skaičiavimais, kartais su kompiuterine programa analizei atlikti naudojant įvairius programinės įrangos rinkinius.

([1]) Statistikai, kurie taiko modeliavimo metodą, pvz., apibendrintuosius tiesinius modelius (GLM), gali atlikti analizę skirtingu, bet palyginamuoju būdu ir nebūtinai sudaryti tradicinę ANOVA lentelę, bet modeliai grąžina atgal prie algoritminių statistinių duomenų skaičiavimo metodų, sukurtų tada, kai nebuvo kompiuterių.

▼M7

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

B.12. ŽINDUOLIŲ ERITROCITŲ MIKROBRANDUOLIŲ BANDYMAS

ĮVADAS

Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) 474 (2014). Jis yra genetinės toksikologijos metodų serijos dalis. Yra parengtas EBPO dokumentas, kuriame glaustai pateikiama informacijos apie genetinės toksikologijos bandymus ir naujausių šių gairių pakeitimų apžvalga (1).

Žinduolių mikrobranduolių bandymas *in vivo* ypač tinka genotoksiškumui vertinti, nes, nors skirtingų gyvūnų rūšių mikrobranduoliai gali skirtis, metabolizmo *in vivo* veiksniai, farmakokinetika ir DNR atkūrimo procesai yra aktyvūs ir prisideda prie atsakų. Tyrimas *in vivo* taip pat yra naudingas toliau tiriant genotoksiškumą, aptiktą *in vitro* sistema.

Žinduolių mikrobranduolių bandymas *in vivo* yra naudojamas aptikti pažaidoms, kurias bandomoji cheminė medžiaga sukelia chromosomoms ar eritroblastų mitoziniam aparatui. Atliekant bandymą įvertinamas mikrobranduolių susidarymas eritrocituose, imant gyvūnų, paprastai graužikų, kaulų čiulpų arba periferinio kraujo ląstelių ėminius.

Mikrobranduolių bandymo tikslas – identifikuoti chemines medžiagas, sukeliančias citogenetinius pažeidimus, dėl kurių susiformuoja mažieji branduoliai, turintys atsilikusių chromosomų fragmentų ar ištisas chromosomas.

Kai kaulų čiulpų eritroblastas virsta nesubrendusiu eritrocitu (kartais vadinamu polichrominiu eritrocitu ar retikulocitu), pagrindinis branduolys yra išstumiamas; susiformavęs mikrobranduolys gali likti citoplazmoje. Matyti ar aptikti mikrobranduolius šiose ląstelėse nėra sunku, nes jos neturi pagrindinio branduolio. Nesubrendusių eritrocitų su mikrobranduoliais dažnumo padidėjimas apdorotuose gyvūnuose rodo sukeltas struktūrines arba kiekybines chromosomų aberacijas.

Naujai susidarę eritrocitai su mikrobranduoliais nustatomi ir kiekybiškai įvertinami juos dažant ir vizualiai skaičiuojant pro mikroskopą arba atliekant automatizuotą analizę. Nepakankamai subrendusių eritrocitų suaugusių gyvūnų periferiniame kraujyje ar kaulų čiulpuose suskaičiavimą labai palengvina automatizuota kompiuterinė skaičiavimo sistema. Tokios sistemos yra priimtinos vertinimo rankiniu būdu alternatyvos (2). Palyginamieji tyrimai parodė, kad, naudojant atitinkamus kalibravimo etalonus, tokiais metodais galima gauti geresnį laboratorinį ir tarplaboratorinį atkuriamumą ir jautrį, palyginti su skaičiavimu rankiniu būdu (3) (4). Automatizuotos sistemos, kurios gali matuoti eritrocitų su mikrobranduoliais dažnumą, yra tėkmės citometrai (5), vaizdo analizės sistemos (6) (7) ir lazeriniai skenuojantys citometrai (8), tačiau gali būti ir kitų sistemų.

Nors paprastai tai neatliekama kaip bandymo dalis, chromosomų fragmentus galima atskirti nuo ištisų chromosomų pagal kelis kriterijus. Tai yra kinetochorų ar centromerinių DNR buvimo ar nebuvimo nustatymas, nes abu dalykai yra nepažeistų chromosomų charakteristika. Kai kinetochorų ar centromerinių DNR nėra, tai rodo, kad mikrobranduoliai turi tik chromosomų fragmentus, o kai jų yra – chromosomų praradimą.

Taikomų terminų apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

▼M7

PRADINIAI ASPEKTAI

Jaunų suaugusių graužikų kaulų čiulpai yra šio bandymo genetinių pažeidimų tikslinis audinys, nes eritrocitai gaminami šiame audinyje. Galima vertinti kitų rūšių žinduolių mikrobranduolius periferinio kraujo nesubrendusiuose eritrocituose, jei įrodyta (mikrobranduolių indukcijos nesubrendusiuose eritrocituose būdu), kad jie pakankamai jautrūs, kad būtų galima išsiaiškinti, ar cheminės medžiagos sukelia struktūrines chromosomų ar jų skaičiaus aberacijas tose ląstelėse, ir jei pateiktas mokslinis pagrindimas. Nesubrendusių eritrocitų su mikrobranduoliais dažnumas yra pagrindinė vertinamoji baigtis. Rūšims be stiprios ląstelių su mikrobranduoliais atrankos blužnyje ir gyvūnus nuolat apdorojant laikotarpiu, kurio trukmė yra didesnė nei naudojamos gyvūnų rūšies eritrocitų gyvavimo trukmė (pvz., pelių – 4 savaitės arba ilgiau) kaip vertinamoji baigtis taip pat gali būti naudojamas periferinio kraujo subrendusių eritrocitų, turinčių mažuosius branduolius, dažnumas.

Jei yra duomenų, kad bandomoji (-osios) cheminė (-ės) medžiaga (-os) ar jos arba jų metabolitas (-ai) nepasieks tikslinio audinio, šis metodas gali būti netinkamas.

Prieš taikant bandymų metodą mišiniui, kad būtų gauti duomenys numatomo reglamentavimo tikslu, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį.

BANDYMŲ METODO PRINCIPAS

Gyvūnai veikiami bandomąja chemine medžiaga reikiamu būdu. Jei naudojami kaulų čiulpai, gyvūnai humaniškai numarinami reikiamu (-ais) momentu (-ais) po apdorojimo, kaulų čiulpai išimami ir ruošiami bei dažomi jų preparatai (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Kai naudojamas periferinis kraujas, jis imamas reikiamu (-ais) momentu (-ais) po apdorojimo ir ruošiami bei dažomi jo preparatai (12) (16) (17) (18). Jei apdorojama ūmiu būdu, svarbu pasirinkti tokį kaulų čiulpų ar kraujo surinkimo laiką, kuriuo būtų galima aptikti su apdorojimu susijusią nesubrendusių eritrocitų su mikrobranduoliais indukciją. Imant periferinio kraujo ėminius taip pat turi praeiti pakankamai laiko, kad šie reiškiniai pasireikštų cirkuliuojančiame kraujyje. Preparatai analizuojami mikrobranduolių buvimui nustatyti vizualiai pro mikroskopą, naudojant vaizdo analizę, tėkmės citometriją ar lazerinę skenuojančią citometriją.

LABORATORIJOS KVALIFIKACIJOS TIKRINIMAS

Kvalifikacijos tyrimai

Siekdama įgyti pakankamos tyrimo atlikimo patirties prieš jį taikydama įprastiniams bandymams, laboratorija turėtų įrodyti gebėjimą atkurti paskelbtų duomenų (17) (19) (20) (21) (22) tikėtinus mikrobranduolių dažnumo rezultatus, naudodama ne mažiau kaip dvi teigiamas kontrolines chemines medžiagas (įskaitant mažos dozės teigiamų kontrolinių ėminių sukeltus silpnus atsakus), pvz., išvardytas 1 lentelėje, ir suderinamų tirpiklių ir (arba) nešiklių kontrolinius ėminius (žr. 26 pastraipą). Atliekant šiuos bandymus, reikėtų naudoti dozes, kurioms esant tiriamajame audinyje (kaulų čiulpuose ar periferiniame kraujyje) gaunami atkuriami ir su doze susiję padidėjimai, bei įrodyti bandymo sistemos jautrį ir dinaminį diapazoną, pasitelkiant laboratorijoje taikomą vertinimo metodą. Šis reikalavimas netaikomas patirties turinčioms laboratorijoms, t. y. kurios turi istorinių duomenų bazę, prieinamą kaip apibrėžta 14–18 pastraipose.

Istorinių kontrolinių ėminių duomenys

Atlikdama kvalifikacijos tyrimus, laboratorija turėtų nustatyti:

— istorinių teigiamų kontrolinių ėminių intervalą ir pasiskirstymą,

▼M7

— istorinių neigiamų kontrolinių ėminių intervalą ir pasiskirstymą.

Pirmą kartą gaunant istorinių neigiamų kontrolinių ėminių pasiskirstymo duomenis, vienalaikiai neigiami kontroliniai ėminiai turėtų atitikti paskelbtus kontrolinius duomenis, jei jie yra. Istorinių kontrolinių ėminių pasiskirstymą papildant vis didesniu bandymų duomenų kiekiu, būtų gerai, kad vienalaikiai neigiami kontroliniai ėminiai patektų į to skirstinio 95 % kontrolines ribas. Laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazė turėtų būti statistiškai patikima, kad būtų užtikrinta laboratorijos gebėjimas vertinti savo neigiamų kontrolinių ėminių duomenų pasiskirstymą. Literatūroje daroma prielaida, kad gali prireikti ne mažiau kaip 10 bandymų, bet būtų geriau, jei palyginamosiomis Bandymo sąlygomis atliktų bandymų skaičius būtų ne mažesnis kaip 20. Laboratorijos turėtų taikyti kokybės kontrolės metodus, tokius kaip kontrolinės diagramos (pvz., C tipo ar X juostinės diagramos (23)), kad galėtų nustatyti savo duomenų kintamumą ir įrodyti metodikos „valdomumą“ savo laboratorijoje. Papildomas rekomendacijas, kaip kurti ir naudoti istorinius duomenis (t. y. duomenų įtraukimo ir pašalinimo iš istorinių duomenų kriterijus ir tam tikro bandymo priimtinumo kriterijus) galima rasti literatūroje (24).

Jei atliekant 13 skirsnyje aprašytus kvalifikacijos tyrimus laboratorijai nepakanka bandymų skaičiaus statistiškai patikimam neigiamų kontrolių ėminių skirstiniui gauti (žr. 15 pastraipą), priimtina skirstinį papildyti atliekant pirmuosius įprastinius bandymus. Taikant šį būdą, reikėtų laikytis literatūroje nurodytų rekomendacijų (24), o atliekant šiuos bandymus gauti neigiamų kontrolinių ėminių rezultatai turėtų būti suderinami su paskelbtais neigiamų kontrolinių ėminių duomenimis.

Į visus bandymų protokolo pakeitimus reikėtų žiūrėti atsižvelgiant į jų poveikį gaunamiems duomenims, kurie turi likti suderinami su esamomis laboratorijos istorinių kontrolinių ėminių duomenų bazėmis. Tik esant didesnėms neatitiktims turėtų būti kuriama nauja istorinių kontrolinių ėminių duomenų bazė, jei atsižvelgiant į ekspertų nuomonę nustatoma, kad ji skiriasi nuo ankstesnio skirstinio (žr. 15 pastraipą). Atkūrimo metu atliekamam bandymui gali neprireikti visos neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazės, jei laboratorija gali įrodyti, kad vienalaikių neigiamų kontrolinių ėminių vertės ir toliau yra suderinamos su ankstesne duomenų baze arba su atitinkamais paskelbtais duomenimis.

Neigiamų kontrolinių ėminių duomenis turėtų sudaryti kiekvieno gyvūno nesubrendusių, mažųjų branduolių turinčių eritrocitų dažnumas. Būtų gerai, kad vienalaikiai neigiami kontroliniai ėminiai patektų į laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazės skirstinio 95 % kontrolines ribas. Jei vienalaikių neigiamų kontrolinių ėminių duomenys nepatenka į 95 % kontrolines ribas, jie gali būti tinkami įtraukti į istorinių kontrolinių ėminių skirstinį, jei nėra kraštiniai riktai ir yra įrodymų, kad bandymo sistema „valdoma“ (žr. 15 pastraipą) ir kad nėra techninių ar žmogaus klaidų.

METODO APRAŠYMAS

Parengiamieji darbai

Gyvūnų rūšies parinkimas

Reikėtų tirti dažniausiai naudojamas sveikų jaunų suaugusių gyvūnų laboratorines veisles. Galima naudoti peles, žiurkes ar kitas tinkamas žinduolių rūšis. Kai naudojamas periferinis kraujas, turi būti nustatyta, ar indukuotų mikrobranduolių aptikimas netrikdomas, pasirinktos rūšies gyvūno blužniai iš apytakos šalinant

▼M7

ląsteles su mikrobranduoliais. Tai buvo aiškiai įrodyta pelių ir žiurkių periferiniam kraujui (2). Kitų nei žiurkės ar pelės rūšių naudojimas turėtų būti moksliškai pagrįstas ataskaitoje. Jei naudojamos kitos nei graužikai rūšys, rekomenduojama indukuotų mikrobranduolių matavimą įtraukti į kitą tinkamą toksiškumo bandymą.

Gyvūnų laikymo ir šėrimo sąlygos

Temperatūra graužikų patalpoje turėtų būti 22 °C (± 3 °C). Nors geriausia būtų užtikrinti 50–60 % drėgmę, ji neturėtų būti mažesnė kaip 40 % ir būtų gerai, jei ji nebūtų didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos valymo laiką. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, taikant 12 h šviesos ir 12 h tamsos seką. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijose naudojamas pašaras, neribojant geriamojo vandens kiekio. Pašaro pasirinkimui gali turėti įtakos būtinybė užtikrinti tinkamą bandomosios cheminės medžiagos sumaišymą su pašaru, kai ji duodama tokiu būdu. Jei nesitikima agresyvaus elgesio, graužikus reikėtų laikyti nedidelėmis vienos lyties vienodai apdorotomis grupėmis (ne daugiau kaip po penkis viename narvelyje), pageidautina narveliuose su kietomis grindimis ir esant atitinkamai pagerintai aplinkai. Tik moksliškai pagrįstais atvejais gyvūnus galima laikyti atskirai.

Gyvūnų paruošimas

Paprastai naudojami sveiki jauni suaugę gyvūnai (geriausias graužikų amžius apdorojimo pradžioje yra 6–10 savaičių, nors leidžiama naudoti šiek tiek vyresnius gyvūnus), kurie atsitiktinai paskirstomi į kontrolines ir apdorotas grupes. Atskiri gyvūnai unikaliai paženklinami humaniška minimaliai invaziniu būdu (pvz., žieduojant, kabinant etiketę, naudojant mikrolustą ar biometrinį identifikavimą, bet ne ausų ar pėdų spaustukus) ir aklimatizuojami laboratorinėmis sąlygomis ne trumpiau kaip 5 paras. Narvelius reikėtų įrengti taip, kad jų išdėstymo poveikis būtų minimalus. Reikėtų vengti teigiamo kontrolinio ėminio ir bandomosios cheminės medžiagos kryžminės taršos. Tyrimo pradžioje gyvūnų masės skirtumas turėtų būti kuo mažesnis ir neviršyti ± 20 % kiekvienos lyties gyvūno masės.

Dozių ruošimas

Kietąsias bandomąsias chemines medžiagas, prieš dozuojant gyvūnams, reikėtų ištirpinti atitinkamuose tirpikliuose ar nešikliuose, paruošti jų suspensiją arba įmaišyti į pašarą ar geriamąjį vandenį. Skystąsias bandomąsias chemines medžiagas galima dozuoti tiesiogiai arba prieš tai praskiesti. Jei bandomoji cheminė medžiaga patenka per kvėpavimo takus, ją galima duoti dujų, garų arba kietojo ar skystojo aerozolio pavidalu, atsižvelgiant į jos fizikines ir chemines savybės. Reikėtų naudoti tik iš naujo paruoštus bandomosios cheminės medžiagos preparatus, nebent stabilumo duomenys rodo, kad laikymas priimtinas ir šiuo atveju apibrėžiamos tinkamos laikymo sąlygos.

Bandymo sąlygos

Tirpiklis ir (arba) nešiklis

Neturėtų būti tirpiklio ar nešiklio toksinio poveikio, esant naudojamiems dozių dydžiams, ir negalėtų vykti jų cheminė reakcija su bandomosiomis cheminėmis medžiagomis. Jei naudojami kiti nei gerai žinomi tirpikliai ar nešikliai, juos galima įtraukti, pateikus suderinamumą rodančius nuorodų duomenis. Rekomenduojama visuomet iš pradžių atsižvelgti į galimybę naudoti vandeninį tirpiklį arba nešiklį. Dažniausiai naudojamų suderinamų tirpiklių ar nešiklių pavyzdžiai yra vanduo, fiziologinis tirpalas, metilceliuliozės tirpalas, karboksimetilceliuliozės natrio druskos tirpalas, alyvuogių ir kukurūzų aliejus. Jei nėra istorinių arba paskelbtų kontrolinių duomenų, kurie rodo, kad pasirinktas netipinis tirpiklis ar nešiklis nesukelia mikrobranduolių atsiradimo ir kitokio žalingo poveikio, reikėtų atlikti pradinį tyrimą tirpiklio ar nešiklio kontrolinio ėminio priimtinumui nustatyti.

▼M7

Kontroliniai ėminiai

Teigiami kontroliniai ėminiai

Paprastai į kiekvieną bandymą reikėtų įtraukti grupę gyvūnų, apdorotų teigiama kontroline chemine medžiaga. To galima atsisakyti, jei bandymų laboratorija įrodė turinti kvalifikaciją atlikti bandymą ir nustatė istorinių teigiamų kontrolinių ėminių intervalą. Jei vienalaikių teigiamų kontrolinių ėminių grupė neįtraukiama, į kiekvieną bandymą reikėtų įtraukti vertinimo kontrolinius ėminius (fiksuotus ir nedažytus objektinius stiklelius arba ląstelių suspensijos ėminius, atsižvelgiant į vertinimo metodą). Juos galima gauti į tyrimo vertinimą įtraukiant atitinkamus etaloninius ėminius, kurie būtų gauti periodiškai (pvz., kas 6–18 mėnesių) atliekant atskirą teigiamo kontrolinio ėminio bandymą, pvz., kvalifikacijos tyrimo metu ir reguliariai vėliau, jei būtina, ir tuos ėminius laikyti.

Teigiamos kontrolinės cheminės medžiagos turėtų patikimai sukelti aiškų mikrobranduolių dažnumo padidėjimą palyginti su savaiminiu lygiu. Kai skaičiuojama rankiniu būdu žiūrint pro mikroskopą, reikėtų pasirinkti tokias teigiamų kontrolinių ėminių dozes, kad poveikis būtų ryškus, bet skaičiuotojui ne iškarto atsiskleistų užkoduotų ėminių tapatybė. Teigiamą kontrolinę cheminę medžiagą galima duoti kitu nei bandomoji cheminė medžiaga būdu, taikant skirtingą apdorojimo planą ir ėminius imant tik vienu laiko momentu. Be to, jei tinka, galima atsižvelgti į tos pačios cheminės klasės teigiamų kontrolinių cheminių medžiagų naudojimą. Teigiamų kontrolinių cheminių medžiagų pavyzdžiai pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė.

Teigiamų kontrolinių cheminių medžiagų pavyzdžiai

Cheminės medžiagos ir CAS Nr.
Etilmetansulfonatas [CAS Nr. 62-50-0]
Metilmetansulfonatas [CAS Nr. 66-27-3]
Etilnitrozokarbamidas [CAS Nr. 759-73-9]
Mitomicinas C [CAS Nr. 50-07-7]
Ciklofosfamidas (monohidratas) [CAS Nr. 50-18-0 (CAS Nr. 6055-19-2)]
Trietilenmelaminas [CAS Nr. 51-18-3]
Kolchicinas [CAS Nr. 64-86-8] ar vinblastinas [CAS Nr. 865-21-4] – kaip aneugenai

Neigiami kontroliniai ėminiai

Neigiamos kontrolinės grupės gyvūnus reikėtų įtraukti kiekvieną kartą imant ėminį ir su jais elgtis kaip su apdorota grupe, išskyrus tai, kad gyvūnai nepaveikiami bandomąja chemine medžiaga. Jei bandomajai cheminei medžiagai duoti naudojamas tirpiklis ar nešiklis, kontrolinė grupė turėtų gauti šio tirpiklio ar nešiklio. Tačiau jei kiekvienam ėminių ėmimo laikui bandymų laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenys rodo pastovų kintamumą tarp gyvūnų ir ląstelių su mikrobranduoliais dažnumą, gali pakakti paimti tik vieną neigiamą kontrolinį ėminį. Jei imamas tik vienas neigiamas kontrolinis ėminys, jis turėtų būti imamas pirmą kartą imant atliekamo tyrimo ėminį.

▼M7

Jei naudojamas periferinis kraujas, vietoj vienalaikio neigiamo kontrolinio ėminio atliekant trumpalaikius tyrimus galima naudoti parengtinio apdorojimo ėminį, kai gauti duomenys yra suderinami su bandymų laboratorijos istorinių kontrolinių ėminių duomenų baze. Naudojant žiurkes buvo įrodyta, kad mažo tūrio parengtinio ėminio ėmimas (pvz., mažesnio kaip 100 µl/parai) turi minimalų poveikį mikrobranduolių foniniam dažnumui (25).

PROCEDŪRA

Gyvūnų skaičius ir lytis

Apskritai, vyriškos ir moteriškos lyties gyvūnų mikrobranduolių atsakas yra panašus, todėl daugumą tyrimų būtų galima atlikti su bet kurios lyties gyvūnais (26). Jei duomenys rodytų esminius skirtumus tarp patinų ir patelių (pvz., sisteminio toksiškumo, metabolizmo, biologinio įsisavinamumo, toksiškumo kaulų čiulpams ir kt. skirtumus, įskaitant, pvz., intervalo nustatymo tyrimą), tai paskatintų naudoti abiejų lyčių gyvūnus. Šiuo atveju galbūt reikėtų atlikti tyrimą su abiejų lyčių gyvūnais, pvz., kaip kartotinės dozės toksiškumo tyrimo dalį. Jei naudojamos abi lytys, galbūt tiktų taikyti faktorinės analizės schemą. Išsami informacija, kaip analizuoti duomenis taikant šią schemą, pateikta 2 priedėlyje.

Reikėtų nustatyti grupių dydį tyrimo pradžioje, turint tikslą vienai grupei gauti ne mažiau kaip 5 analizei tinkamus vienos lyties gyvūnus arba kiekvienos lyties gyvūnus, jei naudojami abiejų lyčių gyvūnai. Jei cheminių medžiagų poveikis žmonėms gali priklausyti nuo lyties, pvz., kai kurių vaistų atveju, bandymas turėtų būti atliekamas su atitinkamos lyties gyvūnais. Atliekant kaulų čiulpų tyrimą pagal 37 pastraipoje nustatytus parametrus, kai yra trys dozių grupės ir vienalaikio neigiamo ir teigiamo kontrolinių ėminių grupės (kiekvieną grupę sudaro penki vienos lyties gyvūnai), rekomenduojamas tipinis maksimalus gyvūnų poreikis būtų nuo 25 iki 35 gyvūnų.

Dozės dydžiai

Jei atliekamas parengiamasis intervalo nustatymo tyrimas, nes nėra tinkamų duomenų, kurie padėtų pasirinkti dozę, jį reikėtų atlikti toje pačioje laboratorijoje, naudojant pagrindiniam tyrimui naudoti numatytą rūšį, veislę, lytį ir apdorojimo schemą (27). Tyrimo tikslas – nustatyti didžiausią toleruojamą dozę (MTD), apibrėžiamą kaip didžiausia dozė, kuri būtų toleruojama nesant tyrimą ribojančio toksiškumo požymių, susijusių su tyrimo laikotarpio trukme (pvz., sukeliant kūno masės sumažėjimą arba hematopoetinės sistemos citotoksiškumą, bet ne žūtį ar skausmo, kančių ar išsekimo požymius, dėl kurių reikėtų humaniškai numarinti (28)).

Didžiausią dozę taip pat būtų galima apibrėžti kaip dozę, kuri sukeltų toksiškumą kaulų čiulpams (pvz., kaulų čiulpų arba periferinio kraujo nesubrendusių eritrocitų dalies sumažėjimas suminio eritrocitų skaičiaus atžvilgiu daugiau kaip 50 %, bet iki ne mažiau kaip 20 % kontrolinės vertės). Tačiau analizuojant periferinės kraujotakos CD71 teigiamas ląsteles (t. y. tėkmės citometrijos metodu), ši labai jauna nesubrendusių eritrocitų frakcija gali reaguoti į toksinius veiksnius labiau nei didesnė RNR teigiama nesubrendusių eritrocitų grupė. Todėl didesnis akivaizdus toksiškumas gali būti matomas naudojant ūmaus paveikimo schemas, kai tiriama CD71 teigiamų nesubrendusių eritrocitų frakcija, palyginti su schemomis, pagal kurias nustatomi nesubrendę eritrocitai pagal RNR kiekį. Todėl, kai bandant apdorojama penkias paras arba mažiau, didžiausia toksiškumą sukeliančių cheminių medžiagų dozė gali būti apibrėžta kaip dozė, kuri sukelia statistiškai reikšmingą CD71 teigiamų nesubrendusių eritrocitų sumažėjimą suminio eritrocitų skaičiaus atžvilgiu, bet ne mažesnį kaip 5 % kontrolinės vertės (29).

▼M7

Cheminės medžiagos, kurios rodo toksikokinetinių savybių prisotinimą arba po ilgalaikio davimo sukelia detoksifikavimo procesus, galinčius mažinti veikimą, gali būti dozės nustatymo kriterijų išimtys ir turėtų būti įvertinamos kiekvienu atveju atskirai.

Siekiant gauti informacijos apie dozės ir atsako priklausomybę, į išsamų tyrimą reikėtų įtraukti neigiamo kontrolinio ėminio grupę ir ne mažiau kaip tris dozes, kurių dydžio skirtumo faktorius būtų 2, bet ne didesnis kaip 4. Jei cheminė medžiaga nėra toksiška atliekant intervalo nustatymo tyrimą arba atsižvelgiant į turimus duomenis, 14 parų ar ilgesnio laikotarpio didžiausia davimo dozė turėtų būti 1 000 mg/kg kūno masės per parą arba 2 000 mg/kg kūno masės per parą, jei laikotarpis trumpesnis kaip 14 parų. Tačiau, jei bandomoji cheminė medžiaga yra toksiška, didžiausia duodama dozė turėtų būti MTD, o naudojami dozių dydžiai turėtų aprėpti intervalą nuo didžiausios dozės iki mažo toksiškumo arba visiškai jo nesukeliančios dozės. Kai toksiškumas tiksliniam audiniui (kaulų čiulpams) stebimas naudojant visus bandomus dozės dydžius, patartina toliau tirti netoksines dozes. Tyrimams, kurių tikslas būtų išsamiau apibūdinti kiekybinę dozės ir atsako priklausomybės informaciją, gali prireikti papildomų dozių grupių. Tam tikrų tipų bandomųjų cheminių medžiagų (pvz., vaistų žmonėms), kurioms taikomi specifiniai reikalavimai, šios ribos gali skirtis.

Ribinis bandymas

Jei dozės intervalo nustatymo bandymai arba esami susijusių gyvūnų veislių duomenys rodo, kad apdorojimo režimu bent ribinė dozė (aprašyta toliau) nesukelia jokio toksinio poveikio (įskaitant tai, kad nėra kaulų čiulpų proliferacijos slopinimo ar kitų citotoksiškumo tiksliniam audiniui požymių) ir, jei atsižvelgiant į *in vitro* genotoksiškumo tyrimus arba į gimininges struktūros cheminėms medžiagoms gautus duomenis, genotoksiškumo nereikėtų tikėtis, visas bandymas naudojant trijų dydžių dozes gali būti nebūtinas, jei būtų įrodyta, kad bandomoji (-osios) cheminė (-ės) medžiaga (-os) pasiekia tikslinį audinį (kaulų čiulpus). Tokiais atvejais gali pakakti vienos ribinio dydžio dozės. Jei davimo laikotarpis – 14 parų arba ilgesnis, ribinė dozė yra 1 000 mg/kg kūno masės per parą. Jei davimo laikotarpis yra trumpesnis kaip 14 parų, ribinė dozė yra 2 000 mg/kg kūno masės per parą.

Dozių davimas

Rengiant bandymo schemą, reikėtų atsižvelgti į numatomą poveikio žmogui būdą. Todėl galima pasirinkti pagrįstus poveikio būdus, pvz., duoti su pašaru, geriamuoju vandeniu, atlikti vietinę poodinę arba intraveninę injekciją, duoti per burną (per zondą), kvėpavimo takus, intubacinį vamzdelį ar implantuoti. Visais atvejais turėtų būti pasirinktas būdas, kuris užtikrintų reikiamą tikslinio (-ių) audinio (-ių) veikimą. Injekcija į pilvo ertmę paprastai nerekomenduojama, nes tai nėra numatytas poveiko žmogui būdas ir jį reikėtų naudoti, tik, jei būtų specialiai moksliškai pagrįstas. Jei bandomoji cheminė medžiaga įmaišoma į pašarą ar į geriamąjį vandenį, ypač vienkartinio dozavimo atveju, reikėtų imtis priemonių, kad laiko tarpas nuo maisto bei vandens vartojimo iki ėminių ėmimo būtų pakankamas poveikiui aptikti (žr. 37 pastraipą). Skysčio, kurį galima duoti per zondą arba įšvirkšti per vieną kartą, maksimalus tūris priklauso nuo bandymo gyvūno dydžio. Tūris neturėtų būti didesnis kaip 1 ml/100 g kūno masės, išskyrus vandeninius tirpalus, kurių galima duoti ne daugiau kaip po 2 ml/100 g kūno masės. Didesnio nei šis tūrio naudojimą reikėtų pagrįsti. Išskyrus dirginančias ar ėsdinančias bandomąsias chemines medžiagas, kurios, būdamos didesnės koncentracijos, paprastai sukeltų sunkinantį poveikį, bandymo tūrio kintamumas turėtų būti kuo mažesnis reguliuojant koncentraciją, kad būtų užtikrintas visų didžių dozių tūrio pastovumas kūno masės atžvilgiu.

▼M7

Apdorojimo planas

Pageidautina apdoroti 2 kartus arba daugiau, duodant kas 24 h, ypač kai šis bandymas įtraukiamas į kitus toksiškumo tyrimus. Arba galima apdoroti duodant vieną kartą, jei tai būtų moksliškai pagrįsta (pvz., žinoma, kad bandomosios cheminės medžiagos stabdo ląstelių ciklą). Bandomąsias chemines medžiagas galima duoti kaip padalytą dozę (t. y. siekiant palengvinti didelių tūrių davimą, per vieną dieną apdorojama du kartus arba daugiau, tarp apdorojimų esant ne ilgesniam kaip 2–3 h tarpui). Šiomis aplinkybėmis arba tais atvejais, kai bandomoji cheminė medžiaga duodama ją įkvepiant, ėminių ėmimo tvarkaraštį reikėtų sudaryti atsižvelgiant į paskutinės dozės davimo arba veikimo pabaigos laiką.

Bandymą su pelėmis arba žiurkėmis galima atlikti vienu iš trijų būdų:

a. Gyvūnai veikiami bandomąja chemine medžiaga vieną kartą. Kaulų čiulpų ėminiai imami ne mažiau kaip du kartus (iš nepriklausomų gyvūnų grupių), pirmą kartą imant ne anksčiau kaip 24 h po apdorojimo, bet ne vėliau kaip 48 h po apdorojimo, esant atitinkamam (-iems) laiko tarpui (-ams) tarp ėminių, nebent būtų žinoma, kad bandomosios cheminės medžiagos pusėjimo trukmė yra labai didelė. Jei ėminiai imami anksčiau nei praėjus 24 h po apdorojimo, tai reikėtų pagrįsti. Periferinio kraujo ėminiai imami ne mažiau kaip du kartus (iš tos pačios gyvūnų grupės), pirmą kartą imant ne anksčiau kaip 36 h po apdorojimo, bet ne vėliau kaip 72 h po apdorojimo, esant atitinkamam (-iems) laiko tarpui (-ams) po pirmojo ėminio paėmimo. Imant ėminį pirmą kartą visos dozių grupės turėtų būti apdorotos ir ėminiai paimti analizei, tačiau, imant ėminį kitą (-us) kartą (-us), reikia duoti tik didžiausią dozę. Kai kurį nors kartą imant ėminį aptinkamas teigiamas atsakas, papildomų ėminių imti nereikia, nebent reikia gauti kiekybinę dozės ir atsako priklausomybės informaciją. Aprašyti ėminių surinkimo laikai yra mikrobranduolių atsiradimo ir išnykimo šiuose 2 audinių dalyse kinetikos rezultatas.

b. Jei apdorojama du kartus kas parą (pvz., apdorojama du kartus kas 24 h), kaulų čiulpų ėminiai turėtų būti surenkami vieną kartą, nuo galutinio apdorojimo praėjus nuo 18 iki 24 h, periferinio kraujo ėminiai surenkami vieną kartą, nuo galutinio apdorojimo praėjus nuo 36 iki 48 h (30). Aprašyti ėminių surinkimo laikai yra mikrobranduolių atsiradimo ir išnykimo šiuose 2 audinių dalyse kinetikos rezultatas.

c. Jei kas parą apdorojama tris ir daugiau kartų (pvz., apdorojama tris kartus arba daugiau maždaug kas 24 h), kaulų čiulpų ėminiai turėtų būti surenkami nuo paskutinio apdorojimo praėjus ne daugiau kaip 24 h, periferinio kraujo ėminiai turėtų būti surenkami nuo paskutinio apdorojimo praėjus ne daugiau kaip 40 h (31). Ši apdorojimo pasirinktis leidžia suderinti kometų bandymą (pvz., imant ėminius 2–6 h po paskutinio apdorojimo) su mikrobranduolių bandymu ir sujungti mikrobranduolių bandymą su kartotinės dozės toksiškumo tyrimais. Sukaupti duomenys parodė, kad mikrobranduolių indukciją galima stebėti šiuo ilgesniu laikotarpiu, kai dozė duodama 3 ir daugiau kartų (15).

Galima naudoti kitas dozavimo ar ėminių ėmimo schemas, siekiant palengvinti sujungimą su kitais toksiškumo bandymais, jei jos būtų tinkamos ir moksliškai pagrįstos.

Stebėjimai

Reikėtų atlikti bendruosius bandymo gyvūnų klinikinius stebėjimus ir bent kartą per dieną registruoti klinikinius požymius, pageidautina kartą ar kelis kartus kasdien tuo pačiu laiku, atsižvelgiant į didžiausio numatomo poveikio laiką po dozės davimo. Mažiausiai du kartus per dieną, siekiant nustatyti liguistumo ir gaištamumo požymius, dozavimo laikotarpiu visus gyvūnus reikėtų apžiūrėti. Visi gyvūnai turėtų būti sveriami tyrimo pradžioje, bent kartą per savaitę kartotinės dozės tyrimų metu ir numarinant. Jei tyrimai atliekami ne trumpiau kaip

▼M7

vieną savaitę, bent kartą per savaitę reikėtų matuoti pašaro suvartojimą. Jei bandomoji cheminė medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu, suvartoto vandens kiekį reikėtų išmatuoti kaskart, kai vanduo keičiamas, ir bent kartą per savaitę. Gyvūnus, kuriems pasireiškia nemirtini pernelyg didelio toksiškumo požymiai, reikėtų humaniškai numarinti iki bandymo laikotarpio pabaigos (28). Tam tikromis aplinkybėmis būtų galima kontroliuoti gyvūnų kūno temperatūrą, nes apdorojimo sukelta hipertermija ir hipotermija prisidėjo gaunant klaidingus rezultatus (32) (33) (34).

Tikslinio audinio veikimas

Reikiamu laiku vieną ar kelis kartus reikėtų paimti kraujo ėminį bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijai plazmoje nustatyti, siekiant įsitikinti, ar kaulų čiulpai buvo paveikti, jei reikalaujama ir jei nėra kitų poveikio duomenų (žr. 48 pastraipą).

Kaulų čiulpų ar kraujo paruošimas

Kaulų čiulpų ląstelės gaunamos iš gyvūnų šlaunikaulių ar blauzdikaulių iš karto po humaniško numarinimo. Paprastai ląstelės yra išskiriamos, paruošiamos ir dažomos nustatytais būdais. Maži periferinio kraujo tūriai gali būti gauti pagal atitinkamus gyvūnų gerovės reikalavimus, taikant metodą, kuris užtikrintų bandymų gyvūno išgyvenamumą, pvz., imant kraują iš uodeginės venos ar kito tinkamo kraujo indo, atliekant širdies punkciją ar imant ėminį iš didelio kraujo indo gyvūną numarinus. Atsižvelgiant į analizės metodą, kaulų čiulpų ar iš periferinio kraujo gautų eritrocitų ląstelės gali būti nedelsiant supravitaliai dažomos (16) (17) (18), daromi tepinėliai ir tada dažomi mikroskopijai arba fiksuojami ir tinkamai dažomi tėkmės citometrinei analizei atlikti. Naudojant DNR specifinius dažus, pvz., akridino oranžinį (35) ar Hoechst 33258 ir pironiną Y (36), galima pašalinti kai kuriuos artefaktus, susijusius su DNR atžvilgiu nespecifinių dažų naudojimu. Šis privalumas netrukdo naudoti įprastinių dažų (pvz., Giemsa dažus mikroskopinei analizei atlikti). Taip pat galima naudoti papildomas sistemas (pvz., celiuliozė užpildytas kolonėles, skirtas branduolius turinčioms ląstelėms pašalinti (37) (38)), jei būtų įrodyta, kad šios sistemos yra suderinamos su ėminių paruošimu laboratorijoje.

Jei taikomi šie metodai, mikrobranduolių tipui identifikuoti (chromosomų ar chromosomų fragmentų), kad būtų galima nustatyti, ar mikrobranduolių indukcijos mechanizmas susijęs su klastogeniniu ir (arba) aneugeniniu aktyvumu, gali būti naudojami antikinetochoro antikūnai (39), FISH analizė ir pancentromeriniai DNR zondai (40) arba *in situ* ženklinimas pancentromerų specifiniais užpildais kartu su atitinkamu DNR priešpriešiniu dažymu (41). Gali būti taikomi kiti metodai klastogenams ir aneugenams atskirti, jei jie pasirodytų efektyvūs.

Analizė (rankiniu būdu ir automatizuota)

Prieš atliekant bet kurio tipo analizę visi objektiniai stikleliai ar ėminiai, įskaitant teigiamus ir neigiamus kontrolinius ėminius, turėtų būti nepriklausomai užkoduoti ir randomizuoti, kad skaičiuotojas rankiniu būdu nežinotų apdorojimo sąlygų; toks kodavimas nebūtinas, kai naudojamos automatizuotos skaičiavimo sistemos, kurios nepriklauso nuo vizualios apžiūros ir negali būti paveiktos veiklos vykdytojo šališkumo. Nustatomas kiekvieno gyvūno nesubrendusių eritrocitų kiekis kaip visų eritrocitų (subrendusių ir nesubrendusių) skaičiaus dalis, suskaičiuojant ne mažiau kaip 500 kaulų čiulpų eritrocitų ir 2 000 periferinio kraujo eritrocitų (42). Reikėtų suskaičiuoti ne mažiau kaip 4 000 nesubrendusių eritrocitų vienam gyvūnui, kad būtų galima nustatyti nesubrendusių eritrocitų su mikrobranduoliais dažnumą (43). Jei istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazė rodo, kad

▼M7

bandymo laboratorijos vidutinis foninis nesubrendusių eritrocitų su mikrobranduoliais dažnumas yra < 0,1 %, reikėtų atsižvelgti į galimybę skaičiuoti papildomas ląsteles. Analizuojant ėminius, apdorotų gyvūnų nesubrendusių eritrocitų dalis visų eritrocitų atžvilgiu neturėtų būti mažesnė kaip 20 % nešiklio ar tirpiklio kontrolinių ėminių dalies, kai skaičiuojama mikroskopu, ir ne mažesnė kaip maždaug 5 % nešiklio ar tirpiklio kontrolinių ėminių dalies, kai CD71+ nesubrendę eritrocitai skaičiuojami citometriniais metodais (žr. 31 pastraipą) (29). Pvz., jei atliekant kaulų čiulpų tyrimą mikroskopu, kontrolinio ėminio kaulų čiulpų nesubrendusių eritrocitų dalis yra 50 %, viršutinė toksiškumo riba būtų 10 % nesubrendusių eritrocitų.

Kadangi žiurkių blužnis atskiria ir suardo eritrocitus su mikrobranduoliais, siekiant užtikrinti didelį tyrimo jautrį, kai analizuojamas žiurkių periferinis kraujas, atliekant nesubrendusių eritrocitų su mikrobranduoliais analizę pageidautina apsiriboti jauniausia frakcija. Kai taikomi automatizuotos analizės metodai, šiuos labiausiai nesubrendusius eritrocitus galima nustatyti pagal jų didelį RNR kiekį arba jų paviršiuje ekspresuotų transferino receptorių (CD71+) didelį lygį (31). Tačiau tiesioginis daugelio dažymo būdų palyginimas parodė, kad priimtinus rezultatus galima gauti taikant įvairius būdus, įskaitant įprastinį dažymą akridino oranžiniu (3) (4).

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

Kiekvienam gyvūnui gauti rezultatai turėtų būti pateikiami lentelėse. Turėtų būti atskirai įrašytas kiekvieno tirto gyvūno suskaičiuotų nesubrendusių eritrocitų skaičius, nesubrendusių eritrocitų su mikrobranduoliais skaičius bei nesubrendusių ir subrendusių eritrocitų skaičiaus santykis. Kai pelės apdorojamos nuolat 4 savaites ar ilgiau, taip pat reikėtų pateikti subrendusių eritrocitų skaičiaus ir subrendusių eritrocitų su mikrobranduoliais dalies duomenis, jei renkami. Ataskaitoje taip pat reikėtų pateikti toksiškumo gyvūnams ir klinikinių požymių duomenis.

Priimtinumo kriterijai

Apie bandymo priimtinumą sprendžiama pagal šiuos kriterijus:

a. vienalaikis neigiamas kontrolinis ėminys laikomas tinkamu įtraukti į laboratorijos istorinių kontrolinių duomenų bazę (žr. 15-18 pastraipas);

b. vienalaikiai teigiami kontroliniai ėminiai arba skaičiavimo kontroliniai ėminiai turėtų sukelti atsakus, kurie būtų suderinami su rastais istorinių teigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazėje, ir duoti statistiškai reikšmingą padidėjimą palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu (žr. 24–25 pastraipas);

c. atlikta reikiamo dozių ir ląstelių skaičiaus analizė;

d. didžiausios dozės pasirinkimo kriterijai atitinka aprašytus 30–33 pastraipose.

Rezultatų įvertinimas ir aiškinimas

Jei įvykdomi visi priimtinumo kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai teigiama, jei:

a. bent viena iš apdorotų grupių rodo statistiškai reikšmingą nesubrendusių eritrocitų su mikrobranduoliais dažnumo padidėjimą palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu;

b. šis padidėjimas bent vienam ėminio ėmimo laikui yra susijęs su doze, kai įvertinama pagal atitinkamą tendencijos kriterijų, ir

c. kuris nors iš rezultatų yra už istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų skirstinio ribų (pvz., Puasono skirstinio 95 % kontrolinių ribų).

▼M7

Jei tam tikru ėminio ėmimo laiku tiriama tik didžiausia dozė, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai teigiama, jei yra statistiškai reikšmingas padidėjimas palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu, o rezultatai yra už istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų skirstinio ribų (pvz., Puasono skirstinio 95 % kontrolinių ribų). Rekomendacijų dėl tinkamiausių statistinių metodų galima rasti literatūroje (44) (45) (46) (47). Atliekant dozės ir atsako priklausomybės analizę, reikėtų analizuoti ne mažiau kaip tris dozę gavusias grupes. Statistiniai kriterijai turėtų naudoti gyvūną kaip bandymo vienetą. Atliekant mikrobranduolių bandymą gauti teigiami rezultatai rodo, kad bandomoji cheminė medžiaga sukelia mažųjų branduolių atsiradimą dėl bandymo rūšies gyvūnų chromosomų ar eritroblastų mitozinio aparato pažeidimų. Jei bandymas atliekamas centromeroms mikrobranduoliuose aptikti, bandomoji cheminė medžiaga, kuri gamina centromeras turinčius mikrobranduolius (centromeros DNR ar kinetochoras, kurie rodo ištisos chromosomos praradimą), akivaizdžiai yra aneugenas.

Jei įvykdomi visi priimtinumo kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai neigiama, jei visomis ištirtomis bandymo sąlygomis:

a. nei viena apdorota grupė nerodo statistiškai reikšmingo nesubrendusių eritrocitų su mikrobranduoliais dažnumo padidėjimo palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu;

b. nėra su doze susijusio padidėjimo bet kuriuo ėminių ėmimo laiku, kai įvertinama pagal atitinkamą tendencijos kriterijų,

c. visi rezultatai patenka tarp istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų skirstinio ribų (pvz., Puasono skirstinio 95 % kontrolinių ribų) ir

d. kaulų čiulpai paveikti bandomąja (-osioms) chemine (-ėms) medžiaga (-oms).

Rekomendacijų dėl tinkamiausių statistinių metodų galima rasti literatūroje (44) (45) (46) (47). Kaulų čiulpų paveikimo bandomąja chemine medžiaga įrodymu gali būti nesubrendusių ir subrendusių eritrocitų santykio sumažėjimas arba bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos verčių plazmoje ar kraujyje matavimas. Jei cheminė medžiaga leidžiama į veną, poveikio įrodyti nebūtina. Siekiant įrodyti, kad kaulų čiulpai buvo paveikti, taip pat galima naudoti ADME (absorbcijos, pasiskirstymo, metabolizmo, šalinimo) duomenis, gautus atliekant nepriklausomą tyrimą, kuriame būtų naudojamas tas pats davimo būdas ir ta pati rūšis. Neigiami rezultatai rodo, kad bandymo sąlygomis bandomoji cheminė medžiaga nesukelia mažųjų branduolių atsiradimo bandymo rūšies gyvūnų nesubrendusiuose eritrocituose.

Nėra reikalavimo patikrinti aiškų teigiamą ar neigiamą atsaką.

Tais atvejais, kai atsakas nėra aiškiai neigiamas ar teigiamas, ir siekiant padėti nustatyti rezultato biologinę svarbą (pvz., mažas ar fono padidėjimas), duomenys turėtų būti įvertinti pateikiant ekspertų nuomonę ir (arba) atliekant papildomus baigtų bandymų tyrimus. Kai kuriais atvejais galėtų būti naudinga analizuoti didesnį ląstelių skaičių arba pakartoti bandymą, naudojant modifikuotas bandymo sąlygas.

Retais atvejais, netgi atlikus papildomus tyrimus, duomenų nepakaks padaryti išvadą, ar bandomajai cheminei medžiagai gauti rezultatai yra teigiami ar neigiami, todėl bus priimtas sprendimas, kad tyrimas yra dviprasmis.

Bandymo ataskaita

Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Santrauka

Bandomoji cheminė medžiaga:

— kilmė, partijos numeris, galiojimo pabaigos data, jei yra;

▼M7

— bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, jei žinomas.

Vienkomponentė medžiaga:

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;

— cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka ir praktiškai įmanoma, kt.

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

— kiek įmanoma išsamesnis sudedamųjų dalių cheminis pavadinimas (žr. pirmiau), kiekybinis paplitimas ir būdingos fizikinės ir cheminės savybės.

Bandomosios cheminės medžiagos ruošimas

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas;

— bandomosios cheminės medžiagos tirpumas tirpiklyje ar nešiklyje ir stabilumas, jei yra žinomas;

— preparatų su pašarais, geriamuoju vandeniu arba inhaliacinių preparatų ruošimas;

— preparatų analizinis nustatymas (pvz., stabilumo, vienalytiškumo, nominalių koncentracijos verčių), kai atliekamas.

Bandymo gyvūnai:

— rūšis ir (arba) veislė ir jų pasirinkimo pagrindimas;

— gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,

— kilmė, laikymo sąlygos, pašaras ir kt.,

— gyvūnų unikalaus identifikavimo būdas;

— kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje ir pabaigoje, atliekant trumpalaikius tyrimus; kiekvieno gyvūno masė bandymo eigoje ir pašaro suvartojimas, atliekant ilgesnius nei savaitės trukmės bandymus. Reikėtų įtraukti kiekvienos grupės kūno masės intervalą, vidurkį ir standartinį nuokrypį.

Bandymo sąlygos:

— teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių (tirpiklio ir (arba) nešiklio) duomenys;

— intervalo nustatymo tyrimo, jei atliekamas, duomenys;

— dozės dydžio pasirinkimo pagrindimas;

— išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos paruošimą;

— išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos davimo būdą,

— davimo būdo ir trukmės pagrindimas;

— tikrinimo, ar bandomoji (-osios) cheminė (-ės) medžiaga (-os) pateko į kraujotakos sistemą ar tikslinį audinį, metodai;

▼M7

— faktinė dozė (mg/kg kūno masės per parą), apskaičiuota pagal bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją pašaruose ir (arba) geriamajame vandenyje (ppm) ir suvartojimą, jei tinka;

— išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę.

— numarinimo metodas;

— nuskausminimo metodas (jei taikomas);

— išsamus apdorojimo ir ėminių ėmimo tvarkaraščio aprašymas, pasirinkimo pagrindimas;

— objektinių stiklelių paruošimo metodai;

— ėminių izoliavimo ir konservavimo procedūros;

— toksiškumo matavimo metodai,

— nesubrendusių eritrocitų su mikrobranduoliais skaičiavimo kriterijai,

— analizuotų ląstelių skaičius vienam gyvūnui, nustatant nesubrendusių eritrocitų su mikrobranduoliais dažnumą bei nesubrendusių ir subrendusių eritrocitų santykį;

— tyrimo priimtinumo kriterijai;

— metodai, pvz., antikinetochoro antikūnų ar centromerų specifinių DNR zondų naudojimas, kurie apibūdintų, ar mikrobranduolys turi ištisą chromosomą ar jos fragmentą, jei taikomi.

Rezultatai:

— gyvūnų būklė prieš bandymą ir visą bandymo laikotarpį, įskaitant toksiškumo požymius;

— nesubrendusių ir subrendusių eritrocitų skaičiaus santykis,

— kiekvieno gyvūno nesubrendusių eritrocitų su mikrobranduoliais skaičius,

— nesubrendusių eritrocitų su mikrobranduoliais grupės vidurkis ± standartinis nuokrypis;

— dozės ir atsako priklausomybė, jei įmanoma nustatyti;

— statistinės analizės duomenys ir taikyti metodai.

— vienalaikio neigiamo kontrolinio ėminio ir teigiamo kontrolinio ėminio duomenys, nurodant intervalus, vidurkius ir standartinius nuokrypius;

— istorinių neigiamų ir teigiamų kontrolinių ėminių duomenys, intervalai, vidurkiai, standartiniai nuokrypiai ir skirstinio 95 % kontrolinės ribos, taip pat aprėptas laikotarpis ir duomenų taškų skaičius;

— kaulų čiulpų poveikio patvirtinimo duomenys;

— apibūdinimo duomenys, kurie rodo, ar mikrobranduolys turi ištisą chromosomą ar jos fragmentą, jei tinka;

— atitikti teigiamo ar neigiamo atsako kriterijai.

▼**M7**

Rezultatų aptarimas.

Išvada.

Nuorodos.

LITERATŪRA

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Hayashi, M. *et al*. (2007), *in vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 627/1, pp. 10-30.

(3) MacGregor, J.T. *et al*. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, Toxicology Sciences, Vol. 94/1, pp. 92-107.

(4) Dertinger, S.D. *et al*. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, Toxicological Sciences, Vol. 94/1, pp. 83-91.

(5) Dertinger, S.D. *et al*. (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage, Mutagenesis, Vol. 26/1, pp. 139-145.

(6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, Mutation Research, Vol. 370/1, pp. 65-73.

(7) Asano, N. *et al*. (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitally stained peripheral blood cells, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 404/1-2, pp. 149-154.

(8) Styles, J.A. *et al*. (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, Cytometry, Vol. 44/2, pp. 153-155.

(9) Heddle, J.A. (1973), A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 18/2, pp. 187-190.

(10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, Mutation Research, Vol. 31/1, pp. 9-15.

(11) Heddle, J.A. *et al*. (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 123/1, pp. 61-118.

(12) Mavournin, K.H. *et al*. (1990), The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 239/1, pp. 29-80.

(13) MacGregor, J.T. *et al*. (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, Developments in Toxicology Environmental Science, Vol. 11, pp. 555-558.

▼M7

(14) MacGregor, J.T. *et al*. (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 189/2, pp. 103-112.

(15) MacGregor, J.T. *et al*. (1990), The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, Fundamental and Applied Toxicology, Vol. 14/3, pp. 513-522.

(16) Hayashi, M. *et al*. (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, Mutation Research/-Genetic Toxicology, Vol. 245/4, pp. 245-249.

(17) CSGMT/JEMS.MMS – The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 278/2-3, pp. 83-98.

(18) CSGMT/JEMS.MMS – The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), Mutagenesis, Vol. 10/3, pp. 153-159.

(19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 23/4, pp. 239-273.

(20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 453/1, pp. 45-50.

(21) Hayes, J. *et al*. (2009), The rat bone marrow micronucleus test–study design and statistical power, Mutagenesis, Vol. 24/5, pp. 419-424.

(22) Wakata, A. *et al*. (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 32/1, pp. 84-100.

(23) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(24) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(25) Rothfuss, A. *et al*. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 108-120.

(26) Hayashi, M. *et al*. (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.

(27) Fielder, R.J. *et al*. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.

▼M7

(28) OECD (2000), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(29) LeBaron, M.J. *et al*. (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 54/3, pp. 222-228.

(30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/– 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, Vol. 10/4, pp. 313-319.

(31) Hayashi, M. *et al*. (2000), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 35/3, pp. 234-252.

(32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 390/1-2, pp. 79-83.

(33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 413/1, pp. 7-14.

(34) Spencer, P.J. *et al*. (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, Toxicological Sciences, Vol. 97/1, pp. 120-127.

(35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Research Letters, Vol. 120/4, pp. 241-247.

(36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, Mutation Research, Vol. 120/4, pp. 269-275.

(37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 213/1, pp. 91-104.

(38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, Mutation Research, Vol. 439/1, pp. 121-126.

(39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, Mutagenesis, Vol. 5/4, pp. 411-415.

(40) Miller, B.M. *et al*. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, Vol. 6/4, pp. 297-302.

(41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, American Journal of Medical Genetics, Vol. 107/2, pp. 99-104.

(42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, Mutation Research, Vol. 347/2, pp. 97-99.

(43) OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

▼**M7**

(44) Richold, M. *et al*. (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays“, in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

(45) Lovell, D.P. *et al*. (1989), „Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays“, in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

(46) Hayashi, M. *et al*. (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, Environmental Health Perspectives, Vol. 102/Suppl 1, pp. 49-52.

(47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 469/2, pp. 233-241.

▼M7

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Centromera – chromosomos regionas, su kuriuo ląstelės dalijimosi metu asocijuojasi verpstės siūlai ir dėl to dukterinės chromosomos tvarkingai išsidėsto dukterinių ląstelių poliuose.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Eritroblastas – ankstyvoji eritrocitų vystymosi stadija, prieš pat nesubrendusių eritrocitų stadiją, kai ląstelė dar turi branduolį.

Kinetochoras – ant eukariotinių lastelių centromeros susidaranti baltyminė struktūra, kuri mitozės ir mejozės metu sujungia chromosomą su mitozinės verpstės mikrovamzdelių polimerais ir dalijantis ląstelėms veikia kaip dukterinių chromatidžių atstūmimo vieną nuo kitos priemonė.

Mikrobranduoliai – nuo ląstelių pagrindinių branduolių atskirti papildomi maži branduoliai, susidarę mitozės (mejozės) telofazėje, kai chromosomų fragmentai ar ištisos chromosomos lėtai juda link ląstelės polių.

Normochrominis ar subrendęs eritrocitas – visiškai subrendęs eritrocitas, pametęs po enukleacijos likusias RNR ir (arba) kitus trumpalaikius ląstelių žymeklius, kurie jiems būdingu būdu išnyksta po enukleacijos, vykstančios po galutinio eritroblasto dalijimosi.

Polichrominis ar nesubrendęs eritrocitas – naujai susidaręs tarpinėje vystymosi stadijoje esantis eritrocitas, kuris nusidažo klasikinių kraujo dažų, pvz., Wright Giemsa, mėlynuoju ir raudonuoju komponentais dėl liekamųjų RNR buvimo naujai susidariusioje ląstelėje. Tokios naujai susidariusios ląstelės yra maždaug tas pats kaip retikulocitai, kurios vizualizuojamos naudojant vitalinį dažą, sukeliantį liekamųjų ląstelių RNR sulipimą į būdingą tinklą. Šiuo metu dažnai taikomi kiti naujai susidariusių raudonųjų kraujo ląstelių identifikavimo metodai, įskaitant RNR monochrominį dažymą fluorescenciniais dažais arba trumpalaikių paviršinių žymeklių, pvz., CD71, ženklinimą fluorescuojančiais antikūnais. Polichrominiai eritrocitai, retikulocitai ir CD71 teigiami eritrocitai yra nesubrendę eritrocitai, nors kiekvienas iš jų kažkiek skiriasi amžiaus pasiskirstymu.

Retikulocitas – naujai susidaręs eritrocitas, dažytas vitaliniu dažu, kuris sukelia liekamųjų ląstelių RNR sulipimą į būdingą tinklą. Retikulocitų ir polichrominių eritrocitų ląstelių amžiaus pasiskirstymas yra panašus.

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

▼M7

2 priedėlis

FAKTORINĖS ANALIZĖS CHEMA LYČIŲ SKIRTUMAMS NUSTATYTI ATLIEKANT MIKROBRANDUOLIŲ TYRIMĄ *IN VIVO*

Faktorinės analizės schema ir jos taikymas

Pagal šią schemą kiekvienai koncentracijos vertei bandomi ne mažiau kaip 5 patinai ir 5 patelės, iš viso pagal schemą naudojant ne mažiau kaip 40 gyvūnų (20 patinų ir 20 patelių ir dar atitinkami teigiami kontroliniai ėminiai).

Schema, kuri yra viena iš paprastesnių faktorinės analizės schemų, atitinka dvifaktorinės dispersinės analizės schemą, kurios pagrindiniai veiksniai yra lytis ir koncentracijos vertė. Duomenis galima analizuoti naudojant daug standartinių statistinės programinės įrangos rinkinių, pvz., SPSS, SAS, STATA, Genstat taip pat naudojant programavimo kalbą R.

Atliekant analizę, duomenų rinkinio kintamumas perdalijamas į kintamumą tarp lyčių, tarp koncentracijos verčių ir į kintamumą, susijusį su sąveika tarp lyčių ir koncentracijos verčių. Kiekvienas iš narių tikrinamas tos pačios lyties kartotinių gyvūnų kintamumo grupių viduje įverčio atžvilgiu, esant vienodai koncentracijai. Išsami informacija apie bazinę metodiką pateikta daugelyje standartinių statistinių vadovėlių (žr. nuorodas) ir su statistiniai rinkiniais pateikiamose pagalbinėse priemonėse.

Analizė tęsiama tikrinant ANOVA lentelės *x* lyties ir koncentracijos sąveikos narį ([1]). Nesant reikšmingo sąveikos nario, lytims ar koncentracijos vertėms gautos jungtinės vertės duoda patikimus statistinius kriterijus tarp koncentracijos verčių, pagrįstus grupės jungtiniu ANOVA kintamumo nariu.

Atliekant analizę toliau, kintamumo tarp koncentracijos verčių įvertis dalijamas į kontrastus, taip gaunamas atsakų pagal koncentracijos vertes tiesinių ir kvadratinių kontrastų kriterijus. Kai yra reikšminga *x* lyties ir koncentracijos sąveika, šį narį taip pat galima padalyti į tiesinius *x* lyties ir kvadratinius x lyties sąveikos kontrastus. Šie nariai pateikia kriterijus, ar abiejų lyčių atsakas į koncentraciją yra lygiagretus, ar abiejų lyčių atsakas yra skirtuminis.

Grupės jungtinio kintamumo įvertis gali būti naudojamas skirtumų tarp vidurkių poriniams kriterijams gauti. Galima lyginti abiejų lyčių vidurkius ir skirtingoms koncentracijos vertėms gautus vidurkius, pvz., palyginimui su neigiamų kontrolinių ėminių vidurkiais. Jei sąveika yra reikšminga, galima lyginti vienos lyties skirtingoms koncentracijos vertėms gautus vidurkius ir vienos koncentracijos lytims gautus vidurkius.

Nuorodos

Yra daug statistikos vadovėlių, kuriuose aptariama faktorinės analizės schemų teorija, projektavimas, metodika, analizė ir aiškinimas, kurios varijuoja nuo paprasčiausios dvifaktorinės analizės iki „bandymų planavimo“ metodikoje naudojamų sudėtingesnių formų. Toliau pateikiamas sąrašas nėra išsamus. Kai kuriose knygose pateikiami palyginamųjų schemų pavyzdžiai su skaičiavimais, kartais su kompiuterine programa analizei atlikti naudojant įvairius programinės įrangos rinkinius.

([1]) Statistikai, kurie taiko modeliavimo metodą, pvz., apibendrintuosius tiesinius modelius (GLM), gali atlikti analizę skirtingu, bet palyginamuoju būdu ir nebūtinai sudaryti tradicinę ANOVA lentelę, bet modeliai grąžina atgal prie algoritminių statistinių duomenų skaičiavimo metodų, sukurtų tada, kai nebuvo kompiuterių.

▼M7

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼C1

B.13/14. **MUTAGENIŠKUMAS – BAKTERIJŲ GRĮŽTAMŲJŲ MUTACIJŲ BANDYMAS**

1. **METODAS**

Šis metodas atitinka OECD TG 471 – Bakterijų grįžtamųjų mutacijų bandymą (1997).

1.1. ĮVADAS

Bakterijų grįžtamųjų mutacijų bandymui naudojami *Salmonella typhimurium* ir *Escherichia coli* kamienai, kuriems reikalingos aminorūgštys, ir juo siekiama nustatyti taškines mutacijas, kurios atsiranda dėl vienos ar kelių DNR bazių porų pakaitos, intarpų ar delecijos (1)(2)(3). Šio bakterijų grįžtamųjų mutacijų bandymo esmė ta, kad juo nustatomos mutacijos, dėl kurių bandomųjų kamienų mutacijos atsistato į pirmykštę padėtį ir atsikuria bakterijų funkcinis gebėjimas sintetinti būtiną amino rūgštį. Bakterijos-revertantai aptinkamos pagal jų sugebėjimą augti terpėje, kurioje nėra amino rūgšties, reikalingos jų tėviniam bandomajam kamienui.

Daugelio žmonių genetiškai paveldimų ligų priežastis yra taškinės mutacijos bei su jomis susiję įvykiai, ir egzistuoja pakankamai įrodymų, kad dėl somatinėse ląstelėse esančių onkogenų bei navikų supresorinių genų taškinių mutacijų formuojasi žmonių ir eksperimentinių gyvūnų navikai. Bakterijų grįžtamųjų mutacijų bandymas yra nebrangus ir greitai bei pakankamai lengvai atliekamas. Dauguma bandomųjų kamienų pasižymi keletu ypatybių, pagal kurias lengva nustatyti jų mutacijas, įskaitant DNR sekose, esančiose grįžtamųjų mutacijų vyksmo vietose bei sukuriančiose atsaką į signalą, padidintą ląstelių pralaidumą didelės molekulinės masės molekulėms ir DNR pažaidų atstatymo sistemų sunaikinimą arba pažaidoms atsparių DNR atkūrimo procesų suintensyvėjimą. Tiriant kamienų specifiškumą gaunama vertingos informacijos apie genotoksiškų medžiagų sukeltų mutacijų tipus. Yra sukaupta labai didelė grįžtamųjų mutacijų bandymų rezultatų duomenų bazė, kurioje yra duomenų apie įvairiausias struktūras, ir yra sukurta visuotinai pripažintų metodų cheminėms medžiagoms, įskaitant lakiuosius junginius, pasižyminčioms skirtingomis fizikinėmis bei cheminėmis savybėmis, tirti.

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. APIBRĖŽTYS

Grįžtamųjų mutacijų bandymas – bandymas, kuriuo *Salmonella typhimurium* arba *Escherichia coli* kamienuose, kuriems reikalinga aminorūgštis (atitinkamai histidinas ar triptofanas), nustatoma mutacija, dėl kurios atsiranda kamienas, kuriam nereikalinga aminorūgštis, tiekiama egzogeniniu būdu.

Mutagenai, sukeliantys bazių porų pakaitas – medžiagos, sukeliančios DNR bazių porų pakaitas. Atliekant reversijos bandymą, ši pakaita gali vykti pradinės mutacijos ar kitoje bakterijos genomo vietoje.

Mutagenai, sukeliantys skaitymo rėmelio poslinkį – medžiagos, sukeliančios vienos ar kelių DNR bazių porų intarpus ar delecijas, dėl kurių pasislenka RNR molekulėje esantis skaitymo rėmelis.

▼C1

1.3. PRADINIAI SVARSTYMAI

Atliekant bakterijų grįžtamųjų mutacijų bandymą naudojamos prokariotinės ląstelės, kurios skiriasi nuo žinduolių ląstelių pagal tokius veiksnius kaip medžiagų transportas į ląstelę, metabolizmas, chromosomų struktūra bei DNR pažaidų atstatymo procesai. Paprastai atliekant bandymus *in vitro*, reikia naudoti egzogeninį metabolinės aktyvacijos šaltinį. Metabolinės aktyvacijos sistemos *in vitro* negali absoliučiai imituoti žinduolių metabolinės aktyvacijos sąlygų *in vivo*. Taigi atliekant bandymą negaunama tiesioginės informacijos apie cheminių medžiagų mutageniškumą ir kancerogeniškumą žinduoliams.

Bakterijų grįžtamųjų mutacijų bandymas paprastai naudojamas kaip pirminė atranka siekiant nustatyti genotoksinį aktyvumą, o ypač gebėjimą sukelti taškines mutacijas. Gausi duomenų bazė parodė, kad daugelio cheminių medžiagų, su kuriomis atlikus šį bandymą gauti teigiami rezultatai, mutageninės savybės patvirtinamos ir kitais bandymais. Tačiau šiuo bandymu galima nustatyti ne visus mutagenus; priežastys gali būti šio bandymo pagrindinio tikslo specifika, metabolinės aktyvacijos skirtumai ar mutagenų biologinio įsisavinamumo skirtumai. Kita vertus, dėl veiksnių, padidinančių bakterijų grįžtamųjų mutacijų bandymo jautrumą, mutageninis medžiagų aktyvumas gali būti pervertintas.

Bakterijų grįžtamųjų mutacijų bandymas netinka konkrečių cheminių medžiagų klasėms, pavyzdžiui junginiams, pasižymintiems pernelyg dideliu baktericidiniu aktyvumu (konkretūs antibiotikai) ir tiems junginiams, kurie, kaip manoma, blokuoja žinduolių ląstelių DNR replikacijos sistemą (keletas topoizomerazių inhibitorių ir nukleozidų analogų). Tokiais atvejais labiau tinka žinduolių mutacijų bandymai.

Nors cheminiai junginiai, kuriuos tiriant šiuo bandymu gaunamas teigiamas rezultatas, yra kancerogeniški žinduoliams, tačiau šis tarpusavio ryšys nėra absoliutus. Tai priklauso nuo cheminių medžiagų klasės ir atliekant šį bandymą neįmanoma nustatyti tam tikrų kancerogenų, kadangi jų veikimo mechanizmai nepagrįsti genotoksiškumu arba nėra būdingi bakterijų ląstelėms.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bakterijų ląstelių suspensijos veikiamos bandomąja medžiaga naudojant egzogeninę metabolinės aktyvacijos sistemą arba jos nenaudojant. Pagal inkorporacijos į lėkštelę metodą šios suspensijos padengiamos agaru ir užliejamos ant minimalios terpės. Pagal išankstinės inkubacijos metodą suspensija iš pradžių inkubuojama su medžiaga, kuria bus veikiamos bakterinės ląstelės, o vėliau padengiama agaru ir po to užpilama ant minimalios terpės. Panaudojant abu metodus ir praėjus 2–3 inkubacijos dienoms, skaičiuojamos revertantų kolonijos ir lyginamos su spontaninių revertantų kolonijomis, auginamomis kontrolinėse lėkštelėse, tirpiklyje, skaičiumi.

Aprašytos kelios bakterijų grįžtamųjų mutacijų bandymo procedūros. Dažniausiai naudojami inkorporacijos į lėkštelę (1)(2)(3)(4), išankstinės inkubacijos (2)(3)(5)(6)(7)(8), fliuktuacijos (9)(10) ir suspendavimo metodai. Taipogi buvo aprašytos dujinių ir lakiųjų medžiagų bandymo modifikacijos (12).

▼C1

Šiame bandymų metode aprašytos su inkorporacijos į lėkštelę ir išankstinės inkubacijos metodais susijusios procedūros. Abu šie metodai tinka eksperimentams, kurių metu naudojama ir kurių metu nenaudojama metabolinė aktyvacijos sistema, atlikti. Tam tikros medžiagos išankstinės inkubacijos metodu nustatomos veiksmingiau. Tai medžiagos, priklausančios tokioms cheminių medžiagų klasėms kaip alifatiniai aminai, turintys trumpąją grandinę, dvivalenčiai metalai, turintys NO grupę, alkaloidai, turintys pirolizidiną, alilo grupę turintys junginiai bei azoto junginiai (3). Taip pat pripažįstama, kad naudojant tokius standartinius bandymų metodus kaip inkorporacijos į lėkštelę bei išankstinės inkubacijos metodai ne visada galima nustatyti tam tikrų klasių mutagenus. Tokie mutagenai laikytini „ypatingais atvejais“ ir griežtai rekomenduojama juos nustatyti pagal kitas metodikas. Nustatyti tokie „ypatingi atvejai“ (kartu nurodomi galimų jų nustatymo metodų pavyzdžiai): – azodažai ir diazo junginiai (3)(5)(6)(13), dujos bei lakiosios cheminės medžiagos (12)(14)(15)(16) ir glikozidai (17) (18). Nukrypimas nuo standartinės bandymo atlikimo metodikos turi būti moksliškai pagrįstas.

1.5. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.5.1. **Preparatai**

1.5.1.1. *Bakterijos*

Grynos bakterijų kultūros auginamos tol, kol pasiekia vėlyvąją eksponentinę arba ankstyvąją stacionarinę augimo fazę apie 10^9 ląstelių/ml). Kultūros, pasiekusios vėlyvąją stacionarinę augimo fazę, neturi būti naudojamos. Svarbu yra tai, kad bakterijų kultūrose, kurios naudojamos eksperimentams, būtų didelis gyvų bakterijų ląstelių titras. Titras nustatomas arba pagal anksčiau gautas augimo kreives arba kiekvieno bandymo metu nustatant gyvų ląstelių skaičių pagal jų augimą lėkštelėje.

Rekomenduojama inkubacijos temperatūra yra 37 °C

Turi būti naudojami mažiausiai 5 bakterijų kamienai. Jų tarpe turi būti keturi *Salmonella typhimurium* kamienai (TA 1535, TA 1537 arba TA 97a arba TA 97; TA 98 ir TA 100), kurie, kaip buvo įrodyta daugelyje laboratorijų, yra patikimi ir atkuria atsaką. Šių keturių *Salmonella typhimurium* kamienų pirminės reversijos vietoje lokalizuota GC bazių pora ir yra žinoma, kad panaudojant šiuos kamienus, negalima identifikuoti kryžmiškai rišančių mutagenų ir hidrazinų. Šios medžiagos nustatomos, panaudojant *Escherichia coli* WP2 ir *Salmonella typhimurium* TA 102 kamienus (19), kurių pirminėje reversijos vietoje lokalizuota AT bazių pora. Taigi rekomenduojamas toks kamienų derinys:

— *S. typhimurium* TA1535 ir

— *S. typhimurium* TA1537 arba TA97 arba TA97a ir

— *S typhimurium* TA98 ir

— *S. typhimurium* TA100 ir

— *E. coli* WP2 uvrA arba *E. coli* WP2 uvrA (pKM10l) arba *S typhimurium* TA102.

Siekiant nustatyti kryžmiškai surišančius mutagenus patartina papildomai panaudoti *S. typhimurium* TA 102 arba *E. coli* [pvz. *E. coli WP2* arba *E. coli WP2* (pKM101)] kamienus, sugebančius taisyti DNR pažaidas.

▼C1

Reikia naudoti gerai žinomas pagrindinės kultūros paruošimo, žymeklių patvirtinimo bei saugojimo metodikas. Turi būti įrodyta, kad aminorūgštis yra būtina kiekvieno preparato, paruošto iš užšaldytos pradinės kultūros, augimui (histidinas – *S. typhimurium* kamienams, o triptofanas – *E. coli* kamienams). Panašiai turi būti patikrintos kitos fenotipinės charakteristikos: R-faktorių turinčių plazmidžių buvimas arba nebuvimas, jei tai yra reikalinga [t. y. kamienų TA 98, TA 100 ir TA 97a arba TA 97, WP 2 uvrA ir WP 2 uvrA (pKM 101) atsparumas ampicilinui bei kamieno TA 102 atsparumas ampicilinui ir tetraciklinui), taip pat būdingų mutacijų buvimas (*S. typhimurium* rfa mutacija pagal jautrumą violetinei šviesai, *E. coli* uvr A mutacija arba *S. typhimurium* uvr B mutacija pagal jautrumą ultravioletinei šviesai) (2)(3). Kamienai taip pat turi spontaniškai sukurti revertantų kolonijas, kurių dažnis atitiktų ankstesnius laboratorijos duomenis ir literatūroje nurodytas ribas.

1.5.1.2. *Terpė*

Naudojamas atitinkamas minimalus agaras (pavyzdžiui, turintis minimalios Vogel-Bonner terpės E ir gliukozės) ir ant viršaus užliejamas agaras, turintis histidino ir biotino arba triptofano tam, kad vyktų keli ląstelių dalijimaisi (1)(2)(9).

1.5.1.3. *Metabolinė aktyvacija*

Bakterijos turi būti veikiamos bandomąja medžiaga naudojant atitinkamą metabolinės aktyvacijos sistemą ir nenaudojant tokios sistemos. Plačiausiai vartojama sistema yra iš graužikų kepenų, paveiktų tokiomis fermentinį aktyvumą skatinančiomis medžiagomis kaip AROCLOR 1254 (1)(2) ar fenobarbitono ir P-naftoflavono mišiniu (18)(20)(21), post-mitochondrinė frakcija, praturtinta kofaktoriumi. Post-mitochondrinė frakcija paprastai vartojama koncentracijomis, kurių intervalas S9 mišinyje siekia nuo 5 iki 30 % (v/v). Metabolinės aktyvacijos sistema pasirenkama priklausomai nuo bandomosios cheminės medžiagos klasės. Kai kuriais atvejais tikslinga naudoti daugiau nei vieną post-mitochondrinės frakcijos koncentraciją. Tiriant azodažus ir diazo junginius, gali būti tikslingiau naudoti redukcinę metabolinę aktyvacijos sistemą (6)(13).

1.5.1.4. *Bandomoji medžiaga/preparatas*

Kietosios bandomosios medžiagos turi būti ištirpinamos arba suspenduojamos atitinkamuose tirpikliuose ar nešikliuose ir, jei reikia, praskiedžiamos prieš veikiant jomis bakterijas. Skystosios bandomosios medžiagos įnešamos tiesiogiai į bandymo sistemas ir (arba) praskiedžiamos prieš veikiant jomis bakterijas. Kiekvieno bandymo metu turi būti paruošiami švieži preparatai, nebent būtų stabilumo tyrimo duomenų, rodančių, kad bandomąsias medžiagas galima saugoti.

Tirpiklis/nešiklis turi nereaguoti su bandomąja medžiaga ir nekelti pavojaus, kad bakterijos neišgyvens bei būti suderinamas su S9 aktyvumu (22). Jeigu naudojami gerai nežinomi tirpikliai (nešikliai), reikia turėti jų tinkamumą pagrindžiančių duomenų. Jei įmanoma, tai pirmiausia rekomenduojama naudoti vandeninį tirpiklį (nešiklį). Kai bandomos vandenyje nestabilios cheminės medžiagos, naudojamuose organiniuose tirpikliuose neturi būti vandens.

▼C1

1.5.2. **Bandymo sąlygos**

1.5.2.1. *Bandomieji kamienai (žr. 1.5.1.1.)*

1.5.2.2. *Veikimo koncentracija*

Kriterijai, į kuriuos reikia atsižvelgti nustatant didžiausią bandomosios medžiagos koncentraciją, yra medžiagos citotoksiškumas ir tirpumas galutiniame veikimo mišinyje.

Gali būti naudinga toksiškumą bei netirpumą nustatyti parengiamojo eksperimento metu. Citotoksiškumas gali būti nustatomas pagal revertantų kolonijų skaičiaus sumažėjimą, šalutinės terpės praskaidrėjimą ar sunykimą arba pagal kultūrų, paveiktų bandomąja medžiaga, išgyvenimo laipsnį. Medžiagos citotoksiškumas gali kisti dėl metabolinės aktyvacijos sistemų naudojimo. Netirpumas turėtų būti įvertinamas plika akimi stebint precipitato susidarymą eksperimento metu galutiniame reakciniame mišinyje.

Maksimali rekomenduojama bandomų tirpių, citotoksiškumu nepasižyminčių medžiagų koncentracija yra 5 mg/lėkštelėje arba 5 µl/lėkštelėje. Citotoksiškumu nepasižyminčių ir netirpių (koncentracijai esant 5 mg/lėkštelėje arba 5 µl/lėkštelėje) medžiagų atveju reikia ištirti vieną ar daugiau koncentracijų, kurioms esant medžiagos netirpsta galutiniame reakciniame mišinyje. Bandomosios medžiagos, kurios yra citotoksiškos, kai jų koncentracija yra mažesnė nei 5 mg/lėkštelėje arba 5 µl/lėkštelėje, turi būti bandomos tol, kol nustatoma koncentracija, kuriai esant medžiagos pasižymi citotoksiniu aktyvumu. Precipitato susidarymas neturi trukdyti įvertinti duomenis.

Per pirminį eksperimentą reikia išbandyti mažiausiai 5 išanalizuojamas bandomosios medžiagos koncentracijas, kurių vertes skirtų intervalai, lygūs pusei log ($\sqrt{10}$). Mažesni skiriamieji intervalai tinka tada, kai bandoma atsako priklausomybė nuo koncentracijos. Koncentracija, didesnė už 5 mg/lėkštelėje arba 5 µl/lėkštelėje, gali būti pasirenkama tuo atveju, jei bandomosiose medžiagose yra didelis mutageniškų priemaišų kiekis.

1.5.2.3. *Neigiami ir teigiami kontroliniai mėginiai*

Kiekvieno bandymo metu kartu naudojami neigiami (tirpiklis ar nešiklis) bei teigiami bakterijų kamienui būdingi kontroliniai mėginiai taikant metabolinę aktyvaciją ir jos netaikant.

Kai bandymų metu naudojama metabolinės aktyvacijos sistema, tai teigiama kontrolinė etaloninė medžiaga pasirenkama pagal naudojamą bakterinio kamieno tipą.

Toliau pateikiami tinkamų teigiamų kontrolinių medžiagų, naudojamų taikant metabolinę aktyvaciją, pavyzdžiai:

CAS Nr.	Einecs Nr.	Medžiaga
781–43–1	212–308–4	9,10-dimetilantracenas
57–97–6	200–359–5	7,12-dimetilbenzaantracenas
50–32–8	200–028–5	benzpirenas
613–13–8	210–330–9	2-aminoantracenas

▼C1

CAS Nr.	Einecs Nr.	Medžiaga
50–18–0		ciklofosfamidas
6055–19–2	200–015–4	ciklofosfamido monohidratas

Toliau pateikiama tinkama teigiama kontrolinė medžiaga, kai naudojamas redukcinės metabolinės aktyvacijos metodas:

CAS Nr.	Einecs Nr.	Medžiaga
573–58–0	209–358–4	Kongo raudonasis

2-aminoantracenas neturi būti naudojamas kaip vienintelis S9 mišinio efektyvumo indikatorius. Jei 2-aminoantracenas naudojamas, kiekviena S9 mišinio partija išanalizuojama, panaudojant mutageną, kuriam yra reikalinga metabolinė aktyvacija mikrosominių fermentų pagalba, pavyzdžiui, benzpireną ar dimetilbenzaantraceną.

Toliau pateikiami tinkamų teigiamų kontrolinių medžiagų, specifiškų bakterijų kamienui, naudojamų netaikant egzogeninės metabolinės aktyvacijos, pavyzdžiai:

CAS Nr.	Einecs Nr.	Medžiaga	Kamienas
26628–22–8	247–852–1	Natrio azidas	TA 1535 ir TA 100
607–57–8	210–138–5	2-nitrofluorenas	TA 98
90–45–9	201–995–6	9-aminoakridinas	TA 1537, TA 97 ir TA 97a
17070–45–0	241–129–4	ICD 191	TA 1537, TA 97 ir TA 97a
80–15–9	201–254–7	kumeno hidroksiperoksidas	TA 102
50–07–7	200–008–6	mitomicinas C	WP2 uvrA ir TA102
70–25–7	200–730–1	N-etil-N-nitro-N-nitrozoguanidinas	WP2, WP2uvrA ir WP2uvrA(pK M101)
56–57–5	200–281–1	4-nitrokvinolino-1-oksidas	WP2, WP2uvrA ir WP2uvrA(pK M101)
3688–53–7		Furilfuramidas (AF2)	kamienai, turintys plazmidžių

Kitas atitinkamas etalonines medžiagas irgi galima naudoti kaip teigiamus kontrolinius mėginius. Jei įmanoma, apsvarstomas su konkrečios klasės cheminėmis medžiagomis susijusių teigiamų kontrolinių mėginių naudojimas.

Taip pat turi būti neigiami kontroliniai mėginiai, sudaryti vien tik iš tirpiklio ar nešiklio, be bandomosios medžiagos, su kuriais visais kitais atžvilgiais elgiamasi taip pat kaip su bandomaisiais mėginiais. Be to, reikia naudoti nepaveiktus kontrolinius mėginius, nebent yra ankstesnių duomenų, rodančių, kad pasirinktas tirpiklis nėra nei žalingas, nei mutageniškas.

▼C1

1.5.3. **Bandymo eiga**

Atliekant bandymą pagal inkorporacijos į lėkštelę metodą (1)(2)(3)(4), kai netaikoma metabolinė aktyvacija, paprastai 2 ml padengiančiojo agaro sumaišoma su 0,05 ml arba 0,1 ml bandomosios medžiagos tirpalo, 0,1 ml šviežiai išaugintos bakterijų kultūros (turinčios apie 10^8 gyvų ląstelių) ir 0,5 ml sterilaus buferio. Atliekant bandymą kai naudojama metabolinė aktyvacija, paprastai 0,5 ml metabolinės aktyvacijos mišinio, kuriame yra pakankamas postmitochondrinės frakcijos kiekis (intervalo 5–30 % v/v ribose, metabolinės aktyvacijos mišinyje), sumaišoma su 2 ml padengiančiojo agaro, bakterijomis ir bandomąja medžiaga/bandomuoju tirpalu. Kiekvieno mėgintuvėlio turinys suplakamas ir užpilamas ant minimalaus agaro, esančio lėkštelėje, paviršiaus. Prieš inkubaciją padengiančiajam agarui leidžiama sukietėti.

Atliekant bandymą pagal išankstinės inkubacijos metodą (2)(3)(5)(6), bandomoji medžiaga/bandomasis tirpalas iš anksto inkubuojamas su bandomuoju bakteriniu kamienu (turinčiu apie 10^8 gyvų ląstelių) ir steriliu buferiu arba metabolinės aktyvacijos sistema (0,5 ml) ir paprastai inkubuojamas 20 ar daugiau minučių 30–37 °C temperatūroje prieš sumaišant su padengiančiuoju agaru ir užpilant ant minimalaus agaro, esančio lėkštelėje, paviršiaus. Įprastiniu atveju 2 ml padengiančiojo agaro sumaišoma su 0,05 ar 0,1 ml bandomosios medžiagos/bandomojo tirpalo, 0,1 ml bakterijų ir 0,5 ml S9 mišinio ar sterilaus buferio. Atliekant išankstinę inkubaciją, mėgintuvėliai purtomi purtykle, kad jų turinys prisisotintų oro.

Tam, kad tiriant kiekvieną dozę, būtų gaunamas patenkinamas variacijos koeficientas, atliekamas bakterijų išsėjimas į 3 lėkšteles. Jeigu atliekamas išsėjimas tik į 2 lėkšteles, tai jis moksliškai pagrindžiamas. Kartais pasitaikantis lėkštelės praradimas nebūtinai reiškia, kad bandymas nepavyko.

Dujinės bei lakios medžiagos turi būti bandomos atitinkamais metodais, jas laikant sandariuose induose (12)(14)(15)(16).

1.5.4. **Inkubacija**

Per kiekvieną bandymą visos lėkštelės turi būti inkubuojamos 48–72 valandas 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos nustatomas revertantų kolonijų, esančių kiekvienoje lėkštelėje skaičius.

2. **DUOMENYS**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Pateikiant rezultatus, nurodomas revertantų kolonijų, esančių vienoje lėkštelėje, skaičius. Taip pat reikia nurodyti revertantų kolonijų, esančių tiek teigiamose, tiek ir neigiamose (tirpiklio kontrolinis mėginys ir bandomąja medžiaga neveiktas kontrolinis mėginys) kontrolinėse lėkštelėse, skaičių. Pateikiant duomenis apie bandomąją medžiagą ir teigiamus bei neigiamus (tirpiklio kontrolinis mėginys ir (ar) bandomąja medžiaga neveiktas kontrolinis mėginys) kontrolinius mėginius, nurodomas revertantų kolonijų, esančių kiekvienoje lėkštelėje, skaičius, jo vidurkis bei standartinis nukrypimas.

Kai gaunamas aiškus teigiamas rezultatas, jo nereikia patvirtinti. Abejotini rezultatai išaiškinami tęsiant bandymus, geriausia šiek tiek pakeistomis eksperimentinėmis sąlygomis. Neigiami rezultatai patvirtinami kiekvienu atskiru atveju. Tais atvejais, kai manoma, jog nebūtina patvirtinti, kad buvo gauti neigiami rezultatai, šitai turi būti pagrįsta. Atliekant tolimesnius eksperimentus apsvarstoma, ar reikia modifikuoti tiriamus parametrus tam, kad būtų išplėstas įvertinamų sąlygų intervalas. Tiriamieji parametrai, kuriuos galima modifikuoti, yra ribos, skiriančios koncentracijas, bandymo atlikimo metodai (inkorporacijos į lėkštelę bei išankstinės inkubacijos) bei metabolinės aktyvacijos sąlygos.

▼C1

2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Egzistuoja keletas teigiamo rezultato įvertinimo kriterijų, tokių kaip su koncentracija susijęs mažiausiai vieno kamieno revertantų kolonijų, esančių vienoje lėkštelėje, skaičiaus padidėjimas virš tiriamos ribos, kai naudojama arba nenaudojama metabolinės aktyvacijos sistema ir/ar jį atkartojant, kai naudojama viena ar daugiau koncentracijų (23). Pirmiausia reikia aptarti biologinę rezultatų reikšmę. Įvertinant bandymo rezultatus, galima pasinaudoti statistiniais metodais (24). Tačiau statistinė svarba neturėtų tapti vieninteliu faktoriumi, apsprendžiančiu teigiamą atsaką.

Jei tiriant medžiagą gaunami rezultatai, neatitinkantys aukščiau minėtų kriterijų, tai medžiaga laikoma nemutageniška.

Nors daugumos eksperimentų metu gaunami aiškiai teigiami arba neigiami rezultatai, tačiau išimtiniais atvejais, remiantis visais gautais rezultatais, negalima padaryti tinkamos išvados apie bandomos medžiagos aktyvumą. Rezultatai gali likti abejotini ir neaiškūs, nepriklausomai nuo to, kiek kartų eksperimentas buvo pakartotas.

Jei tiriant bakterijų grįžtamąsias mutacijas gautas teigiamas rezultatas, tai reiškia, kad bandomoji medžiaga sukelia taškines mutacijas (bazių pakaitas arba skaitymo rėmelio pasislinkimą) *Salmonella typhimurium* ir (arba) *Escherichia coli* genome. Neigiami rezultatai rodo, kad tokiomis bandymo sąlygoms bandomoji medžiaga nesukelia mutacijų bandomose bakterijų rūšyse.

3. **ATASKAITA**

BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikiama tokia informacija:

Tirpiklis/nešiklis:

— priežastys, dėl kurių buvo pasirinktas šis nešiklis,

— bandomosios cheminės medžiagos, esančios tirpiklyje/nešiklyje, tirpumas ir stabilumas, jei žinomas.

Kamienai:

— panaudoti kamienai,

— ląstelių, esančių vienoje kultūroje, skaičius,

— kamieno charakteristikos.

Bandymo sąlygos:

— bandomosios medžiagos kiekis vienoje lėkštelėje (mg/lėkštelėje arba µl/lėkštelėje), nurodant pagrindinę priežastį dėl kurios tiriant vieną koncentraciją, buvo pasirinkta konkreti dozė bei lėkštelių skaičius,

— panaudota terpė,

— metabolinės aktyvacijos sistemos tipas ir sudėtis, įskaitant ir sistemos tinkamumo kriterijus,

— poveikio bandomąja medžiaga atlikimo metodiką.

Rezultatai:

— toksiškumo požymiai,

— precipitacijos požymiai,

— kolonijų vienoje lėkštelėje skaičius,

▼C1

— revertantų kolonijų vienoje lėkštelėje skaičiaus vidurkis bei standartinis nukrypimas,

— dozės ir atsako tarpusavio ryšys, jei jį įmanoma nurodyti,

— statistinės analizės, jei atliktos,

— kartu naudotų neigiamų (tirpiklis/nešiklis) ir teigiamų kontrolinių mėginių tyrimo duomenys, nurodant intervalus, vidurkius bei standartinius nukrypimus,

— anksčiau gauti neigiamų (tirpiklis/nešiklis) ir teigiamų kontrolinių mėginių tyrimo duomenys, nurodant intervalus, vidurkius bei standartinius nukrypimus.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

4. **NUORODOS**

1) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/-Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, p. 347–364.

2) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, p. 173–215.

3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994). Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. Mutation Res., 312, p. 217–233.

4) Kier, L.D., Brusick D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray V. (1986). The *Salmonella typhimurium/Mammalian* Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency GeneTox Program. Mutation Res., 168, p. 69–240.

5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975). Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, Cancer Letters, I, p. 91–96.

6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980). Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens. Ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York., p. 273–285.

7) Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster, R. (1980). Bacterial Mutation Assays. In: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised. Ed. D.J. Kirkland, Cambridge University Press, p. 13–61.

8) Aeschacher, h.U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. J. Food SAFEty, 8, p. 167–177.

9) Green, M.H.L., Muriel, W.J. and Bridges, B.A. (1976). Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. Mutation Res., 38, p. 33–42.

10) Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D. and J.W. Bridges (1984). The Fluctuation Test in Bacteria. In: Handbook of Mutagenicity Test Procedures. 2nd Edition. Ed. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, p. 141–161.

▼C1

11) Thompson, E.D. and Melampy, P.J. (1981). An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*. Environmental Mutagenesis, 3, p. 453–465.

12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994). Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag. Mutation Res., 307, p. 335–344.

13) Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. and Vaughn, V.L. (1984). Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay. Mutation Res., 136, p. 33–47.

14) Zeiger, E., Anderson, B.E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992). Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals. Environ. Mol. Mutagen., 19, p. 2–141.

15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R.G. (1977). Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water. In Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (Eds.) Elsevier, Amsterdam, p. 249–258.

16) Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.G. and Claxton, L.D. (1987). Vaporization Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay. Environmental Mutagenesis, 9, p. 421–441.

17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (1979). Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*. Cancer Res., 39, p. 3780–3782.

18) Tamura, G., Gold, C, Ferro-Luzzi, A. and Ames, B.N. (1980). Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, p. 4961–4965.

19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.J. and Gatehouse, D.G. (1990). Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains. Mutagenesis, 5, p. 285–291.

20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A SAFE Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems. In: „*In Vitro* metabolic Activation in Mutagenesis Testing“ Eds. F.J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, p. 85–88.

21) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G, Gibson, GG, Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, p. 175–177.

22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B.N. (1981). Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test. Mutation Res., 88, p. 343–350.

23) Claxton, L.D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987). Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity. Mutation Res. 189, p. 83–91.

▼C1

24) Mahon, G.A.T., Green, M.H.L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. and Tweats, D.J. (1989). Analysis of Data from Microbial Colony Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, p. 28–65.

▼M7

_____

_____

▼C1

B.17. MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ LĄSTELIŲ GENŲ MUTACIJŲ BANDYMAS *IN VITRO*

1. METODAS

Šis metodas atitinka OECD TG 476 – Žinduolių ląstelių genų mutacijų bandymą *in vitro* (1997).

1.1. ĮVADAS

Žinduolių ląstelių genų mutacijų bandymas *in vitro* gali būti naudojamas siekiant aptikti cheminių medžiagų sukeltas mutacijas. Tinkamoms ląstelių linijoms priklauso pelių limfomos ląstelių linija L5178Y, kiniškojo žiurkėno ląstelių linijos CHO, CHO-ASS2 bei V79 ir žmogaus limfoblastų linija TK (1). Naudojant šias linijas, dažniausiai įvertinamos timidinkinazę (TK) bei hipoksantinguaninfosforiboziltransferazę (HFRT) koduojančių genų bei ksantinguaninfosforiboziltransferazę (KFRT) koduojančio transgeno mutacijos. Atliekant TK, KFRT bei HFRT koduojančių genų mutacijų bandymus, nustatomi ir skirtingi genetinių įvykių spektrai. Dėl to, kad TK ir KFRT koduojantys genai yra lokalizuoti autosominėse chromosomose, galima nustatyti genetinius įvykius (pavyzdžiui, didelių genų segmentų delecijas), kurie nėra nustatomi HFRT koduojančio geno, esančio X chromosomose, lokuse (2) (3) (4) (5) (6).

Atliekant žinduolių ląstelių genų mutacijų bandymą *in vitro*, galima naudoti gerai žinomas ląstelių linijas ar kamienus. Bandymo metu naudojamos ląstelės atrenkamos pagal sugebėjimą augti kultūroje bei stabilumą spontaniškai vykstančių mutacijų atžvilgiu.

Bendru atveju, kai bandymai atliekami *in vitro*, reikia naudoti egzogeninį metabolinės aktyvacijos šaltinį. Ši metabolinė aktyvacijos sistema negali absoliučiai atitikti žinduolių sąlygų *in vivo*. Reikia stengtis vengti tokių sąlygų, kurioms esant bus gaunami rezultatai, neatspindintys vidinio mutageniškumo. Teigiami rezultatai, neatspindintys vidinio mutageniškumo, gali būti gaunami dėl pH ir osmosinio slėgio pokyčių bei didelio citotoksiškumo laipsnio (7).

Šis bandymas naudojamas atrinkti galimus žinduolių mutagenus bei kancerogenus. Daugelis junginių, kurie šio bandymo metu pasirodo esą teigiami, yra žinduolių kancerogenai, tačiau nėra aiškaus tarpusavio ryšio tarp šio bandymo ir kancerogeniškumo. Tarpusavio ryšys priklauso nuo cheminių medžiagų klasės ir vis daugėja įrodymų, kad šio bandymo metu negalima nustatyti kai kurių kancerogenų, galbūt dėl to, kad jie nepasižymi genotoksiškumu arba bakterinėse ląstelėse veikia visiškai kitaip (6).

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. APIBRĖŽTYS

Tiesioginės mutacijos – geno tėvinio tipo mutantinės formos mutacija, dėl kurios šio geno koduojamas baltymas praranda fermentinį aktyvumą arba šis pakinta.

Bazių porų pakaitas sukeliantys mutagenai – medžiagos, sukeliančios vienos ar kelių bazių porų, esančių DNR molekulėje, pakaitas.

Skaitymo rėmelio poslinkį sukeliantys mutagenai – medžiagos, sukeliančios vienos ar daugelio bazių porų intarpus ar iškritas.

▼C1

Fenotipinės ekspresijos laikas – laiko periodas, per kurį nepakitusio geno produktai pašalinami iš naujai mutavusių ląstelių.

Mutavimo dažnis – mutantinių ir gyvų ląstelių skaičiaus santykis.

Absoliutus santykinis augimas – per konkretų laiko tarpą ląstelių, lyginant su kontroline populiacija, padidėjęs skaičius, įvertinamas kaip suspensijos augimas, lyginant su neigiamos kontrolinės ląstelių grupės kloninio augimo efektyvumu, o pastarasis lyginamas su neigiamu kontroliniu mėginiu.

Santykinis suspensijos augimas – fenotipinės ekspresijos periodu padidėjęs ląstelių, lyginant su neigiamu kontroliniu mėginiu, skaičius.

Gyvybingumas – ląstelių, paveiktų bandomąja medžiaga, kloninio augimo efektyvumas tuo metu, kai, pasibaigus ekspresijai, jos pasėjamos į terpę, esant sąlygoms, naudojamoms atrankai.

Išgyvenimas – ląstelių, paveiktų bandomąja medžiaga, kloninio augimo efektyvumas tuo metu, kai baigiantis veikimui bandomąja medžiaga, jos pasėjamos į terpę; bendru atveju išgyvenimas lyginamas su kontrolinės ląstelių populiacijos išgyvenimu.

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Ląstelės, nesugebančios sintetinti timidinkinazės (TK) dėl mutacijos $TK^{+/-}$ -> $TK^{-/-}$, yra atsparios pirimidino analogo – trifluortimidino (TFT) – sukeliamiems citotoksiniams poveikiams. Ląstelės, sugebančios sintetinti TK, yra jautrios TFT, kuris blokuoja ląstelės metabolizmą bei sustabdo tolimesnį jos dalijimąsi. Taigi mutantinės ląstelės sugeba proliferuoti, esant terpėje TFT, kai tuo tarpu normalios ląstelės, sintetinančios TK, šito padaryti negali. Ląstelės nesugebančios sintetinti HFRT ir KFRT yra panašiai atrenkamos pagal atsparumą 6-tioguaninui (TG) arba 8-azaguaninui (AG). Jeigu žinduolių genų mutacijos yra bandomos, panaudojant medžiagą, kuri yra naudojama ląstelių atrankai ir yra bazių analogas arba cheminis junginys, tai reikia ypač atkreipti dėmesį į bandomosios cheminės medžiagos savybes. Pavyzdžiui, reikia tirti bet kokį įtarimą keliantį bandomosios medžiagos toksiškumą mutantinių ir normalių ląstelių atžvilgiu. Taigi atrankos sistemos arba atrankos medžiagos parinkimas turi būti patvirtinamas tada, kai bandomos cheminės medžiagos, savo struktūra panašios į atrankos medžiagą (8).

Ląstelės, esančios suspensijoje arba vienasluoksnėje kultūroje, veikiamos bandomąja medžiaga, esant arba nesant metabolinės aktyvacijos sistemos ir prieš pradedant bandymą šiek tiek pakultivuojamos tam, kad būtų nustatytas citotoksiškumas bei vyktų fenotipo ekspresija (9) (10) (11) (12) (13). Įprastiniu atveju citotoksiškumas nustatomas pagal santykinį kloninio augimo efektyvumą ar absoliutų santykinį kultūros augimą, matuojamą tada, kai baigiasi ląstelių veikimas bandomąja medžiaga. Kultūros, paveiktos bandomąja medžiaga, palaikomos terpėje tam tikrą laiką, būdingą kiekvienam lokusui bei ląstelių tipui tam, kad vyktų beveik optimali atsiradusių mutacijų fenotipo ekspresija. Mutavimo dažnis nustatomas, pasėjant žinomą ląstelių skaičių į terpę, turinčią atrankai naudojamos medžiagos tam, kad, siekiant įvertinti kloninio augimo efektyvumą, būtų identifikuotos mutantinės ląstelės, esančios terpėje, neturinčioje atrankai naudojamos medžiagos. Pasibaigus inkubacijai, suskaičiuojamos kolonijos. Mutavimo dažnis nustatomas, suskaičiavus kolonijas, kuriose įvyko mutacijos ir kurios buvo auginamos terpėje, turinčioje arba neturinčioje atrankai naudojamos medžiagos.

▼C1

1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.4.1. **Preparatai**

1.4.1.1. *Ląstelės*

Šio bandymo metu galima naudoti įvairius ląstelių tipus, įskaitant L5171Y, CHO, CHO-AS52, V79 klonus arba TK6 ląsteles. Bandymo metu naudojami ląstelių tipai turi būti jautrūs cheminiams mutagenams, jų kloninio augimo efektyvumas turi būti pakankamai didelis bei jose vykstančių spontaninių mutacijų dažnis turi būti pakankamai stabilus. Ląstelės turi būti patikrintos, ar neužkrėstos mikoplazmomis, nes priešingu atveju, atliekant šį bandymą, jos nėra naudojamos.

Bandymas parengiamas taip, kad jis būtų atliekamas, esant kuo didesniam nustatymo jautrumui bei visapusiškumui. Naudojamų ląstelių bei jų kultūrų skaičius ir bandomosios medžiagos koncentracijos turi atspindėti šiuos apibrėžtus parametrus (14). Minimalus, gyvų ląstelių, išlikusių po veikimo bandomąja medžiaga bei naudojamų kiekviename bandymo etape, skaičius turi būti pagrįstas spontaninių mutacijų dažniu. Rekomenduojama panaudoti mažiausiai 10^6 ląstelių. Turi būti sudaryta galimybė susipažinti su anksčiau gautais duomenimis apie ląstelinę sistemą, rodančiais, kad bandymas atliekamas nuosekliai.

1.4.1.2. *Terpė ir kultivavimo sąlygos*

Reikia naudoti atitinkamą terpę, skirtą kultivavimui bei laikytis atitinkamų inkubavimo sąlygų (kultivavimo indai, temperatūra, CO_2 koncentracija ir drėgmė). Terpė turi būti parinkta atsižvelgiant į šio bandymo metu naudojamas atrankos sistemas bei ląstelių tipą. Ypač svarbu tai, kad pasirinktos kultivavimo sąlygos užtikrintų optimalų ląstelių augimą ekspresijos metu bei normalių ir mutantinių ląstelių sugebėjimą suformuoti kolonijas.

1.4.1.3. *Kultūrų paruošimas*

Ląstelės padauginamos iš kamieninių kultūrų, pasėjamos į terpę, skirtą kultivavimui ir inkubuojamos 37 °C temperatūroje. Prieš pradedant šį bandymą, kultūros turi būti išgryninamos, kad būtų atsikratyta jau anksčiau esančių mutantinių ląstelių.

1.4.1.4. *Metabolinė aktyvacija*

Ląstelės inkubuojamos su bandomąja chemine medžiaga, tiek esant, tiek ir nesant atitinkamos metabolinės aktyvacijos sistemos. Plačiausiai vartojama sistema yra post-mitochondrinė frakcija, išskirta iš graužikų kepenų, paveiktų tokiomis fermentinį aktyvumą skatinančiomis medžiagomis kaip AROCLOR 1254 (15) (16) (17) (18) ar fenobarbitono ir β-naftoflavono mišiniu (19) (20) bei praturtinta kofaktoriumi.

Post-mitochondrinė frakcija paprastai vartojama koncentracijomis, kurių intervalas bandymo metu naudojamoje galutinėje terpėje siekia nuo 1–10 % (v/v). Metabolinės aktyvacijos sistema pasirenkama priklausomai nuo bandomosios cheminės medžiagos klasės. Kai kuriais atvejais tikslinga vartoti daugiau nei post-mitochondrinės frakcijos koncentraciją.

▼C1

Endogeninę aktyvaciją gali pagerinti daug tuo tikslu padarytų pasiekimų, įskaitant ir genetinės inžinerijos pagalba gautos ląstelių linijas, kurios gamina specifinius fermentus, dalyvaujančius aktyvacijoje. Bandyme naudojamos ląstelių linijos pasirenkamos moksliškai pagrįstai (pavyzdžiui pagal citochromo P450 izofermento svarbą bandomos cheminės medžiagos metabolizmui).

1.4.1.5. *Bandomosios medžiagos/paruošimas*

Kietosios bandomosios medžiagos turi būti ištirpinamos arba suspenduojamos atitinkamuose tirpikliuose arba nešikliuose ir, jeigu reikia, tai prieš tai, kai šia medžiaga bus paveiktos ląstelės, jos yra praskiedžiamos. Prieš paveikiant ląsteles skystosiomis bandomosiomis medžiagomis arba po veikimo, šios medžiagos gali būti tiesiogiai įnešamos į bandomąsias sistemas ir praskiedžiamos. Bandomosios medžiagos preparatai gaminami prieš kiekvieną bandymą, neatsižvelgiant į tai, kad šių medžiagų stabilumo bandymo duomenys tenkina saugojimo sąlygas.

1.4.2. **Bandymo sąlygos**

1.4.2.1. *Tirpiklis/nešiklis*

Tikimasi, kad tirpiklis/nešiklis chemiškai nereaguos su bandomąja chemine medžiaga ir atitiks ląstelių išgyvenimą bei S9 aktyvumą. Jeigu naudojami kiti, skirtingai nei žinomi, tirpikliai/nešikliai, tai prieš pradedant juos vartoti, reikia pateikti jų tinkamumą įrodančius duomenis. Jei yra įmanoma, tai pirmiausia rekomenduojama naudoti skystosios fazės tirpiklį arba nešiklį. Kai bandomos vandenyje netirpios cheminės medžiagos, tai naudojamuose organiniuose tirpikliuose neturi būti vandens. Vandenį galima pašalinti, papildomai naudojant molekulinį filtrą.

1.4.2.2. *Veikimo koncentracijos*

Kai parenkama pati didžiausia koncentracija, tai vadovaujamasi tokiais kriterijais kaip citotoksiškumas, tirpumas bandomojoje sistemoje ir pH arba osmosinio slėgio pokyčiai.

Citotoksiškumas turi būti nustatomas pagrindinio eksperimento, naudojant arba nenaudojant metabolinės aktyvacijos sistemos, metu, remiantis atitinkamais rodikliais, rodančiais, kad ląstelės yra vientisos ir kad jos auga – santykiniu kloninio augimo efektyvumu arba absoliučiu santykiniu augimu. Būtų naudinga citotoksiškumą bei tirpumą nustatyti išankstinio eksperimento metu.

Turi būti naudojamos bent 4 išbandomos koncentracijos. Jei citotoksiškumas pasireiškia, tai šios koncentracijos turėtų svyruoti nuo maksimalaus iki minimalaus citotoksiškumo laipsnio arba jo apskritai neturėtų būti; šitai paprastai reikš, kad koncentracijos turės būti atskirtos tiktai faktoriumi, esančiu tarp 2 ir $\sqrt{10}$. Jei didžiausia koncentracija yra pagrįsta citotoksiškumu, tai esant jai, santykinis išgyvenimas arba santykinis absoliutus augimas turi sudaryti apie 10–20 % (bet ne mažiau kaip 10 %). Santykinai necitotoksiškų medžiagų atveju maksimali bandomoji koncentracija turi būti 5 mg/ml, 5 µl/ml arba 0,01 M, bet kuriai esant mažiausiai.

▼C1

Santykinai netirpios medžiagos turi būti bandomos kultivavimo sąlygomis, jų tirpumui siekiant ribą arba esant už jos. Netirpumas turi būti nustatomas galutinėje terpėje, kuria paveikiamos ląstelės. Prieš pradedant ir baigiant veikimą bandomąja medžiaga, būtų naudinga nustatyti tirpumą, kadangi veikimo metu tirpumas gali pakisti dėl bandomojoje sistemoje esančių ląstelių, S9 mišinio, serumo ir pan. netirpumą galima įvertinti plika akimi. Precipitatas neturi trukdyti rezultatų vertinimui.

1.4.2.3. *Kontroliniai mėginiai*

Atliekant kiekvieną eksperimentą, vienu metu reikia naudoti teigiamus ir neigiamus (tirpiklis/nešiklis) kontrolinius mėginius, esant arba nesant metabolinės aktyvacijos sistemos. Kai naudojama metabolinė aktyvacija, tai teigiamas kontrolinis mėginys turi būti cheminė medžiaga, kuria reikia aktyvuoti tam, kad ši sukeltų mutageninį atsaką.

Teigiamų kontrolinių medžiagų pavyzdžiai:

Metabolinės aktyvacijos sąlygos	Lokusas	Medžiaga	CAS Nr.	Einecs Nr.
Egzogeninės metabolinės aktyvacijos nėra	HPRT	Etilmetansulfonatas	62–50–0	200–536–7
		Etilnitrozošlapalas	759–73–9	212–072–2
	TK (mažos ir didelės kolonijos)	Metilmetansulfonatas	66–27–3	200–625–0
	XPRT	Etilmetansulfonatas	62–50–0	200–536–7
		Etilnitrozošlapalas	759–73–9	212–072–2
Egzogeninė metabolinė aktyvacijos sistema yra	HPRT	3-Metilcholantrenas	56–49–5	200–276–4
		N-nitrozodietilaminas	62–75–9	200–549–8
		7,12-Dimetilbenzantracenas	57–97–6	200–359–5
	TK (mažos ir didelės kolonijos)	Ciklofosfamidas	50–18–0	200–015–4
		Ciklofosfamidmonohidratas	6055–19–2	
		Benzpirenas	50–32–8	200–028–5
	XPRT	N-nitrozodimetilaminas (esant dideliems S9 mišinio kiekiams)	62–75–9	200–549–8
		Benzpirenas	50–32–8	200–028–5

Galima naudoti ir kitas teigiamas kontrolines etalonines medžiagas, pavyzdžiui, jei laboratorijoje buvo anksčiau gauti duomenys apie 5-bromo-2'-dezoksiuridiną (CAS Nr. 59–14–3; Einecs Nr. 200–415–9), tai galima naudoti šią etaloninę medžiagą. Kai yra įmanoma, tai reikia apsvarstyti konkrečios klasės cheminių medžiagų, kaip teigiamų kontrolinių mėginių, panaudojimą.

▼C1

Reikia panaudoti ir neigiamus kontrolinius mėginius, sudarytus vien tik iš tirpiklio ar nešiklio ir neturinčius bandomosios medžiagos bei paveiktus tokiu pat būdu kaip ir bandomieji mėginiai. Be to, reikia naudoti ir bandomąja medžiaga neveiktus neigiamus kontrolinius mėginius, nekreipiant dėmesio į anksčiau gautus kontrolinius duomenis, rodančius, kad pasirinktas tirpiklis nėra žalingas ir mutageniškas.

1.4.3. **Bandymo atlikimo metodika**

1.4.3.1. *Veikimas bandomąja medžiaga*

Proliferuojančios ląstelės paveikiamos bandomąja medžiaga, tiek esant tiek ir nesant metabolinės aktyvacijos. Poveikis turi trukti atitinkamą laiką (efektyvus poveikis paprastai užtrunka 3–6 valandas). Poveikio trukmė gali būti prailginama vienu ar keliais ląstelės ciklais.

Tiriant kiekvieną koncentraciją gali būti atliekami kultūrų, paveiktų bandomąja medžiaga, 1 ar 2 pakartojimai. Kai atliekamas kultūrų, paveiktų bandomąja medžiaga, vienetinis pakartojimas, tai koncentracijų skaičius padidinamas, kad užtikrinti, jog susidarys pakankamas analizuojamų kultūrų skaičius (turi būti naudojamos mažiausiai 8 bandomosios koncentracijos). Reikia mažiausiai dukart panaudoti neigiamas (tirpikliu paveiktas) kontrolines kultūras.

Dujinės ir lakios medžiagos turi būti bandomos atitinkamais metodais, panaudojant užsandarintus indus (21), (22).

1.4.3.2. *Išgyvenimo, gyvybingumo bei mutavimo dažnio nustatymas*

Baigiantis veikimui bandomąja medžiaga, ląstelės perplaunamos ir pakultivuojamos, siekiant nustatyti jų išgyvenimą bei užtikrinti mutantinio fenotipo ekspresiją. Pasibaigus veikimui bandomąja medžiaga, iškart nustatomas citotoksiškumas, įvertinant santykinį kloninio augimo efektyvumą (išgyvenimą) arba absoliutų santykinį augimą.

Kiekvienas lokusas turi apibrėžtą mažiausią laiko tarpą, per kurį turi įvykti beveik optimali naujai atsiradusio mutantinio fenotipų ekspresija (HFRT ir KFRT fenotipas turi mažiausiai ekspresuotis 6–8 dienas, o TK fenotipas – mažiausiai 2 dienas). Ląstelės auginamos terpėje, turinčioje arba neturinčioje medžiagos, kurios pagalba mutantai atrenkami pagal kloninio augimo efektyvumą bei nustatomas jų skaičius. Gyvybingumas pradedamas nustatinėti (tam, kad būtų galima apskaičiuoti mutavimo dažnį) baigiantis ekspresijai, kai kamienai pasėjami į lėkštelę su terpe, kuri nėra skirta atrankai (nes neturi atrankai naudojamos medžiagos).

Jei L5178Y $TK^{+/-}$- bandymo metu nustatoma, kad bandomoji medžiaga yra teigiama, tai mažiausiai vienąkart nustatomas bandomųjų kultūrų (esant pačiai didžiausiai teigiamai koncentracijai) bei teigiamų ir neigiamų kontrolinių kultūrų dydis. Jei L5178Y $TK^{+/-}$- bandymo metu nustatoma, kad bandomoji yra neigiama, tai nustatomas teigiamų bei neigiamų kontrolinių kolonijų skaičius. Atliekant TK6$TK^{+/-}$- bandymą, taipogi galima įvertinti kolonijų dydį.

▼C1

2. **DUOMENYS**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Pateikiant duomenis, turi būti nurodytas kontrolinių bei paveiktų bandomąja medžiaga kultūrų nustatytas citotoksiškumas, gyvybingumas, kolonijų skaičius bei mutavimo dažnis. Jei atliekant L5178Y $TK^{+/-}$- bandymą buvo gautas teigiamas atsakas, tai kolonijos vertinamos, panaudojant kriterijus, skirtus mažiausiai 1 bandomosios medžiagos koncentracijai, kuria buvo veikiamos mažos ir didelės kolonijos bei teigiamos ir neigiamos kontrolinės kolonijos. Didelėse bei mažose kolonijose esančių mutantų molekulinė ir citogenetinė prigimtis buvo išsamiai ištirta (23), (24). Atliekant $TK^{+/-}$-bandymą, kolonijos buvo vertinamos, panaudojant normalaus augimo (didelės kolonijos) ir sulėtinto augimo (mažos kolonijos) kriterijus (25). Mutantinės ląstelės, kuriose įvyko dideli genetiniai pažeidimai, pasižymi ilgesniu nei paprastai dalijimosi periodu ir todėl jos suformuoja mažas kolonijas. Šis sutrikimas įprastiniu atveju gali pasireikšti arba kaip atskiro geno praradimas arba kariotipiškai įvertinamomis chromosomų aberacijomis. Cheminės medžiagos, sukeliančios gigantinių chromosomų aberacijas, skatina mažas kolonijas sudarančių mutantų susiformavimą (26). Mažiau pažeistos mutantinės ląstelės auga panašiai kaip ir tėvinės ląstelės bei sudaro dideles kolonijas.

Reikia pateikti išgyvenimo (santykinio kloninio augimo efektyvumo) ar absoliutaus santykinio augimo duomenis. Mutavimo dažnis turi būti išreiškiamas kaip mutantinių ir išgyvenusių ląstelių skaičiaus santykis.

Kiekvienos kultūros bandymo duomenys pateikiami atskirai. Be to visi duomenys turi būti pateikiami apibendrintai, lentelių forma.

Nėra būtina patvirtinti, kad buvo gautas teigiamas atsakas. Abejotini rezultatai išaiškinami tęsiant bandymus, kurių metu pirmiausia pakeičiamos eksperimentinės sąlygos. Neigiami rezultatai patvirtinami kiekvienu atveju. Jei manoma, jog nėra reikalo patvirtinti, kad buvo gauti neigiami rezultatai, tai reikia pateikti pateisinančias aplinkybes. Vėliau atliekant eksperimentus, reikia apsvarstyti bandomų parametrų pakeitimus tam, kad, analizuojant abejotinus bei neigiamus rezultatus, būtų išplėstas įvertinamų sąlygų spektras. Koncentracijas skiriančiosios ribos bei metabolinės aktyvacijos sąlygos yra bandomieji parametrai, kuriuos galima modifikuoti.

2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Egzistuoja keli teigiamo rezultato įvertinimo kriterijai, tokie kaip nuo koncentracijos priklausantis arba atkartojamas mutavimo dažnio padidėjimas. Pirmiausia reikia aptarti biologinę rezultatų reikšmę. Įvertinant bandymo rezultatus, galima pasinaudoti statistiniais metodais. Tačiau statistikos svarba neturėtų tapti vieninteliu faktoriumi, apsprendžiančiu teigiamą atsaką.

Jei tiriant medžiagą, gaunami rezultatai, neatitinkantys aukščiau minėtų kriterijų, tai medžiaga laikoma nemutageniška.

▼C1

Nors daugumos eksperimentų metu gaunami aiškiai teigiami arba neigiami rezultatai, tačiau išimtiniais atvejais, remiantis visais gautais rezultatais, negalima padaryti tinkamos išvados apie bandomos medžiagos aktyvumą. Rezultatai gali likti abejotini ir neaiškūs, nepriklausomai nuo to, kiek kartų eksperimentas buvo pakartotas.

Teigiami rezultatai, gauti, tiriant žinduolių ląstelių genų mutacijas, rodo, kad bandomoji medžiaga sukelia genų mutacijas panaudotose žinduolių ląstelėse. Nuo koncentracijos priklausantis teigiamas atsakas yra svarbiausias. Neigiami rezultatai rodo, kad, esant bandymo sąlygoms bandomoji medžiaga nesukelia genų mutacijų panaudotose žinduolių ląstelėse.

3. **ATASKAITA**

BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikiama tokia informacija:

Tirpiklis/nešiklis įrenginys:

— priežastys, dėl kurių buvo pasirinktas šis įrenginys,

— bandomosios cheminės medžiagos, esančios tirpiklyje/nešiklyje, tirpumas ir stabilumas, jei toks yra žinomas.

Ląstelės:

— ląstelių tipas ir šaltinis,

— ląstelių kultūrų skaičius,

— ląstelių persėjimų skaičius (jei jį galima nurodyti),

— ląstelių kultūros palaikymo metodai (jei juos galima nurodyti),

— ar neužsikrėtusios mikoplazmomis.

Bandymo sąlygos:

— pagrindinė priežastis, nulėmusi koncentracijų bei kultūrų skaičiaus pasirinkimą, įskaitant citotoksiškumo nustatymo duomenis bei tirpumo apribojimus (jei juos įmanoma nurodyti),

— terpės sudėtis ir CO_2 koncentracija,

— bandomosios medžiagos sudėtis,

— nešiklio darbinė talpa bei į jį įdėtos medžiagos tūris,

— inkubacijos temperatūra,

— inkubacijos trukmė,

— veikimo bandomąja medžiaga trukmė,

— ląstelių tankis veikimo metu,

— metabolinės aktyvacijos sistemos tipas bei sudėtis,

— teigiami bei neigiami kontroliniai mėginiai, įskaitant jų tinkamumo kriterijus,

▼C1

— ekspresijos trukmė (įskaitant pasėtų ląstelių skaičių, subkultivavimo bei mitybai skirtų medžiagų įnešimo tvarkaraščiai, jei juos įmanoma pateikti),

— atrankos medžiagos,

— kriterijai, kuriais vadovaujamasi, sprendžiant, ar bandymų metu gauti rezultatai yra teigiami, neigiami ar abejotini,

— gyvų bei mutantinių ląstelių skaičiaus nustatymo metodai,

— kolonijų dydis ir tipas (įskaitant „mažų“ bei „didelių“ kolonijų vertinimo kriterijus, kaip yra numatyta).

Rezultatai:

— toksiškumo požymiai,

— precipitacijos požymiai,

— duomenys apie pH bei osmosinį slėgį, veikiant bandomąja medžiaga (jei tai buvo bandoma),

— kolonijų dydis, jei buvo vertinamos bent neigiamos arba teigiamos kontrolės,

— laboratorijos kompetentingumas L5178Y $TK^{+/-}$ sistemos pagalba nustatyti mutantus, sudarančius mažas kolonijas (jei tai būtina nurodyti),

— dozės ir atsako tarpusavio ryšys (jei įmanoma nurodyti),

— statistinės analizės (jei bet kokios buvo atliktos),

— duomenys apie vienu metu naudojamus neigiamus (tirpiklis/nešiklis) ir teigiamus kontrolinius mėginius,

— anksčiau gauti duomenys apie neigiamus (tirpiklis/nešiklis) bei teigiamus kontrolinius mėginius, kartu nurodant jų intervalus, vidurkius ir standartinius nukrypimus,

— mutavimo dažnis.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

4. **NUORODOS**

1) Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

2) Chu, E.H.Y. and Mailing, h.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, p. 1306–1312.

3) Liber, h.L. and Thilly, W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts. Mutation Res., 94, p. 467–485.

4) Moore, M.M., Harington-Brock, K., Doerr, C.L. and Dearfield, K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagenesis, 4, p. 394–403.

▼C1

5) Aaron, C.S. and Stankowski, Jr.L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, p. 121–128.

6) Aaron, C.S., Bolcsfoldi, G., Glatt, h.R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr.L.F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, p. 235–239.

7) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, p. 147–204.

8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J.F.S., Piper, C. and Mavournin, K.H. (1983). Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 115, p. 225–251.

9) Li, A.P., Gupta, R.S., Heflich, R.H. and Wasson, J.S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 196, p. 17–36.

10) Li, A.P., Carver, J.H., Choy, W.N., Hsie, A.W., Gupta, R.S., Loveday, K.S., O'Neill, J.P., Riddle, J.C., Stankowski, L.F. Jr. and Yang, L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, p. 135–141.

11) Liber, h.L., Yandell, D.W and Little, J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, p. 9–17.

12) Stankowski, L.F. Jr., Tindall, K.R. and Hsie, A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate -and ICR 191- Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate -and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, p. 133–147.

13) Turner, N.T., Batson, A.G. and Clive, D. (1984). Procedures for the L5178Y/$TK^{+/-}$ – $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay. In: Kilbey, B.J. et al (eds.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science Publishers, New York, p. 239–268.

14) Arlett, C.F., Smith, D.M., Clarke, G.M., Green, M.H.L., Cole, J., McGregor, D.B. and Asquith, J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J., Ed., Cambridge University Press, p. 66–101.

15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, p. 365–373.

16) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/-Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, p. 347–364.

▼C1

17) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutat. Res., 59, p. 61–108.

18) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, p. 173–215.

19) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, p. 175–177.

20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A SAFE Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R. M (eds), Elsevier, North-Holland, p. 85–88.

21) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, p. 91–103.

22) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environmental Mutagenesis, 5, p. 795–801.

23) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, p. 51–55.

24) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C, Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151, p. 161–174.

25) Yandell, D.W., Dryja, T.P. and Little, J.B. (1990). Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells. Mutation Res., 229, p. 89–102.

26) Moore, M.M. and Doerr, C.L. (1990). Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK$^{+/-}$ - 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. Mutagenesis, 5, p. 609–614.

▼M7

_____

_____

_____

▼C1

B.21. ŽINDUOLIŲ LĄSTELIŲ TRANSFORMACIJOS BANDYMAI IN VITRO

1. METODAS

1.1. ĮVADAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. APIBRĖŽTYS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Siekiant nustatyti cheminių medžiagų, sukeliančių ląstelių piktybinę transformaciją *in vivo* ir ląstelių fenotipo pokyčius *in vitro*, gali būti naudojamos žinduolių ląstelių kultūrų sistemos. Plačiai naudojamoms ląstelių linijoms priklauso C3H10$T_{1/2}$, 3T3, SHE bei Fischer žiurkių ląstelės ir testai grindžiami ląstelių morfologijos pokyčiais, ligos židinio formavimosi bei prisitvirtinimo prie pusiau kieto agaro pokyčių tyrimais. Mažiau naudojamoms sistemoms priklauso tos, kurios naudojamos fiziologiniams bei morfologiniams ląstelių, paveiktų kancerogeninėmis cheminėmis medžiagomis, pokyčiams nustatyti. Nė vieno *in vitro*, testų metu nebuvo nustatyta mechanistinio ryšio tarp vėžio ir ląstelių pokyčiu. Naudojant kai kurias bandomąsias sistemas, galima nustatyti protoonkogenų promotorius. Įvertinant bandomosios medžiagos įtaką ląstelių kultūrų sugebėjimui suformuoti kolonijas (klonavimo efektyvumas) arba augimo greičiams, galima nustatyti citotoksiškumą. Citotoksiškumo įvertinamas tam, kad būtų nustatyta, jog bandomoji medžiaga, kuria buvo veikiama, sukelia toksikologinį poveikį ir kurios negalima naudoti visuose bandymuose, apskaičiuojant transformacijos dažnį, kadangi šiuo atveju ląstelių inkubaciją ar persėjimą reikėtų pratęsti.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

Pasiruošimas bandymui

Ląstelės

Priklausomai nuo naudojamo testo transformacijai įvertinti, galima naudoti įvairiausias ląstelių linijas ar pirmines ląsteles. Tyrėjas privalo užtikrinti, kad bandomąsias ląsteles paveikus žinomais kancerogenais, šiose pasireiškia atitinkami fenotipiniai pokyčiai ir kad įrodyta bei dokumentiškai patvirtinta, jog tyrėjo laboratorijoje vartojamas bandymas yra oficialiai pripažįstamas ir patikimas.

Terpė

Atliekant transformacijos bandymą, reikėtų naudoti atitinkamą terpę bei parinkti atitinkamas eksperimentines sąlygas.

▼C1

Bandomoji medžiaga

Prieš veikiant ląsteles, bandomosios medžiagos gali būti paruošiamos kultivavimui skirtoje terpėje arba ištirpinamos ar suspenduojamos atitinkamomis priemonėmis. Tirpinančiosios priemonės galutinė koncentracija ląstelių kultūrų sistemoje neturėtų įtakoti ląstelių gyvybingumo, augimo greičio ar pasitaikančios transformacijos.

Metabolinė aktyvacija

Ląstelės turėtų būti veikiamos bandomąja medžiaga, tiek esant, tiek ir nesant metabolinės aktyvacijos sistemos. Kai naudojami ląstelių, pasižyminčių metaboliniu aktyvumu, tipai, tai aktyvumo prigimtis turėtų atitikti tą klasę, kuriai priklauso naudojamas cheminis junginys.

Bandymo sąlygos

Teigiamų ir neigiamų kontrolių naudojimas

Kiekvieno eksperimento metu reikėtų naudoti teigiamas kontroles, sudarytas tiek iš tiesiogiai veikiančio junginio, tiek iš junginio, kurį reikia metaboliškai aktyvuoti; taipogi reikėtų naudoti ir neigiamas (priemonė) kontroles.

Žemiau pateikiamos medžiagos, kurias galima naudoti kaip teigiamas kontroles:

— tiesiogiai veikiantys junginiai:

  — etilmetansulfonatas,

  — β-propiolaktonas,

— junginiai, kuriuos reikia aktyvuoti metabolitiškai:

  — 2-acetilaminofluorenas,

  — 4-dimetilaminobenzenas,

  — 7,12-dimetilbenzantracenas.

Jeigu reikia, galima naudoti ir papildomą teigiamą kontrolę, priklausančią tai pačiai cheminių junginių klasei kaip ir bandomoji medžiaga.

Veikimo koncentracijos

Bandomąją medžiagą reikėtų vartoti keliomis koncentracijomis. Šios koncentracijos turėtų sukelti nuo koncentracijos priklausomą toksinį poveikį, esant didžiausiai koncentracijai, ląstelių išgyvenimas turėtų sumažėti, tačiau esant mažiausiai koncentracijai, jis turėtų būti toks, kaip ir neigiamai kontrolei esant terpėje. Panaudojant atitinkamas procedūras turėtų būti bandomi santykinai vandenyje netirpūs junginiai, kad būtų nustatyta jų tirpumo riba. Pavienio bandymo metu turėtų būti nustatyta laisvai vandenyje tirpstančių netoksinių junginių didžiausia bandomoji koncentracija.

▼C1

Bandymo eiga

Ląstelės turėtų būti veikiamos atitinkamą laiką, priklausomai nuo naudojamos bandymo sistemos ir veikimo metu galima pakartotinai veikti su ta pačia medžiagos doze, pakeičiant terpę (jei būtina, į terpę įnešama šviežiai paruošto metabolinės aktyvacijos mišinio), jei veikimo laikas pailginamas. Ląstelės, nepasižyminčios efektyviai veikiančia metaboline aktyvacija, turėtų būti veikiamos bandomąja medžiaga, esant arba nesant atitinkamai metabolinės aktyvacijos sistemai. Baigiantis veikimui, ląstelės atplaunamos nuo neprisirišusios bandomosios medžiagos ir, kai nustatoma transformacija bei pasirodo transformuotas fenotipas, kultivuojamos atitinkamomis sąlygomis. Visi rezultatai patvirtinami, atlikus nepriklausomą eksperimentą.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti pateikti lentelėse įvairiausiomis formomis, priklausomai nuo atlikto bandymo, pvz., nurodant lėkštelių skaičių, teigiamas lėkšteles ar transformuotų ląstelių skaičių. Jeigu reikia, išgyvenimas išreiškiamas procentais kontrolės laipsnio atžvilgiu ir transformacijos dažnis išreiškiamas transformuotų ląstelių, esančių išgyvenusių ląstelių tarpe, skaičiumi.

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti pateikiama tokia informacija:

— panaudotų ląstelių tipas, ląstelių kultūrų skaičius, ląstelių kultūrų kultivavimo metodai,

— bandymo sąlygos: bandomosios medžiagos koncentracija, panaudota priemonė, inkubacijos laikas, veikimo trukmė ir dažnis, ląstelių populiacijos tankis veikimo metu, panaudotos egzogeninės metabolitinės aktyvacijos sistemos tipas, teigiamos ir neigiamos kontrolės, stebimo ląstelių fenotipo ypatumai, panaudota atrankos sistema (jei įmanoma), dozės pasirinkimo kriterijai,

— gyvų ir transformuotų ląstelių skaičiaus nustatymo metodas,

— statistinis įvertinimas,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų aiškinimas.

3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼C1

B.22. **GRAUŽIKŲ DOMINANTINIS LETALIŠKUMO BANDYMAS**

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. APIBRĖŽTYS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Dominantiniai letalūs poveikiai sukelia embriono arba gemalo žūtį. Veikiant chemine medžiaga, sukeliami dominantiniai letalūs poveikiai, kurie rodo, kad bandomoji medžiaga paveikė bandomosios rūšies gyvūnų embrionų audinius. Apskritai manoma, kad dominantiniai letalūs poveikiai pasireiškia dėl chromosomų pažeidimų (struktūrinės anomalijos arba chromosomų skaičiaus pokyčiai). Jei patelės paveikiamos medžiaga, ir jų embrionai žūsta, tai šitai taip pat įvyksta dėl toksinių poveikių.

Apskritai, gyvūnų patinai paveikiami bandomąja medžiaga, o vėliau poruojami su nekaltomis patelėmis, nepaveiktomis bandomąja medžiaga. Poruojant individus paeiliui, tam tikrais laiko tarpais, galima atskirai tirti įvairius embrioninės ląstelės vystymosi etapus. Jei, lyginant su kontrolinės grupės patelių negyvų implantų skaičiumi, šių implantų skaičius padaugėja kiekvienoje paveiktos grupės patelėje, tai rodo, kad implantacija nepavyko. Nesėkmė, atliekant išankstinę implantaciją, gali būti vertinama pagal *corpora lutea* kiekį arba lyginant absoliutų implantų bandomos bei kontrolinės grupės patelėse skaičių. Absoliutus dominantinis letalus poveikis apima nesėkmes, atliekant išankstinę bei vėlesnę implantacijas. Absoliutaus dominantinio letalaus poveikio įvertinimas paremtas gyvų implantų, esančių bandomos bei kontrolinės grupės patelėse, kiekio palyginimu. Konkrečiais laiko intervalais dėl ląstelių (tokių kaip spermatocitų ir (ar) spermatogonijų) žūties gali sumažėti implantų skaičius.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

Pasiruošimas bandymui

Jei įmanoma, bandomosios medžiagos turėtų būti ištirpintos ar suspenduotos izotoniniame druskų tirpale. Vandenyje netirpios cheminės medžiagos turi būti ištirpintos ar suspenduotos, panaudojus atitinkamus nešiklius. Naudojamas nešiklis neturi interferuoti su bandomąja chemine medžiaga ir neturi būti toksiškas. Reikėtų naudoti šviežiai paruoštus bandomosios cheminės medžiagos preparatus.

▼C1

Bandymo sąlygos

Davimo būdas

Paprastai bandomasis junginys turėtų būti duodamas vienąkart. Remiantis toksikologine informacija, veikimą galima pakartoti. Paprastai bandomoji medžiaga duodama per į trachėją įvedamą vamzdelį arba injekuojant bandomąją medžiagą į pilvą. Medžiagą galima duoti ir kitais būdais.

Eksperimentiniai gyvūnai

Rekomenduojama tirti žiurkes arba peles. Sveiki visiškai lytiškai subrendę gyvūnai atsitiktinai pasirenkami ir suskirstomi į bandomąją bei kontrolines grupes.

Skaičius ir lytis

Atsižvelgiant į vertinamų biologinių savybių spontanines variacijas, reikėtų naudoti pakankamą skaičių patinų, paveiktų bandomąja medžiaga. Skaičius turėtų būti pasirenkamas remiantis iš anksto nustatytu aptikimo jautrumu bei gaunamų duomenų svarba. Pavyzdžiui, atliekant tipinį testą, patinų, priklausančių grupėms, kurių kiekvienai duodama skirtinga dozė, turi būti tiek, kad vieno poravimosi periodo metu būtų apvaisinta 30–50 patelių.

Teigiamų ir neigiamų kontrolinių bandinių naudojimas

Atliekant kiekvieną eksperimentą, paprastai vienu metu reikėtų naudoti teigimą bei neigiamą (nešiklio) kontrolinius bandinius. Kai galima susipažinti su toje pačioje laboratorijoje ką tik atliktų eksperimentų, naudojant teigiamą kontrolinį bandinį, gautais patenkinamais rezultatais, tai šiuos rezultatus galima naudoti vietoj teigiamos kontrolės, naudojamos tuo pačiu metu. Teigiamos kontrolinės medžiagos turėtų būti naudojamos atitinkamomis mažomis dozėmis (pvz., MMS, injekuojamos į pilvą, dozė turi siekti 10 mg/kg) siekiant įrodyti bandymo metodo jautrumą.

Veikimo dozė

Reikėtų naudoti tris veikimo dozes. Didelė dozė turėtų sukelti toksiškumo požymius arba sumažinti gyvūnų, paveiktų bandomąja medžiaga, vaisingumą. Konkrečiais atvejais užtenka ir pavienės didelės dozės.

Ribinis bandymas

Duodant netoksines bandomąsias medžiagas vienąkart, jų koncentracija turi siekti 5 g/kg, o duodant pakartotinai – 1 g/kg/dieną.

Bandymo eiga

Bandomąsias medžiagas galima duoti įvairiai. Dažniausiai bandomoji medžiaga duodama vienąkart.

Pasibaigus veikimui, atitinkamais laiko tarpais pavieniai patinai paeiliui poruojami su bandomąja medžiaga nepaveiktomis nė karto nesiporavusiomis patelėmis. Patelės paliekamos su patinais laiko tarpui, lygiam vienai rujai arba tol, kol jie susiporuos, o tai nustatoma pagal spermos patekimą į makštį arba pagal makšties kamščio susidarymą.

▼C1

Pasibaigus veikimui, atliekama tiek poravimų, kiek yra numatyta veikimo tvarkaraštyje bei turėtų būti užtikrinta, kad pasibaigus veikimui, mėginiai paimami atskirais embrioninės ląstelės vystymosi etapais.

Patelės numarinamos praėjus pusei gestacijos periodo ir gimdos turinys ištiriamas tam, kad būtų nustatytas gyvų bei žuvusių implantų skaičius. Reikia ištirti kiaušides, kad būtų nustatytas *corpora lutea* skaičius.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant patinų ir vaikingų bei nevaikingų patelių skaičių. Reikėtų atskirai registruoti kiekvieno suporavimo rezultatus, nurodant kiekvieno patino ir patelės tapatybę. Taipogi kiekvienos patelės atveju reikėtų registruoti suporavimo savaitę, patinų gautą dozę, gyvų bei negyvų implantų egzistavimo dažnį.

Absoliutus dominantinių letalių poveikių skaičius nustatomas, lyginant gyvų implantų skaičių bandomosios bei kontrolinės grupės patelėse. Bandomosios grupės patelių gyvų bei negyvų implantų skaičiaus santykis palyginamas su tokiu pačiu kontrolinės grupės implantų skaičiaus santykiu siekiant nustatyti, ar implantacija nepavyko.

Jei tarp pateikiamų duomenų nurodomos ankstyvosios bei vėlyvosios žūtys, tai šitai turi būti aiškiai parodyta lentelėse. Jeigu nustatoma, kad išankstinė implantacija nepavyko, tai ji turi būti užregistruota. Ar išankstinė implantacija pavyko ar ne, sprendžiama, lyginant pagal *corpora lutea* ir implantų skaičiaus skirtumus arba pagal vidutinio implantų gimdoje skaičiaus sumažėjimą bandomojoje grupėje, lyginant su poravimais kontrolinėje grupėje.

Rezultatai turėtų būti įvertinti atitinkamais statistiniais metodais.

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti pateikiama tokia informacija:

— rūšis, atmaina, panaudotų gyvūnų amžius bei svoris, eksperimentinėje bei kontrolinėse grupėse esančių kiekvienos lyties gyvūnų skaičius,

— bandomoji medžiaga, priemonė, dozės, ir dozių pasirinkimo kriterijai, neigiamos ir teigiamos kontrolės, toksiškumo duomenys,

— davimo būdas ir veikimo tvarkaraštis,

— suporavimo tvarkaraščiai,

— metodas, kuriuo nustatoma, kad suporavimas įvyko,

— numarinimo laikas,

— dominantinių letalių mutacijų įvertinimo kriterijai,

— dozės ir atsako sąsaja, jei įmanoma,

▼C1

— statistinis įvertinimas,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų aiškinimas.

3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼C1

B.23. **ŽINDUOLIŲ SPERMATOGONIJŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJOS BANDYMAS**

1. **METODAS**

Šis metodas atitinka OECD TG 483 – Žinduolių spermatogonijų chromosomų aberacijos bandymą (1997).

1.1. ĮVADAS

Žinduolių spermatogonijų chromosomų aberacijos bandymo *in vivo* tikslas – identifikuoti medžiagas, sukeliančias žinduolių spermatogonijų chromosomų struktūrines aberacijas (1) (2) (3) (4) (5). Struktūrinės aberacijos gali būti 2 tipų: chromosominės ir chromatidinės. Dauguma mutagenų sukelia chromosomines mutacijas, tačiau pasitaiko ir chromatidinių aberacijų. Šis metodas nėra skirtas chromosomų skaičiaus rinkinyje pokyčiams įvertinti ir šiam tikslui minėtasis metodas paprastai nėra naudojamas. Chromosomų mutacijos bei su jomis susiję įvykiai sukelia daug genetinių ligų žmonių tarpe.

Šio bandymo metu nustatomi spermatogeninių gemalinių ląstelių chromosomų pokyčiai, kuriais remiantis prognozuojama apie paveldimų mutacijų atsiradimą gemalinėse ląstelėse.

Atliekant šį bandymą paprastai panaudojami graužikai. Šio citogenetinio bandymo metu *in vivo* nustatomos chromosominio tipo aberacijos, atsirandančios spermatogonijų mitozinėse chromosomose. Kitos ląstelės nėra naudojamos šiam bandymui atlikti.

Tam, kad spermatogonijose būtų identifikuotos chromatidinės aberacijos, tiriama ląstelių pirmoji mitozė, vykstanti iškart po to, kai ląstelės buvo paveiktos bandomąja medžiaga tam, kad, ląstelėms dalijantis, šie pakitimai nebūtų prarandami. Papildomą informaciją apie bandomąja medžiaga paveiktas spermatogonijų kamienines ląsteles galima gauti, analizuojant mejozines chromosomas bei ieškant chromosominių aberacijų ląstelių, esančių I diakinezės metafazės stadijoje, kai šios, paveiktos bandomąja medžiaga, tampa spermatocitais, chromosomose.

Šio bandymo, atliekamo *in vivo* sąlygomis, metu siekiama nustatyti, ar somatinių ląstelių mutacijas sukeliantys mutagenai gali jas sukelti ir gemalinėse ląstelėse. Be to, spermatogonijų bandymas yra svarbus, įvertinant mutagenų padarytą žalą, pagal kurią sprendžiama apie faktorių, reguliuojančių metabolizmą, farmakokinetiką bei DNR pažaidų atstatymo procesus, reikšmę.

Sėklidėse yra daug skirtingoms generacijoms priklausančių spermatogonijų, kurios tarpusavyje skiriasi pagal jautrumą cheminių medžiagų poveikiui. Todėl identifikuotos aberacijos parodo spermatogonijų populiacijų, kurių pagrindinę dalį sudaro daug diferencijuotų spermatogonijų, paveiktų bandomąja medžiaga, bendrąjį atsaką. Priklausomai nuo jų lokalizacijos sėklidėse, skirtingų generacijų spermatogonijos gali arba patekti arba nepatekti į bendrąją cirkuliaciją, nes egzistuoja fizinis ir fiziologinis (Sertoli ląstelių bei kraujo ir sėklidžių) barjerai.

Jeigu nustatoma, kad bandomoji medžiaga arba reaktyvusis metabolitas nepasiekia audinio, į kurį buvo nukreiptas, tai šio bandymo metu jis daugiau nebenaudojamas.

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼C1

1.2. APIBRĖŽTYS

Chromatidinė aberacija – struktūrinis chromosomos pakenkimas, pasireiškiantis kaip pavienių chromatidžių suardymas arba kaip chromatidžių suardymas ir susijungimas.

Chromotidinė aberacija – struktūrinis chromosomos pakenkimas, pasireiškiantis kaip abiejų seserinių chromatidžių trūkis arba kaip jų abiejų trūkis ir susijungimas toje pačioje vietoje.

Plyšys – achromatinė, mažesnė nei vienos chromatidės plotis, spraga, kurioje yra mažiausias skaičius klaidingai suporuotų bazių.

Chromosomų skaičiaus aberacija – ląstelėse esančių chromosomų skaičiaus pokytis, palyginus su normaliu naudojamų ląstelių skaičiumi.

Poliploidiškumas – haploidinio chromosomų skaičiaus (n), išskyrus diploidinį skaičių (t. y. 3*n*, 4*n* ir t. t.), kartotinis.

Struktūrinė aberacija – chromosomos struktūros pokytis, kurį galima nustatyti dalijimosi ciklo metafazėje esančias ląsteles tiriant mikroskopu; jis pasireiškia kaip delecijos ir fragmentai, pokyčiai grandinių viduje ar tarp grandinių.

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Gyvūnai veikiami bandomąja chemine medžiaga pagal atitinkamą veikimo chemine medžiaga metodiką ir atitinkamais laiko momentais po veikimo numarinami. Prieš numarinimą gyvūnai paveikiami medžiaga, sustabdančia ląstelių dalijimąsi metafazėje (pavyzdžiui, kolchicinu arba Kolcemidu®). Iš gemalinių ląstelių išskiriamos chromosomos, jos dažomos ir metafazėje esančios ląstelės tiriamos mikroskopu, kad būtų nustatytos chromosomų aberacijos.

1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.4.1. **Paruošimas**

1.4.1.1. *Gyvūnų rūšies pasirinkimas*

Paprastai naudojami kiniško žiurkėno ir pelių patinėliai. Tačiau gali būti naudojami ir kitų atitinkamų žinduolių rūšių patinai. Reikia naudoti visuotinai naudojamų laboratorinių atmainų jaunus sveikus subrendusius gyvūnus. Bandymo pradžioje gyvūnų svorio variacija turi būti minimali ir neviršyti ± 20 % vidutinio svorio.

1.4.1.2. *Laikymo ir šėrimo sąlygos*

Taikomos Bendrojo įvado B dalyje nurodytos sąlygos, nors stengiamasi, kad drėgmė siektų 50–60 %.

1.4.1.3. *Gyvūnų paruošimas*

Sveiki jauni subrendę gyvūnai pasirinktinai suskirstomi į kontrolinę bei bandomąją (kuriai priskirti individai bus veikiami chemine medžiaga) grupes. Narvai pastatomi taip, kad būtų kuo labiau sumažintas aplinkos poveikis, susijęs su narvų išdėstymu. Kiekvienas gyvūnas turi savo identifikacijos ženklą. Prieš pradedant bandymą, gyvūnams leidžiama aklimatizuotis prie laboratorinių sąlygų mažiausiai per 5 dienas.

▼C1

1.4.1.4. *Dozių paruošimas*

Kietosios bandomosios cheminės medžiagos ištirpinamos arba suspenduojamos atitinkamuose tirpikliuose ar nešikliuose ir jei reikia, tai, prieš paruošiant jų dozes, skirtas gyvūnams, jos praskiedžiamos. Skystųjų bandomųjų medžiagų dozės ruošiamos iškart arba prieš dozių paruošimą, jos praskiedžiamos. Prieš kiekvieną bandymą šviežiai paruošiami bandomosios cheminės preparatai ir neatsižvelgiama į stabilumo tyrimo metu gautus duomenis, rodančius, kad medžiaga atitinka jos laikymui keliamus reikalavimus.

1.4.2. **Bandymo sąlygos**

1.4.2.1. *Tirpiklis/nešiklis*

Naudojamos tirpiklio ar nešiklio dozės neturėtų sukelti jokio toksinio poveikio ir neturėtų kilti spėlionių, kad jis gali chemiškai reaguoti su bandomąja medžiaga. Jeigu naudojami kiti mažiau žinomi tirpikliai/nešikliai, prieš pradedant juos naudoti, reikia pateikti jų tinkamumą įrodančius duomenis. Jei yra įmanoma, tai pirmiausia rekomenduojama naudoti vandeninį tirpiklį arba nešiklį.

1.4.2.2. *Kontroliniai mėginiai*

Kiekvieno bandymo metu turi būti tiriami iš kiekvienai lyčiai priklausančių gyvūnų paimti vienu metu naudojami teigiami ir neigiami (tirpiklis/nešiklis) kontroliniai mėginiai. Išskyrus veikimą bandomąja medžiaga, kontrolinės grupės gyvūnai turi būti laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip ir gyvūnai, paveikti bandomąja chemine medžiaga (bandomoji grupė).

Spermatogoninių ląstelių, paveiktų tokia pačia bandomosios cheminės medžiagos doze *in vivo*, teigiamuose kontroliniuose mėginiuose turi būti nustatomos struktūrinės aberacijos, kurios, kaip tikimasi, užgoš lengvai nustatomą pašalinį foną.

Pasirenkamos tokios teigiamos kontrolinės dozės, kad gaunami poveikiai būtų ryškūs, bet kad tyrėjas ne iškart dešifruotų užkoduotus objektinius stiklelius. Priimtina, kad teigiami kontroliniai mėginiai būtų duodami gyvūnams kitaip nei bandomoji medžiaga bei būtų tik vieną kartą paimami. Jeigu yra įmanoma, tai galima pasvarstyti apie konkrečiai klasei priklausančių medžiagų, kaip teigiamų kontrolinių mėginių, panaudojimą. Žemiau pateikiami tokie teigiamų kontrolinių cheminių medžiagų pavyzdžiai:

Medžiaga	CAS Nr.	Einecs Nr.
ciklofosfamidas ciklofosfamido monohidratas	50–18–0 6055–19–2	200–015–4
cikloheksilaminas	108–91–8	203–629–0
mitomicinas C	50–07–7	200–008–6
Monomerinis akrilamidas	79–06–1	201–173–7
Trietilenmelaminas	51–18–3	200–083–5

Neigiami kontroliniai mėginiai, paveikti arba tirpikliu ar tik nešikliu, arba paveikti taip pat kaip ir bandomosios grupės, turi būti kiekvieną kartą paimami, nekreipiant dėmesio į anksčiau atliktų bandymų metu gautus kontrolinius duomenis, rodančius, kad variacijos laipsnis tarp gyvūnų ir ląstelių, kuriose stebimos chromosomų aberacijos yra priimtini. Jei neigiami kontroliniai mėginiai paimami tik vieną kartą, tai pirmojo paėmimo laikas yra pats priimtiniausias. Be to, reikia papildomai panaudoti bandomąja medžiaga neveiktus kontrolinius mėginius, nekreipiant dėmesio į anksčiau atliktų bandymų bei publikuotus duomenis, rodančius, kad pasirinktas tirpiklis ar nešiklis nesukėlė jokių žalingų ar mutageninių poveikių.

▼C1

1.5. BANDYMO ATLIKIMO METODIKA

1.5.1. **Gyvūnų skaičius**

Kiekvienoje bandomojoje ir kontrolinėje grupėse turi būti mažiausiai 5 bandomieji patinėliai.

1.5.2. **Veikimo tvarkaraštis**

Bandomosiomis medžiagomis geriausia veikti vienąkart arba dukart (pavienis veikimas arba 2 veikimai). Bandomosiomis medžiagomis galima veikti taikant vadinamąją išskaidytą dozę, kai tą pačią dieną atliekami du veikimai bandomąja medžiaga ir jų atlikimo laikas skiriasi ne daugiau kaip keletu valandų tam, kad būtų suteiktas pakankamai didelis bandomosios medžiagos tūris. Kita dozavimo tvarka turi būti moksliškai pagrindžiama.

Kai gyvūnų grupei duodama didžiausia koncentracija, tai, pasibaigus veikimui, mėginiai paimami 2 kartus. Kadangi bandomoji medžiaga gali turėti įtakos ląstelės ciklo kinetikai, tai, pasibaigus veikimui, mėginiai paimami kuo anksčiau ir kuo vėliau 24–48 valandų laikotarpiu. Kai bandomos kitos (ne didžiausios) dozės, tai pasibaigus veikimui, mėginiai paimami 24 valandų (arba 1,5 ląstelės ciklo trukmės) laikotarpiu, nebent yra žinomas kitas mėginių paėmimo laikas, kuris yra tinkamesnis, tiriant poveikius (6).

Be to, mėginius galima paimti ir kitu metu. Pavyzdžiui, tiriant chemines medžiagas, sukeliančias chromosomų pertraukimus arba galinčias turėti įtakos nuo S nepriklausantiems efektams, mėginius galima paimti ir kitu tinkamu metu (1).

Pakartotinio veikimo tvarkaraščio tinkamumas turi būti nustatomas kiekvienu atveju. Pagal pakartotinio veikimo tvarkaraštį, gyvūnai numarinami 24 valandų laikotarpiu (1,5 ląstelės ciklo trukmės) po paskutinio veikimo. Jeigu reikia, tai mėginiai yra papildomai paimami atitinkamu metu.

Prieš numarinimą, gyvūnams į pilvo plėvę suleidžiama atitinkama dozė metafazę sustabdančios medžiagos (pavyzdžiui, Kolcemido® ar kolchicino). Po atitinkamo intervalo iš gyvūnų paimami mėginiai, pelių atveju tai atliekama po 3–5 valandų, kiniškų žiurkėnų atveju tai atliekama po 4–5 valandų.

1.5.3. **Dozės dydis**

Jeigu atliekamas intervalo, apie kurį nėra duomenų, paieškos bandymas, tai jis turi būti atliekamas to pačioje laboratorijoje, naudojant tos pačios rūšies, kamieno ir lyties gyvūnus bei veikiant juos bandomąja chemine medžiaga pagal tą patį tvarkaraštį, kuris buvo naudojamas pagrindinio bandymo metu (7). Jeigu nustatomas toksiškumas, tai pirmąkart imant mėginius, naudojami 3 dozių lygiai. Šie dozių lygiai turi apimti visą intervalą, pradedant nuo maksimumo ir baigiant minimumu arba tokia doze, kuri visiškai nėra toksiška. Vėlesniu mėginių paėmimo metu naudojama tik pati didžiausia dozė. Didžiausia doze vadinama tokia dozė, kuriai esant, išryškėja toksiškumo, priklausomo nuo dozės požymiai, tokie, kurie pasirodo, kai naudojant tokį pat dozavimo tvarkaraštį, suleidžiama didžiausia dozė ir spėjama, kad ji bus mirtina.

▼C1

Medžiagos pasižyminčios specifiniu biologiniu aktyvumu, kai jų dozės būna mažos ir netoksiškos (pavyzdžiui tokios kaip hormonai ir mitogenai) gali būti laikomos išimtimi, kai joms taikomi dozę nustatantys kriterijai ir tada jos bandomos kiekvienu atveju. Didžiausia doze vadinama tokia dozė, kuriai esant, spermatogonijose pasireiškia kai kurie toksiškumo požymiai (pavyzdžiui, I ir II mejozinės metafazės metu spermatogonijų mitozių santykis sumažėja; šis sumažėjimas neviršija 50 %).

1.5.4. **Ribinis bandymas**

Jeigu bandymas atliekamas esant vienam dozės lygiui, kuris, per vieną dieną atliekant pavienį arba du poveikius bandomąja medžiaga, mažiausiai sudaro 2 000 mg/kg kūno masės/dieną ir jei nepastebima jokių toksinių poveikių bei, remiantis struktūriškai panašių cheminių medžiagų bandymų duomenimis, nebus tikimasi užregistruoti genotoksiškumo, tai tada laikomasi nuostatos, kad yra tikslinga atlikti visą bandymą panaudojant 3 dozių lygmenis. Numatomas bandomosios medžiagos poveikis žmogui gali parodyti, kad, atliekant ribų paieškos bandymą reikia naudoti aukštesnį dozės lygį.

1.5.5. **Dozavimas**

Bandomoji medžiaga yra paprastai duodama, priverstinai maitinant per vamzdelį, įstatant jį į skrandį, tinkamai įvedant kaniulę per vamzdelį arba injekciją į pilvą. Bandomąją medžiagą galima įvesti ir kitais būdais, jei jie yra pagrindžiami. Maksimalus skysčio, priverstinai duodamo per vamzdelį arba injekuojamo į pilvą vienu metu, tūris priklauso nuo bandomojo gyvūno dydžio. Tūris neturi viršyti 2 ml/100 g kūno masės. Didesnių nei šitų tūrių davimas turi būti pagrindžiamas. Išskyrus dirginančias ar ėsdinančias medžiagas, kurios, būdamos didesnėmis koncentracijomis, sukelia žalingus poveikius, bandomosios medžiagos tūrio kitimas turi būti sumažinamas iki minimumo, koncentraciją taip sureguliuojant, kad esant visiems dozių lygiams, tūris būtų pastovus.

1.5.6. **Chromosomų paruošimas**

Iškart po numarinimo, iš gyvūnų išimami kaulų čiulpai, pamerkiami į hipotoninį tirpalą ir fiksuojami. Vėliau kaulų čiulpų ląstelės išsklaidomos ant objektinių stiklelių ir nudažomos.

1.5.7. **Analizė**

Išanalizuojama mažiausiai 100 vieno gyvūno ląstelių (mažiausiai 500 vienos grupės metafazių). Šis skaičius gali būti sumažinamas, jei stebima daug chromosomų aberacijų. Visi tepinėliai (įskaitant teigiamus ir neigiamus kontrolinius mėginius) turi būti užkoduojami nepriklausomai vienas nuo kito tam, kad būtų galima juos ištirti mikroskopu. Kadangi dažnai ruošiant objektinius stiklelius, suardoma metafazėje esančios ląstelės bei prarandamos chromosomos, tai vėliau suskaičiuotos ląstelės turi turėti tokį centromerų skaičių, kuris būtų lygus 2 n ± 2.

2. **DUOMENYS**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Kiekvieno gyvūno bandymo rezultatai turi būti pateikiami lentelėse. Gyvūnas yra eksperimentinis vienetas. Turi būti nustatytas kiekvieno gyvūno ląstelių, turinčių struktūrines aberacijas ir chromosomų aberacijų vienoje ląstelėje skaičius. Turi būti išvardinti skirtingi chromosomų struktūrinių aberacijų tipai, nurodant jų skaičių bei pasireiškimo dažnį gyvūnų, paveiktų ir nepaveiktų bandomąja chemine medžiaga, grupėse. Atskirai registruojama bei pranešama apie plyšių pasireiškimą, tačiau bendru atveju jie neįskaitomi, kai nustatomas absoliutinis aberacijų pasireiškimo dažnis.

▼C1

Jei stebima tiek mitozė, tiek ir mejozė, tai turi būti nustatytas spermatogonijų mitozių I ir II mejozinės metafazės metu santykis, naudojamas kaip citotoksiškumo matas paimant bendrą mėginį (turintį 100 vieno gyvūno ląstelių) iš visų tirtų bei neigiamų kontrolinių gyvūnų tam, kad būtų nustatytas galimas citotoksinis poveikis. Jeigu stebima tik mitozė, tai kiekvieno gyvūno atveju, imant mažiausiai 1 000 ląstelių, nustatomas jų mitozinis indeksas.

2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Teigiamą rezultatą galima įvertinti keletu kriterijų, tokiais kaip nuo dozės priklausomas ląstelių su chromosominėmis aberacijomis skaičiaus padidėjimas arba akivaizdus ląstelių, turinčių aberacijas ir priklausančių pavienės dozės grupei pagal vienkartinį mėginio paėmimo laiką, skaičiaus padidėjimas. Pirmiausia reikia aptarti biologinę rezultatų reikšmę. Įvertinant bandymo metu gautus rezultatus, galima pasinaudoti statistiniais metodais (8). Statistinis reikšmingumas turėtų būti vienintelis faktorius, apsprendžiantis teigiamą atsaką. Abejotini rezultatai turėtų būti išaiškinti, toliau tęsiant bandymą ir pirmiausia pakeičiant eksperimentines sąlygas.

Jei tiriant medžiagą, gaunami rezultatai, neatitinkantys aukščiau išvardintų kriterijų, ši bandomoji medžiaga laikoma nemutageniška.

Nors daugumos eksperimentų metu buvo gauti aiškiai teigiami ar neigiami rezultatai, išimtiniais atvejais gautų rezultatų rinkinys neleis padaryti teisingos išvados apie bandomosios medžiagos aktyvumą. Rezultatai gali likti abejotini ar neaiškūs, nepriklausomai nuo atliktų eksperimentų skaičiaus.

Tiriant chromosomų aberacijas *in vitro*, gauti teigiami rezultatai rodo, kad bandomoji medžiaga sukelia chromosomų aberacijas tirtos gyvūnų rūšies kaulų čiulpų ląstelėse. Neigiami rezultatai rodo, esant bandymo sąlygoms, bandomoji medžiaga nesukelia chromosomų aberacijų tirtos gyvūnų rūšies kaulų čiulpų ląstelėse.

Reikia aptarti tą galimybę, ar bandomoji medžiaga ar jos metabolitai pasieks bendrąją cirkuliaciją ar specifiniu būdu tą audinį, į kurį jie yra nukreipti (pavyzdžiui, sisteminio toksiškumo atveju).

3. **ATASKAITA**

BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikiama tokia informacija:

Tirpiklis/nešiklis įrenginys:

— priežastys, dėl kurių buvo pasirinktas šis nešiklis,

— bandomosios cheminės medžiagos, esančios tirpiklyje/nešiklyje įrenginyje, tirpumas ir stabilumas, jei toks yra žinomas.

Bandomieji gyvūnai:

— panaudota rūšis ar kamienas,

— gyvūnų skaičius ir amžius,

— šaltinis, laikymo sąlygos, maitinimas ir pan.,

— kiekvieno gyvūno svoris prieš pradedant bandymą ir kiekvienos grupės svorio riba, vidurkiai bei standartinis nukrypimas.

▼C1

Bandymo sąlygos:

— ribų paieškos bandymo, jei jis buvo vykdomas, duomenys,

— pagrindinė priežastis, nulėmusi dozės dydžio pasirinkimą

— pagrindinė priežastis, nulėmusi davimo būdo pasirinkimą

— bandomosios medžiagos paruošimo apibūdinimas,

— bandomosios medžiagos davimo būdo apibūdinimas,

— pagrindinė priežastis, nulėmusi numarinimo laiko pasirinkimą

— bandomosios cheminės medžiagos, esančios pašaruose ir geriamajame vandenyje, koncentracijos (ppm) pervertimas į tikrąją dozę (mg/kg kūno masės/dienai), jei tai įmanoma,

— duomenys apie pašarų ir geriamojo vandens kokybę,

— veikimo bandomąja medžiaga ir mėginio paėmimo tvarkaraščio išsamus aprašymas,

— metodai toksiškumui įvertinti,

— metafazę sustabdančios medžiagos prigimtis, jos koncentracija bei veikimo ja trukmė,

— objektinių stiklelių paruošimo metodai,

— aberacijų įvertinimo kriterijai,

— ląstelių, kurios buvo išskirtos iš vieno gyvūno bei išanalizuotos, skaičius,

— teigiamų, neigiamų ar abejotinų rezultatų nustatymo kriterijai.

Rezultatai:

— toksiškumo požymiai,

— mitozinis indeksas,

— I ir II mejozinėse metafazėse esančių ląstelių spermatogoninių mitozių santykis,

— kiekvieno gyvūno ląstelių chromosomų aberacijų tipas ir skaičius,

— absoliutus aberacijų vienoje grupėje skaičius,

— vienos grupės ląstelių, turinčių aberacijas, skaičius,

— dozės ir atsako tarpusavio ryšys, jei tai įmanoma nurodyti,

— statistinės analizės, jei bet kokios buvo atliktos,

— duomenys apie vienu metu naudotas neigiamas kontroles,

— anksčiau gauti duomenys apie neigiamus kontrolinius mėginius, nurodant intervalus, vidurkius bei standartinius nukrypimus,

— duomenys apie vienu metu naudotus teigiamus kontrolinius mėginius,

— ploidiškumo pasikeitimai, jei buvo tokie stebimi.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

▼C1

4. **NUORODOS**

1) Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C, Lambert, B. and Magnusson, J. (Eds.) Liss, New York, p. 477–484.

2) Adler, I.D., (1984). Cytogenetic tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J.M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, p. 275–306.

3) Evans, E.P., Breckon, G. and Ford, C.E., (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, p. 289–294.

4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, p. 115–141.

5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, p. 207–209.

6) Adler, I.D., Shelby M.D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, p. 313–318.

7) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, p. 313–319.

8) Loveli, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, p. 184–232.

▼M7

▼C1

B.25. **PELIŲ PAVELDĖTA TRANSLOKACIJA**

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. APIBRĖŽTYS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Tiriant paveldimą translokaciją pelėse, nustatomi žinduolių embrioninių ląstelių chromosomų struktūriniai bei skaičiaus pokyčiai, kurie išnyksta pirmos kartos palikuonyse. Nustatomi tokie chromosomų pokyčiai: atvirkštinės translokacijos ir X-chromosomos praradimas tuo atveju, jei bandomos palikuonių patelės. Gyvūnų, turinčių translokacijas bei XO-patelių vaisingumas yra sumažėjęs ir pagal tai atrenkami F_1 palikuonys, kurie bus naudojami citogenetinei analizei. Visiškas sterilumas stebimas konkrečių translokacijų atveju (X-autosoma ir c-t tipas). Atliekant citogenetinę analizę, translokacijos nustatomos arba F_1 patinuose arba F_1 patelių vyriškos lyties palikuonių ląstelėse, besidalijančiose mejozės būdu, ląstelėms esant diakinezės-I metafazės stadijoje. Atliekant citogenetinę analizę, XO-patelės nustatomos tik pagal kaulų čiulpų ląsteles, besidalijančias mitozės būdu ir turinčias tik 39 chromosomas.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

Pasiruošimas bandymui

Bandomosios medžiagos ištirpinamos izotoniniame druskų tirpale. Vandenyje netirpios cheminės medžiagos ištirpinamos ar suspenduojamos, panaudojus atitinkamas priemones. Naudojami šviežiai paruošti bandomosios cheminės medžiagos tirpalai. Jei priemonė duodama kartu su bandomosios medžiagos doze, tai ji neturi trukdyti nei bandomajai cheminei medžiagai veikti, nei toksiniams poveikiams pasireikšti.

Davimo būdas

Paprastai bandomoji medžiaga duodama per į trachėją įvedamą vamzdelį arba injekuojant bandomąją medžiagą į pilvą. Medžiagą galima duoti ir kitais būdais.

Eksperimentiniai gyvūnai

Tam, kad palengvėtų kryžminimas bei citologinis patvirtinimas, šie eksperimentai atliekami su pelėmis. Specifinis pelių kamienas nėra būtinas. Tačiau vienam kamienui priklausančių gyvūnų vadoje vidutiniškai bei pastoviai turėtų būti daugiau nei aštuoni palikuonys.

Naudojami sveiki lytiškai subrendę gyvūnai.

▼C1

Gyvūnų skaičius

Gyvūnų, būtinų bandymui atlikti, skaičius priklauso nuo spontaninės translokacijos dažnio bei mažiausio translokacijos sukėlimo greičio, kuris būtinas tam, kad būtų gaunamas teigiamas rezultatas.

Bandymas paprastai atliekamas analizuojant patinų F_1 palikuonis. Tiriant gyvūnų, kuriems buvo duota konkreti bandomosios medžiagos dozė, grupę, reikėtų išanalizuoti mažiausiai 500 patinų F_1 palikuonis. Jei bandomi patelių F_1 palikuonys, bandymui atlikti reikia po 300 patinų bei patelių.

Teigiamų ir neigiamų kontrolių naudojimas

Reikėtų remtis atitinkamais kontroliniais duomenimis, gautais atliekant bandymą ir vienu metu naudojant kontroles bei anksčiau atliktų bandymų metu naudotas kontroles. Kai galima susipažinti su toje pačioje laboratorijoje ką tik atliktų eksperimentų, naudojant teigiamas kontroles, gautais patenkinamais rezultatais, šiuos rezultatus galima naudoti vietoj teigiamos kontrolės, naudojamos tuo pačiu metu.

Veikimo dozė

Bandymo metu paprastai naudojama pavienė ir pati didžiausia dozė, sukelianti silpniausiai pasireiškiančius toksinius poveikius, tačiau neįtakojanti elgsenos dauginimosi metu ar išgyvenimo. Siekiant nustatyti dozės ir atsako sąsają, reikėtų panaudoti dvi nedideles papildomas dozes. Netoksinių cheminių medžiagų atveju reikėtų naudoti pačią didžiausią dozę.

Bandymo eiga

Veikimas ir poravimas

Veikti bandomąja medžiaga galima dvejopai. Dažniausiai bandomoji medžiaga duodama vienąkart. Taipogi medžiagą galima duoti 35 dienų laikotarpiu, septynias dienas per savaitę. Pasibaigus veikimui, atliekami poravimai pagal tvarkaraštį ir reikėtų užtikrinti, kad buvo paimti visų brendimo stadijų paveiktų embrioninių ląstelių mėginiai. Baigiantis poravimui, patinai ir patelės atskiriami ir patalpinami į atskirus narvelius. Kai patelės atsiveda jauniklius, registruojama palikuonių gimimo data, vados dydis bei palikuonių lytis. Visi vyriškos lyties palikuonys atjunkomi, o visi moteriškos lyties palikuonys pašalinami, nebent jie būtų naudojami eksperimento metu.

Translokacijos heterozigotiškumo bandymas

Galima naudotis vienu iš dviejų galimų metodų:

— F_1 palikuonių vaisingumo bandymas ir gyvūnų, kurie gali turėti translokacijas, identifikavimas citogenetinės analizės būdu,

— visų F_1 vyriškos lyties palikuonių citogenetinė analizė, neatrenkant jų iš anksto pagal vaisingumą.

a) Vaisingumo bandymas

Sumažėjęs F_1 gyvūno vaisingumas gali būti nustatomas, stebint vados gausą ir (ar) analizuojant patelių, kurios buvo naudojamos poravimui, gimdos turinį.

Atsižvelgiant į naudojamą pelių kamieną, reikia pasirinkti kriterijus, pagal kuriuos bus sprendžiama apie normalų ir sumažėjusį vaisingumą.

▼C1

Vados dydžio stebėjimas: Bandomieji F_1 patinai yra laikomi atskirai arba nuo tame pačiame eksperimente naudojamų arba nuo visos pelių kolonijos patelių. Narvai stebimi kasdien, pradedant nuo 18 dienos, praėjusios po suporavimo. Patelėms atsivedus F_2 palikuonis, užregistruojamas vados dydis bei palikuonių, kurie po to pašalinami, lytis. Jei bandomi moteriškos lyties F_1 palikuonys, tai mažos F_2 vados bus bandomos vėliau. Translokacijas turinčios patelės identifikuojamos, atliekant translokacijos citogenetinę analizę, naudojant bet kurį jų vyriškos lyties palikuonį. XO patelės identifikuojamos pagal lyčių santykio jų palikuonių tarpe pokyčius – 1:1 (patinai/patelės) — → 1:2 (patinai/patelės). Vėliau normalūs F_1 gyvūnai toliau nebetiriami, jei F_2 vados dydis pasiekia arba peržengia iš anksto nustatytą normalią ribą, priešingu atveju stebimos antroji bei trečioji F_2 vados.

F_1 gyvūnų, kurių negalima laikyti normaliais, baigus net trijų F_2 vadų stebėjimus, atveju reikia arba tirti patelių, kurios buvo poruojamos su patinais, gimdos turinį arba reikia iškart pradėti gyvūnų citogenetinę analizę.

Gimdos turinio analizė: Translokacijas turinčių gyvūnų vados dydis sumažėja dėl embrionų žūties, todėl daug žuvusių implantų parodo, kad bandomieji gyvūnai turi translokacijas. Kiekvienas F_1 patinas, kuris bus bandomas, suporuojamas su 2–3 patelėmis. Apvaisinimas nustatomas kiekvienos dienos rytą ieškant makšties kamščio susidarymo. Praėjus 14–16 dienų po apvaisinimo patelės numarinamos ir užregistruojami gyvi bei žuvę implantai, esantys gimdoje.

b) Citogenetinė analizė

Sėklidės paruošiamos, išdžiovinant jas ore. Gyvūnai, turintys translokacijas, identifikuojami pagal pirminių spermatocitų, esančių mejozės diakinezės-metafazės I stadijoje, multivalentinių chromosomų konfigūracijas. Nustačius šiuos multivalentinius darinius mažiausiai dviejose ląstelėse, galima teigti, kad bandomasis gyvūnas turi translokacijas.

Jei nebuvo vykdoma atranka pagal kryžminimus, tai visi F_1 patinai tiriami citogenetiniu aspektu. Reikia mikroskopiškai ištirti mažiausiai 25 vieno patino ląsteles, esančias diakinezės-metafazės I stadijoje. Jei įtariama, kad F_1 patinuose, turinčiuose menkas sėklides bei F_1 XO patelėse mejozė nutraukiama, prieš prasidedant diakinezei, reikia ištirti šių patinų spermatogonijų arba kaulų čiulpų ląstelių bei patelių kaulų čiulpų ląstelių mitozines metafazines chromosomas. Mažiausiai dešimtyje ištirtų ląstelių nustatytos neįprastai ilgos ar trumpos chromosomos parodo, kad vienas ar kitas patinas yra sterilus pagal chromosomų translokacijas (c-t tipas). Kai kurios X-autosomų translokacijos, apsprendžiančios patinų sterilumą, gali būti nustatomos tiktai atliekant mitozinių chromosomų juostų elektroforezinę analizę. Jei tirtos patelės atveju bent 10 mitozės atvejų užregistruojamos 39 chromosomos, tokia patelė laikoma XO.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse.

Atliekant kiekvieną poravimą, registruojamas vidutinis vados dydis bei lyčių santykis, pradedant nuo tėvų poravimo ir baigiant palikuonių gimimu bei jų atjunkymu.

▼C1

Įvertinant F_1 gyvūnų vaisingumą, pateikiamas vidutinis vados dydis normalių poravimų atveju bei atskirų F_1 gyvūnų, turinčių translokacijas, vadų dydžiai. Tiriant gimdos turinį, pateikiamas vidutinis gyvų bei žuvusių implantų skaičius normalių poravimų atveju ir atskirų F_1 gyvūnų, turinčių translokacijas, gyvų bei žuvusių transplantų skaičius kiekvieno poravimo atveju.

Atliekant ląstelių, esančių diakinezės- metafazės I stadijoje, citogenetinę analizę, nurodomas multivalentinių chromosomų konfigūracijų tipų kiekis bei absoliutus ląstelių, naudotų, tiriant kiekvieną translokacijas turintį gyvūną, absoliutų skaičių.

Tiriant sterilius F_1 gyvūnus, pateikiamas absoliutus poravimų skaičius bei poravimo periodo trukmė. Nurodomi sėklidžių svoriai bei citogenetinės analizės duomenys.

Tiriant XO pateles, nurodomas vidutinis vados dydis, lyčių santykis F_2 palikuonių tarpe bei citogenetinės analizės duomenys.

Jei numanomi F_1 gyvūnai, turintys translokacijas, tiriami pagal vaisingumą, taip atrenkant juos iš anksto, pateikiamos lentelės, kuriose nurodoma, kiek iš tų F_1 gyvūnų yra heterozigotų pagal translokacijas.

Pateikiami eksperimentų, kurių metu naudojamos teigiamos bei neigiamos kontrolės, duomenys.

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti pateikiama tokia informacija:

— pelių kamienas, gyvūnų amžius, gyvūnų, paveiktų bandomąja medžiaga, kūno masė,

— kiekvienos lyties tėvinių gyvūnų skaičius bandomojoje bei kontrolinėje grupėse,

— bandymo sąlygos, išsamus veikimo aprašymas, dozės, tirpikliai, suporavimo tvarkaraštis,

— kiekvienos patelės atsivestų palikuonių skaičius bei lytis, palikuonių, užaugintų translokacijos bandymams, skaičius bei lytis,

— translokacijos bandymo laikas bei kriterijai,

— gyvūnų, turinčių translokacijas, išsamus apibūdinimas bei jų skaičius, įskaitant kryžminimo duomenis bei gimdos turinio analizės rezultatus, jei reikia,

— citogenetinės procedūros ir mikroskopinės analizės apibūdinimas, pageidautina, pateikiant schemas,

— statistinis įvertinimas,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų aiškinimas.

▼C1

3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼C1

B.26. **POŪMIS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ. 90 DIENŲ KARTOTINIŲ DOZIŲ TOKSIŠKUMO GRAUŽIKAMS BANDYMAS**

1. **METODAS**

Šis poūmio toksiškumo per virškinamąjį traktą bandymo metodas yra OECD TG 408 (1998) kopija.

1.1. ĮVADAS

Vertinant cheminių medžiagų toksines savybes, galima atlikti kartotinių dozių poūmio toksiškumo per virškinamąjį traktą bandymą, prieš tai gavus pradinę informaciją apie jos toksiškumą per ūmaus ar 28 parų kartotinės dozės toksiškumo bandymus. Per 90 dienų bandymą gaunama informacijos apie galimus pavojus sveikatai, galinčius kilti po kartotinio veikimo ilgą laikotarpį, trunkantį nuo atjunkymo iki visiško subrendimo. Atlikus šį bandymą gaunama informacijos apie svarbesnius toksinius poveikius, paveiktus organus ir kaupimosi galimybę, taip pat duomenų apie nepastebėto neigiamo poveikio ribą (NOAEL), kuria galima pasinaudoti parenkant dozes lėtinio poveikio bandymui ir nustatant žmonių sąlyčio su konkrečia chemine medžiaga saugos kriterijus.

Šiame metode papildomas dėmesys skiriamas sukeliamiems neurologiniams pakitimams, taip pat gaunama žinių, ar paveiktos imunologinė ir dauginimosi sistemos. Pabrėžiamas gyvūnų kruopščių klinikinių stebėjimų būtinumas, kad būtų gauta kuo daugiau informacijos. Šiuo bandymu turėtų būti nustatomos cheminės medžiagos, galinčios sukelti neurotoksinį poveikį, paveikti imunologinę sistemą ar dauginimosi organus, o tai būtų pagrindas toliau tęsti išsamius tyrimus.

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. APIBRĖŽTYS

Dozė – gyvūnui duotas bandomosios medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama bandomosios medžiagos mase bandomojo gyvūno masės vienetui (pvz., mg/kg), ar pastovia koncentracija maiste (ppm).

Dozavimas – bendras terminas, apimantis dozės dydį, jos dažnį ir dozavimo trukmę.

NOAEL – termino „nepastebėto neigiamo poveikio riba“ (No observed adverse effect level) santrumpa, tai yra didžiausia dozė, kai nepastebimas neigiamas su veikimu chemine medžiaga susijęs poveikis.

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Kasdien kelioms bandomųjų gyvūnų grupėms per virškinamąjį traktą duodamos skirtingos bandomosios medžiagos dozės, vienai grupei 90 parų laikotarpiu duodama vieno dydžio dozė. Medžiagos davimo laikotarpiu atidžiai stebima, ar gyvūnams pasireiškia toksiškumo požymiai. Darant bandymą nugaišę ar numarinti gyvūnai skrodžiami, o baigus bandymą išlikę gyvūnai taip pat numarinami ir skrodžiami.

▼C1

1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.4.1. **Gyvūnų paruošimas**

Turi būti imami sveiki gyvūnai, bent penkias paras aklimatizuoti laboratorijos sąlygomis ir dar nenaudoti kitiems bandymams. Aprašoma bandymo gyvūnų rūšis, veislė, šaltinis, lytis, masė ir (ar) amžius. Gyvūnai į kontrolines ir bandomąsias grupes turi būti paskirstomi atsitiktinai. Narveliai turi būti pastatomi taip, kad kuo mažiau pasireikštų neigiama jų išdėstymo įtaka. Kiekvienam gyvūnui turi būti paskirtas unikalus identifikacijos numeris.

1.4.2. **Dozių ruošimas**

Bandomoji medžiaga duodama per zondą arba su maistu ar geriamuoju vandeniu. Dozės davimo per virškinamąjį traktą būdas priklauso nuo bandymo tikslo ir bandomosios medžiagos fizikinių ir cheminių savybių.

Jei būtina, bandomajai medžiagai ištirpdyti arba suspenduoti naudojamas atitinkamas nešiklis. Rekomenduojama naudoti, jei įmanoma, vandeninį tirpalą (suspensiją, emulsiją), toliau pirmenybė teikiama aliejiniam tirpalui (emulsijai, suspensijai) (pvz., kukurūzų aliejaus) ir tik po jų svarstytini kitų nešiklių tirpalai. Turi būti žinomos visų nešiklių, išskyrus vandenį, toksiškumo charakteristikos. Turi būti nustatytas bandomosios medžiagos stabilumas dozės davimo sąlygomis.

1.4.3. **Bandymo sąlygos**

1.4.3.1. *Bandomieji gyvūnai*

Geriau tinka žiurkės, tačiau galima naudoti ir kitus graužikus, pvz., peles. Reikėtų naudoti gerai žinomų laboratorinių veislių jaunus suaugusius gyvūnus. Patelės turi būti dar neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos. Dozavimas turėtų būti pradėtas kuo anksčiau po atjunkymo, bet kokiu atveju ne vėliau negu gyvūnams sukanka devynios savaitės. Gyvūnų masės skirtumai prieš bandymo pradžią turi būti kuo mažesni ir neviršyti ± 20 % kiekvienos lyties vidutinės masės. Jei tai yra pradinis bandymas prieš ilgalaikį lėtinio toksiškumo bandymą, abiem bandymams turi būti naudojami tos pačios veislės ir to paties šaltinio gyvūnai.

1.4.3.2. *Skaičius ir lytis*

Kiekvienai dozei turi būti naudojama bent 20 gyvūnų (10 patelių ir 10 patinų). Jei planuojami tarpiniai skrodimai, gyvūnų skaičius turi būti padidintas tiek, kiek jų numatyta numarinti iki bandymo pabaigos. Remiantis ankstesnėmis žiniomis apie cheminę medžiagą ar labai panašių savybių medžiagą, galima į kontrolinio bandymo ir į didžiausios dozės grupę papildomai įtraukti pagalbinę 10 gyvūnų grupę (po penkis kiekvienos lyties), kad pasibaigus veikimo laikotarpiui galima būtų stebėti visų toksiškumo požymių grįžtamumą ar išlikimą. Šio laikotarpio po veikimo trukmė turėtų būti atitinkamai nustatyta atsižvelgiant į stebimus poveikius.

▼C1

1.4.3.3. *Dozės*

Naudojamos bent trijų dydžių dozės ir vienas lygiagretus kontrolinis bandinys, išskyrus atvejus, kai daromas ribinis bandymas (žr. 1.4.3.4). Dozių dydžiai gali būti pagrįsti kartotinių dozių ar diapazono nustatymo bandymų rezultatais ir turi būti atsižvelgta į visus esamus toksikologinius ir toksikokinetinius duomenis apie bandomąją medžiagą ar gimininges medžiagas. Jei bandomosios medžiagos fizikinis ir cheminis pobūdis ar biologinis poveikis dozės neriboja, didžiausia dozė turi būti pasirinkta tokia, kad gyvūnui būtų sukeltas toksinis poveikis, bet jis nežūtų ar nepatirtų didelių kančių. Mažėjančių dozių seka turi būti pasirinkta taip, kad būtų pastebėtas bet koks dozės sukeltas atsakas, o esant mažiausiai dozei nebūtų pastebėta jokio neigiamo poveikio (NOAEL). Mažėjančios dozės turėtų būti du-keturis kartus viena už kitą mažesnės, ir dažnai vietoj didelių dozių intervalų (pvz., kai skirtumas tarp jų yra 6–10 kartų) geriau naudoti papildomą ketvirtą bandymų grupę.

Kontrolinę grupę sudaro neveikiamų gyvūnų grupė arba nešiklį gaunanti kontrolinė grupė, jei bandomajai medžiagai duoti naudojamas nešiklis. Išskyrus bandomosios medžiagos davimą, su kontrolinės grupės gyvūnais turi būti elgiamasi lygiai taip, kaip su bandymo grupių gyvūnais. Jei naudojamas nešiklis, kontrolinės grupės gyvūnai gauna didžiausią nešiklio tūrį. Jei bandomoji medžiaga duodama su maistu ir dėl to gyvūnai suvartoja mažiau maisto, gali būti naudinga turėti lygiagrečiai maitinamą kontrolinę grupę, kad būtų galima nustatyti, ar maisto vartojimo sumažėjimas yra dėl apetito stokos ar dėl toksikologinių pokyčių pagal bandymo modelį.

Reikėtų atkreipti dėmesį į šias nešiklio ir kitų priedų charakteristikas: poveikį bandomosios medžiagos absorbcijai, pasiskirstymui, metabolizmui ar sulaikymui; poveikį bandomosios medžiagos cheminėms savybėms, galintiems pakeisti jos toksiškumo charakteristikas; ir poveikį maisto ar vandens vartojimui ar gyvūnų mitybos būklei.

1.4.3.4. *Ribinis bandymas*

Jei, taikant šiam bandymui aprašytas metodikas, vienos dozės, atitinkančios bent 1 000 mg/kg kūno masės/parai, bandymas nesukelia jokio pastebimo neigiamo poveikio ir jei toksiškumas nenumatomas atsižvelgiant į struktūriškai gimininguų medžiagų duomenis, visas trijų dozių bandymas gali būti laikomas nebūtinu. Toks ribinis bandymas netaikomas tais atvejais, kai atsižvelgiant į žmonių sąlytį su medžiaga reikia naudoti didesnio dydžio dozę.

1.5. BANDYMO EIGA

1.5.1. **Dozavimas**

Bandomosios medžiagos dozė 90 parų laikotarpiu gyvūnams duodama kasdien visas septynias dienas per savaitę. Bet kurį kitą režimą, pvz., penkių dienų per savaitę, reikia pagrįsti. Kai bandomoji medžiaga duodama per zondą, gyvūnams turėtų būti duodama tik viena dozė naudojant skrandžio zondą ar tinkamą intubacinį vamzdelį. Didžiausias gyvūnui duodamas vienkartinis skysčio tūris priklauso nuo bandomojo gyvūno dydžio. Tūris neturėtų būti didesnis kaip 1 ml/100 g kūno masės, išskyrus vandeninius tirpalus, kurių galima duoti po 2 ml/100 g kūno masės. Išskyrus dirginančias ar ėsdinančias medžiagas, kurių didesnės koncentracijos paprastai sukelia dirginantį poveikį, tirpalo tūrio svyravimai turi būti kuo mažesni: koncentracija pakoreguojama taip, kad visų dozių tūris būtų toks pats.

▼C1

Jei medžiagos duodamos su maistu ar geriamuoju vandeniu, svarbu garantuoti, kad naudojami bandomosios medžiagos kiekiai netrikdytų normalaus mitybos režimo ar vandens balanso. Bandomąją medžiagą duodant su maistu, galima naudoti pastovią koncentraciją maiste (ppm) ar pastovią dozę pagal gyvūno kūno masę; naudota alternatyva turi būti nurodyta. Medžiagą įleidžiant per zondą, dozė turėtų būti duodama kasdien panašiu laiku ir prireikus pakoreguojama pastoviam dozės dydžiui pagal gyvūno kūno masę palaikyti. Jei 90 parų bandymas daromas kaip pradinis prieš ilgalaikį lėtinio toksiškumo bandymą, abiem bandymams turi būti naudojamas panašus maistas.

1.5.2. **Stebėjimai**

Stebėjimo trukmė turi būti ne mažesnė kaip 90 parų. Pagalbinės grupės gyvūnai, skirti paskesniems stebėjimams, atitinkamą laiką turi būti niekaip neveikiami, kad būtų galima konstatuoti toksinių poveikių išlikimą ar atsigavimą po jų.

Bendras klinikinis stebėjimas turi būti atliekamas bent kartą per dieną, geriau kasdien tuo pačiu laiku, atsižvelgiant į intensyviausią numatomo poveikio pasireiškimo laiką po medžiagos davimo. Turi būti registruojama gyvūnų klinikinė būsena. Bent du kartus per dieną, paprastai kiekvienos dienos ryte ir vakare, visi gyvūnai apžiūrimi siekiant nustatyti liguistumo ir gaištamumo požymius.

Bent vieną kartą prieš pirmąjį veikimą (kad būtų galima palyginti to paties gyvūno duomenis) ir po to kartą per savaitę visiems gyvūnams turi būti daromi išsamūs klinikiniai tyrimai. Šie tyrimai turi būti daromi ne pačiame gyvūno narvelyje, o geriau standartiškai įrengtoje vietoje ir kiekvieną kartą panašiu laiku. Jie turi būti kruopščiai registruojami, geriausiai naudojant bandymų laboratorijos aiškiai nustatytą vertinimo balais sistemą. Turi būti imamasi priemonių, garantuojančių kuo mažesnį stebėjimo sąlygų kitimą. Pastebėti simptomai turi apimti, jais neapsiribojant, odos, kailio, akių, gleivinių, sekrecijų ir ekskrecijų dažnį ir autonominį aktyvumą (pvz., ašarojimą, plaukų pašiaušimą, vyzdžių dydį, neįprastą kvėpavimą). Taip pat turi būti registruojami eisenos pokyčiai, laikysena ir reakcija į elgimąsi su gyvūnu (angl. *handling*), kloniniai ar toniniai judesiai, stereotipai (pvz., per dažnas kūno prisižiūrėjimas, nuolatinis sukimasis ratu) ar keistas elgesys (pvz., savęs žalojimas, vaikščiojimas atbulomis) (1).

Prieš pradedant duoti bandomąją medžiagą ir baigiant bandymą turi būti daromas, pageidautina visų, bet jei neįmanoma, tai bent didžiausios dozės ir kontrolinės grupių gyvūnų oftalmologinis tyrimas naudojant oftalmoskopą ar lygiavertę tinkamą įrangą. Jei nustatomi akių pakitimai, turi būti ištirti visi gyvūnai.

Baigiantis veikimo laikui, bet jokiu būdu ne anksčiau kaip vienuoliktą savaitę, turi būti tikrinama sensorinė reakcija į įvairius dirgiklius (1) (pvz., klausos, regos ir proprioceptinius dirgiklius) (2), (3), (4), daromas grybšnio jėgos (5) ir motorinio aktyvumo (6) vertinimas. Kita išsami informacija apie tinkamus metodus pateikiama atitinkamose nuorodose. Tačiau galima taikyti šių nuorodų metodams alternatyvius metodus.

Bandymo pabaigoje numatyti funkciniai stebėjimai gali būti nevykdomi, jei yra kitų bandymų funkcinių stebėjimų duomenys, o kasdienių klinikinių stebėjimų metu nepastebėta jokių funkcinių sutrikimų.

▼C1

Išimtiniu atveju funkcinių stebėjimų galima taip pat nedaryti grupėms, kurių toksiškumo požymiai yra tokie ryškūs, kad jie labai trukdytų atlikti funkcinius stebėjimus.

1.5.2.1. *Kūno masė ir maisto/vandens suvartojimas*

Visi gyvūnai turi būti sveriami bent kartą per savaitę. Suvartojamo maisto kiekis turi būti matuojamas bent kas savaitę. Jei bandomoji medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu, bent kas savaitę turi būti nustatomas ir suvartojamo vandens kiekis. Suvartojamo vandens kiekį rekomenduojama matuoti ir tuo atveju, kai bandomąją medžiagą duodant su maistu ar per zondą gali pakisti vandens suvartojimas.

1.5.2.2. *Hematologiniai ir klinikiniai biocheminiai tyrimai*

Kraujo bandiniai turi būti imami iš nurodytos vietos ir prireikus laikomi atitinkamomis sąlygomis. Baigiantis bandymo laikotarpiui kraujas paimamas prieš pat gyvūnų numarinimą arba numarinimo metu.

Bandymo laikotarpio pabaigoje arba kai imami tarpiniai kraujo bandiniai, turi būti daromi šie hematologiniai tyrimai: hematokrito vertė, hemoglobino koncentracija, eritrocitų skaičius, bendras leukocitų skaičius ir leukocitų formulė, trombocitų skaičius ir kraujo krešėjimo laiko/gebos matavimas.

Klinikiniai biocheminiai matavimai siekiant nustatyti pagrindinius toksinius poveikius audiniams, ypač inkstams bei kepenims, turi būti atliekami paėmus kraują prieš pat numarinant gyvūną ar numarinimo metu (išskyrus gaištančius ir (ar) numarintus darant bandymą). Panašiai kaip hematologiniams tyrimams, galima imti tarpinius bandinius klinikiniams biocheminiams bandymams. Rekomenduojama prieš kraujo ėmimą gyvūnų per naktį nešerti ([1]). Analizuojant serumą ar plazmą turi būti nustatomi natrio ir kalio jonai, gliukozė, bendras cholesterolis, karbamidas, kraujo karbamido azotas, kreatininas, bendras baltymų ir albumino kiekis ir daugiau kaip du fermentai, rodantys poveikį kepenų ląstelėms (pvz., alaninaminotransferazė, aspartataminotransferazė, šarminė fosfatazė, gama glutamiltranspeptidazė ir sorbitoldehidrogenazė). Taip pat galima įtraukti papildomų fermentų (kepenų ar kitokios kilmės) ir tulžies rūgščių matavimus, kurie tam tikromis sąlygomis gali suteikti naudingos informacijos.

Neprivalomai paskutinę bandymo savaitę gali būti analizuojami šie nustatytu laiku paimtų šlapimo bandinių parametrai: išvaizda, tūris, osmoliališkumas ar santykinis tankis, pH, baltymai, gliukozė ir kraujas ar kraujo ląstelės.

Be to, galima atlikti tyrimus bendrų audinių pakitimų serumo rodikliams nustatyti. Jei dėl žinomų bandomosios medžiagos savybių gali būti paveiktos susijusios medžiagų apykaitos kreivės arba įtariama, kad jos paveiktos, reikėtų daryti kalcio, fosforo, badavimo trigliceridų, specifinių hormonų, metemoglobino ir cholinesterazės analizes. Šios analizės turi būti atliekamos tam tikrų klasių cheminių medžiagų atžvilgiu arba dėl jų atlikimo turi būti sprendžiama konkrečiu atveju.

([1]) Būtų geriau, jei prieš imant kraują kai kuriems serumo ir plazmos parametrams, ypač gliukozei, nustatyti gyvūnai nebūtų naktį maitinami. Pagrindinė priežastis – šeriant neišvengiamai padidėja rezultatų sklaida, dėl to galėtų būti užslėpti mažiau pastebimi poveikiai ir todėl pasunkėtų rezultatų aiškinimas. Tačiau, kita vertus, badavimas per visą naktį gali turėti įtakos bendrajai gyvūnų medžiagų apykaitai ir sutrikdyti, ypač darant davimo su maistu tyrimus, kasdienį veikimą bandomąja medžiaga. Jei pasirenkamas gyvūnų badavimas per naktį, klinikiniai biocheminiai nustatymai turi būti daromi po tyrimo funkcinių stebėjimų.

▼C1

Apskritai bandymą reikia daryti lanksčiai, atsižvelgiant į gyvūnų rūšį ir stebimus ar numatomus konkrečios medžiagos poveikius.

Jei istorinių pradinių duomenų nepakanka, reikia apsvarstyti, ar hematologinius ir klinikinius parametrus reikia nustatyti prieš pradedant dozavimą; paprastai prieš veikimą bandomąja medžiaga šių duomenų gauti nepatariama (7).

1.5.2.3. *Bendroji nekroskopija*

Visiems bandymui naudotiems gyvūnams turi būti daroma visiška ir išsami bendroji nekroskopija, kurią sudaro kruopštus kūno išorės paviršiaus, visų angų, kaukolės, krūtinės ir pilvo ertmių bei jų turinio tyrimas. Visų gyvūnų kepenys, inkstai, antinksčiai, sėklidės, antsėklidžiai, gimdos, kiaušidės, užkrūčio liaukos, blužnis, smegenys ir širdis (išskyrus nugaišusių ir (ar) numarintų bandymo metu) atskiriami nuo prilipusių audinių ir kuo greičiau sveriami švieži, kad neišdžiūtų.

Naudojant audiniui ir vėlesniam histopatologiniam tyrimui tinkamiausią fiksavimo terpę turi būti užkonservuojami šie audiniai: visi organai su makroskopiniais pakitimais, smegenys (tipiškos sritys, įskaitant didžiąsias smegenis, smegenėles ir kaulų čiulpus/-Varoli tiltą), stuburo smegenys (trijų lygių: kaklo, vidurinio krūtinės ir juosmens), hipofizė, skydliaukė, prieskydinė liauka, užkrūčio liauka, stemplė, seilių liaukos, skrandis, plonosios ir storosios žarnos (įskaitant Peyerio plokšteles), kepenys, kasa, inkstai, antinksčiai, blužnis, širdis, trachėja ir plaučiai (konservuojant pripučiami fiksavimo terpės ir vėliau panardinami), aorta, lytinės liaukos, gimda, pagalbiniai lyties organai, patelių pieno liaukos, prostata, šlapimo pūslė, tulžies pūslė (pelių), limfmazgiai (somatiniams poveikiams nustatyti geriau imti vieną limfmazgį dozės davimo kelyje, o kitą – toli nuo dozės patekimo kelio), periferiniai nervai (sėdmens ar blauzdikaulio) geriau prie pat raumens, kaulų čiulpų dalis (ir (ar) šviežiai išsiurbti kaulų čiulpai), oda ir akys (jei darant oftalmologinius tyrimus buvo pastebėti pakitimai). Klinikiniai ir kiti duomenys gali parodyti, jog būtina tirti papildomus audinius. Taip pat konservuojami visi organai, kurie pagal žinomas bandomosios medžiagos savybes gali būti jos paveikti.

1.5.2.4. *Histopatologiniai tyrimai*

Turi būti daromi išsamūs histopatologiniai kontrolinių ir didelės dozės grupių gyvūnų užkonservuotų organų ir audinių tyrimai. Jei didelės dozės grupėje pastebima su veikimu bandomąja medžiaga susijusių pokyčių, ištiriami visų kitų dozių grupių gyvūnai.

Turėtų būti ištirti visi makroskopiniai pakitimai.

Jei naudojama pagalbinė grupė, turi būti atliekamas tų audinių ir organų, kurie paveikti medžiagą gavusiose grupėse, histopatologinis tyrimas.

▼C1

2. **DUOMENYS IR ATASKAITA**

2.1. DUOMENYS

Turi būti pateikti kiekvieno gyvūno duomenys. Papildomai visi duomenys turi būti apibendrinami lentelėse, kiekvienai bandymo grupei nurodomas bandymo pradžioje turėtų gyvūnų skaičius, darant bandymą rastų nugaišusių ar dėl gyvūnų gerovės priežasčių numarintų gyvūnų skaičius ir kiekvienos žūties ar numarinimo dėl gyvūnų gerovės priežasčių laikas, gyvūnų su toksiškumo požymiais skaičius, stebimų toksiškumo požymių aprašymas, įskaitant kiekvieno toksinio poveikio atsiradimo momentą, trukmę ir sunkumą, gyvūnų su organų pakitimais skaičių, pakitimų tipą ir gyvūnų su kiekvieno tipo pakitimais procentinę dalį.

Jei tinka, skaitmeniniai rezultatai turi būti įvertinti atitinkamu ir plačiai taikomu statistiniu metodu. Statistiniai metodai ir analizei skirti duomenys turi būti pasirinkti planuojant bandymą.

2.2. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

2.2.1. **Bandomoji medžiaga:**

— fizinė būsena, grynumas ir fizikinės bei cheminės savybės,

— tapatumas,

— nešiklis (jei naudojamas): nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei nešiklis ne vanduo.

2.2.2. **Bandomieji gyvūnai:**

— naudota rūšis ir veislė,

— gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,

— šaltinis, laikymo sąlygos, maistas ir t. t.,

— kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje.

2.2.3. **Bandymo sąlygos:**

— dozės dydžio parinkimo pagrindimas,

— išsami informacija apie bandomosios medžiagos/preparato ruošimą, jo dėjimą į maistą, gautą koncentraciją, preparato stabilumą ir vienalytiškumą,

— išsami informacija apie bandomosios medžiagos davimo būdą,

— tikrosios dozės (mg/kg kūno masės/parai) ir bandomosios medžiagos koncentracijos maiste/geriamajame vandenyje (ppm) perskaičiavimo į tikrąją dozę faktorius, jei naudojamas,

— išsami informacija apie maisto ir vandens kokybę.

2.2.4. **Rezultatai:**

— kūno masė ir kūno masės pokyčiai,

— maisto ir vandens suvartojimas, jei aktualu,

— toksinio atsako duomenys pagal lytį ir dozę, įskaitant toksiškumo požymius,

▼C1

— atliekant klinikinius stebėjimus pastebėto poveikio pobūdis, sunkumas ir trukmė (grįžtamojo pobūdžio ar ne),

— oftalmologinio tyrimo rezultatai,

— jutiminio aktyvumo, grybšnio jėgos ir motorinio aktyvumo vertinimai (jei yra),

— hematologiniai bandymai su atitinkamomis pamatinėmis vertėmis,

— klinikiniai biocheminiai bandymai su atitinkamomis pamatinėmis vertėmis,

— kūno masė bandymo pabaigoje, organų masė ir organo/kūno masės santykis,

— nekroskopijos duomenys,

— išsamus visų histopatologinio tyrimo rezultatų aprašymas,

— absorbcijos duomenys, jei yra,

— statistinis rezultatų apdorojimas, jei daromas.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

3. **NUORODOS**

1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

2) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, p. 999–1003.

3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J.Toxicol. Environ. Health, 9, p. 691–704.

4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, p. 267–283.

5) Meyer O.A., Tilson h.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., I, p. 233–236.

6) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson h.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, p. 599–609.

7) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al*. (1996). Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and SAFEty Studies, Fundam. & Appl. Toxicol., 29, p. 198–201.

▼C1

B.27. **POŪMIS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ. 90 DIENŲ KARTOTINIŲ DOZIŲ TOKSIŠKUMO NE GRAUŽIKAMS BANDYMAS**

1. **METODAS**

Šis poūmio toksiškumo per virškinamąjį traktą bandymo metodas yra OECD TG 409 (1998) kopija.

1.1. ĮVADAS

Vertinant cheminių medžiagų toksines savybes, galima atlikti kartotinių dozių poūmio toksiškumo per virškinamąjį traktą bandymą, prieš tai gavus pradinę informaciją apie jos toksiškumą per ūmaus ar 28 parų kartotinės dozės toksiškumo bandymus. Per 90 parų bandymą gaunama informacijos apie galimus pavojus sveikatai, galinčius kilti po kartotinio veikimo ilgą laikotarpį, trunkantį nuo atjunkymo iki visiško subrendimo. Atlikus šį bandymą gaunama informacijos apie svarbesnius toksinius poveikius, paveiktus organus ir kaupimosi galimybę, taip pat duomenų apie nepastebėto neigiamo poveikio ribą (NOAEL), kuria galima pasinaudoti parenkant dozes lėtinio toksiškumo bandymui ir nustatant žmonių sąlyčio su konkrečia chemine medžiaga saugos kriterijus.

Bandymo metodas leidžia identifikuoti cheminių medžiagų veikimo neigiamus poveikius ne graužikų rūšims ir turi būti taikomas tik:

— jei kitais bandymais nustatyti poveikiai rodo, kad paaiškinimui/apibūdinimui reikalinga kita, ne graužikų rūšis, ar

— jei toksikokinetiniai tyrimai rodo, kad tinkamiausias laboratorinio gyvūno pasirinkimas yra tam tikra ne graužikų rūšis, ar

— jei kitos specifinės priežastys pateisina ne graužikų naudojimą.

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. APIBRĖŽTYS

Dozė – gyvūnui duotas bandomosios medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama bandomosios medžiagos mase bandomojo gyvūno masės vienetui (pvz., mg/kg), ar pastovia koncentracija maiste (ppm)..

Dozavimas – bendras terminas, apimantis dozės dydį, jos dažnį ir dozavimo trukmę.

NOAEL – termino „nepastebėto neigiamo poveikio riba“ (No observed adverse effect level) santrumpa, tai yra didžiausia dozė, kai nepastebimas neigiamas su veikimu chemine medžiaga susijęs poveikis.

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Kasdien kelioms bandomųjų gyvūnų grupėms per virškinamąjį traktą duodamos skirtingos bandomosios medžiagos dozės, vienai grupei 90 parų laikotarpiu duodama vieno dydžio dozė. Medžiagos davimo laikotarpiu atidžiai stebima, ar gyvūnams pasireiškia toksiškumo požymiai. Darant bandymą nugaišę ar numarinti gyvūnai skrodžiami, o baigus bandymą išlikę gyvūnai taip pat numarinami ir skrodžiami.

▼C1

1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.4.1. **Gyvūnų rūšies parinkimas**

Paprastai naudojama ne graužikų rūšis yra šuo, jis turi būti nustatytos veislės; dažnai naudojamas skalikas. Gali būti naudojami kiti gyvūnai, pvz., kiaulės, mažosios kiaulės. Primatai nerekomenduojami, tad jų naudojimas turi būti pagrįstas. Turi būti naudojami jauni ir sveiki gyvūnai. Jei naudojamas šuo, pradėti dozavimą geriau nuo 4–6 mėnesių ir ne vyresniam kaip devynių mėnesių amžiaus. Jei tai yra pradinis bandymas prieš ilgalaikį lėtinio toksiškumo bandymą, abiem bandymams turi būti naudojami tos pačios rūšies/veislės gyvūnai.

1.4.2. **Gyvūnų paruošimas**

Turi būti imami sveiki, laboratorijos sąlygomis aklimatizuoti ir kitiems bandymams dar nenaudoti gyvūnai. Aklimatizavimo trukmė priklauso nuo pasirinktų rūšių ir jų šaltinio. Šunims ar specialiai šiuo tikslu augintoms kiaulėms iš vietinės kolonijos rekomenduojama penkių parų aklimatizacija, o jei gyvūnai yra iš išorinių šaltinių – bent dviejų savaičių aklimatizacija. Aprašoma bandomųjų gyvūnų rūšis, veislė, šaltinis, lytis, masė ir (ar) amžius. Gyvūnai į kontrolines ir veikimo medžiaga grupes turi būti paskirstomi atsitiktinai. Narveliai turi būti išdėstomi taip, kad kuo mažiau pasireikštų pastatymo vietos įtaka. Kiekvienam gyvūnui turi būti paskirtas tik vienas identifikacijos numeris.

1.4.3. **Dozių paruošimas**

Bandomoji medžiaga duodama su maistu ar geriamuoju vandeniu, per zondą arba kapsulėmis. Dozės davimo būdas priklauso nuo bandymo tikslo ir bandomosios medžiagos fizikinių ir cheminių savybių.

Jei būtina, bandomajai medžiagai ištirpinti arba suspenduoti naudojamas atitinkamas nešiklis. Visų pirma rekomenduojamas vandeninis tirpalas arba suspensija, po jo pirmenybė teikiama aliejiniam tirpalui arba suspensijai (pvz., kukurūzų) ir tik po jų galimi kitų nešiklių tirpalai. Naudojamo kito nešiklio nei vanduo toksinės savybės turi būti žinomos. Turėtų būti nustatytas bandomosios medžiagos stabilumas nešiklyje.

1.5. BANDYMO EIGA

1.5.1. **Gyvūnų skaičius ir lytis**

Kiekvienai dozei turi būti naudojami bent aštuoni gyvūnai (keturios patelės ir keturi patinai). Jei planuojami tarpiniai skrodimai, gyvūnų skaičius turi būti padidintas tiek, kiek gyvūnų numatyta numarinti iki bandymo pabaigos. Baigus bandymą gyvūnų skaičius turi būti toks, kad būtų galima tinkamai įvertinti medžiagos toksinį poveikį. Remiantis ankstesnėmis žiniomis apie cheminę medžiagą ar labai panašių savybių medžiagą, galima būtų numatyti į kontrolinio bandymo ir į didžiausios dozės grupę papildomai įtraukti po pagalbinę aštuonių gyvūnų grupę (po keturis kiekvienos lyties), kurios pasibaigus veikimo medžiaga laikotarpiui būtų stebimos siekiant nustatyti, ar toksiniai poveikiai yra grįžtamieji, ar išliekamieji. Šio laikotarpio po veikimo medžiaga trukmė turėtų būti tinkamai nustatyta atsižvelgiant į stebimus poveikius.

▼C1

1.5.2. **Dozavimas**

Naudojamos bent trijų dydžių dozės ir viena lygiagreti kontrolė grupė, išskyrus atvejus, kai daromas ribinis bandymas (žr. 1.5.3). Dozių dydžiai gali būti pagrįsti kartotinių dozių ar diapazono nustatymo bandymų rezultatais, ir turi būti atsižvelgta į visus esamus toksikologinius ir toksikokinetinius duomenis apie bandomąjį junginį ar gimininga chemines medžiagas. Jei bandomosios medžiagos fizikinis ir cheminis pobūdis ar biologinis poveikis dozės neriboja, didžiausia dozė turi būti pasirinkta tokia, kad gyvūnui būtų sukeltas toksinis poveikis, bet jis nežūtų ar nepatirtų didelių kančių. Mažėjančių dozių seka turi būti pasirinkta taip, kad būtų pastebėtas bet koks dozės sukeltas atsakas, o esant mažiausiai dozei nebūtų pastebėta jokio neigiamo poveikio (NOAEL). Mažėjančios dozės turėtų būti du-keturis kartus viena už kitą mažesnės, ir dažnai vietoj didelių dozių intervalų (pvz., kai skirtumas tarp jų yra 6–10 kartų) geriau naudoti papildomą ketvirtą bandymų grupę.

Kontrolinę grupę sudaro neveikiamų gyvūnų grupė arba nešiklį gaunanti kontrolinė grupė, jei bandomajai medžiagai duoti naudojamas nešiklis. Išskyrus bandomosios medžiagos davimą, su kontrolinės grupės gyvūnais turi būti elgiamasi lygiai taip, kaip su bandymo grupių gyvūnais. Jei naudojamas nešiklis, kontrolinės grupės gyvūnai gauna didžiausią nešiklio tūrį. Jei bandomoji medžiaga duodama su maistu ir dėl to gyvūnai suvartoja mažiau maisto, gali būti naudinga turėti lygiagrečiai maitinamą kontrolinę grupę, kad būtų galima nustatyti, ar maisto vartojimo sumažėjimas yra dėl apetito stokos ar dėl toksikologinių pokyčių pagal bandymo modelį.

Reikėtų atkreipti dėmesį į šias nešiklio ir kitų priedų charakteristikas: poveikį bandomosios medžiagos absorbcijai, pasiskirstymui, metabolizmui ar sulaikymui; poveikį bandomosios medžiagos cheminėms savybėms, galintiems pakeisti jos toksiškumo charakteristikas; ir poveikį maisto ar vandens vartojimui ar gyvūnų mitybos būklei.

1.5.3. **Ribinis bandymas**

Jei, taikant šiam bandymui aprašytas metodikas, vienos dozės, atitinkančios bent 1 000 mg/kg kūno masės/parai, bandymas nesukelia jokio pastebimo neigiamo poveikio ir jei toksiškumas nenumatomas atsižvelgiant į struktūriškai gimininguų medžiagų duomenis, visas trijų lygių dozės bandymas gali būti laikomas nebūtinu. Toks ribinis bandymas netaikomas tais atvejais, kai atsižvelgiant į žmonių sąlytį su medžiaga reikia naudoti didesnio dydžio dozę.

1.5.4. **Dozių davimas**

Bandomosios medžiagos dozė 90 parų laikotarpiu gyvūnams duodama kasdien visas septynias dienas per savaitę. Bet kurį kitą režimą, pvz., penkių dienų per savaitę, reikia pagrįsti. Kai bandomoji medžiaga duodama per zondą, gyvūnams turėtų būti duodama tik viena dozė naudojant skrandžio zondą ar tinkamą intubacinį vamzdelį. Didžiausias gyvūnui duodamas vienkartinis skysčio tūris priklauso nuo bandymų gyvūno dydžio. Paprastai tūris turėtų būti kuo mažesnis. Išskyrus dirginančias ar ėsdinančias medžiagas, kurių didesnės koncentracijos paprastai sukelia dirginantį poveikį, tirpalo tūrio svyravimai turi būti kuo mažesni: koncentracija pakoreguojama taip, kad visų dozių tūris būtų toks pats.

▼C1

Jei medžiagos duodamos su maistu ar geriamuoju vandeniu, svarbu garantuoti, kad naudojami bandomosios medžiagos kiekiai netrikdytų normalaus mitybos režimo ar vandens balanso. Bandomąją medžiagą duodant su maistu, galima naudoti pastovią koncentraciją maiste (ppm) ar pastovią dozę pagal gyvūno kūno masę; naudota alternatyva turi būti nurodyta. Medžiagą įleidžiant per zondą ar duodant kapsulę, dozė turėtų būti duodama kasdien panašiu laiku ir prireikus pakoreguota pastoviam dozės lygiui pagal gyvūno kūno masę palaikyti. Jei 90 parų bandymas daromas kaip pradinis bandymas prieš ilgalaikį lėtinio toksiškumo bandymą, abiem bandymams turi būti naudojamas panašus maistas.

1.5.5. **Stebėjimai**

Stebėjimo trukmė turi būti ne mažesnė kaip 90 parų. Pagalbinės grupės gyvūnai, skirti paskesniems stebėjimams, atitinkamą laiką turi būti niekaip neveikiami, kad būtų galima konstatuoti toksinių poveikių išlikimą ar atsigavimą po jų.

Bendras klinikinis stebėjimas turi būti atliekamas bent kartą per dieną, geriau kasdien tuo pačiu laiku, atsižvelgiant į intensyviausią numatomo poveikio pasireiškimo laiką po medžiagos davimo. Turi būti registruojama gyvūnų klinikinė būsena. Bent du kartus per dieną, paprastai kiekvienos dienos ryte ir vakare, visi gyvūnai apžiūrimi siekiant nustatyti liguistumo ir gaištamumo požymius.

Bent vieną kartą prieš pirmąjį veikimą (kad būtų galima palyginti to paties gyvūno duomenis), ir po to kartą per savaitę visiems gyvūnams turi būti daromi išsamūs klinikiniai tyrimai. Šie tyrimai turi būti daromi ne pačiame gyvūno narvelyje, o geriau standartiškai įrengtoje vietoje ir kiekvieną kartą panašiu laiku. Turi būti imamasi priemonių, garantuojančių kuo mažesnį stebėjimo sąlygų kitimą. Toksiškumo požymiai turi būti kruopščiai registruojami, įskaitant jų pradžią, laipsnį ir trukmę. Stebėjimai turi apimti, jais neapsiribojant, odos, kailio, akių, gleivinių, sekrecijų ir ekskrecijų dažnį ir autonominį aktyvumą (pvz., ašarojimą, plaukų pašiaušimą, vyzdžių dydį, neįprastą kvėpavimą). Taip pat turi būti registruojami eisenos pokyčiai, laikysena ir reakcija į elgesį su gyvūnu (angl. *handling*), kloniniai ar toniniai judesiai, stereotipai (pvz., per dažnas kūno prisižiūrėjimas, nuolatinis sukimasis ratu) ar keistas elgesys.

Prieš pradedant duoti bandomąją medžiagą ir baigiant bandymą turi būti daromas, pageidautina visų, bet jei neįmanoma, tai bent didžiausios dozės ir kontrolinės grupių gyvūnų oftalmologinis tyrimas naudojant oftalmoskopą ar lygiavertę tinkamą įrangą. Jei nustatomi akių pakitimai, turi būti ištirti visi gyvūnai.

1.5.5.1. *Kūno masė ir maisto/vandens suvartojimas*

Visi gyvūnai turi būti sveriami bent kartą per savaitę. Suvartojamo maisto kiekis turi būti matuojamas bent kas savaitę. Jei bandomoji medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu, bent kas savaitę turi būti nustatomas ir suvartojamo vandens kiekis. Suvartojamo vandens kiekį rekomenduojama matuoti ir tuo atveju, kai bandomąją medžiagą duodant su maistu ar per zondą gali pakisti vandens suvartojimas.

▼C1

1.5.5.2. *Hematologiniai ir klinikiniai biocheminiai tyrimai*

Kraujo bandiniai turi būti imami iš nurodytos vietos ir prireikus laikomi atitinkamomis sąlygomis. Baigiantis bandymo laikotarpiui kraujas paimamas prieš pat gyvūnų numarinimą arba numarinimo metu.

Bandymo pradžioje, po to arba kas mėnesį, arba vieną kartą bandymo viduryje ir galiausiai bandymo pabaigoje turi būti daroma hematologinė analizė, įskaitant hemoglobino koncentraciją, eritrocitų skaičių, bendrą leukocitų skaičių ir leukocitų formulę, trombocitų skaičių ir kraujo krešėjimo gebos, pvz., krešėjimo laiko, protrombino laiko ar tromboplastino laiko, matavimą.

Klinikiniai biocheminiai matavimai tiriant pagrindinius toksinius poveikius audiniams, ypač inkstams bei kepenims, turi būti atliekami paėmus kraują prieš pat numarinant gyvūną ar numarinimo metu (išskyrus gaištančius ir (ar) numarintus darant bandymą) pradedant bandymą, po to arba kas mėnesį, arba vieną kartą bandymo viduryje ir galiausiai bandymo pabaigoje. Svarstytinos tyrimų sritys: elektrolitų pusiausvyra, angliavandenių apykaita ir kepenų bei inkstų funkcijos. Konkrečių tyrimų pasirinkimui įtakos turės bandomosios medžiagos veikimo būdų stebėjimas. Prieš kraujo ėmimą gyvūnai turi būti nemaitinami gyvūno rūšį atitinkantį laiką. Rekomenduojama nustatyti kalcį, fosforą, chloridus, natrį, kalį, badavimo gliukozę, alaninaminotransferazę, aspartataminotransferazę, ornitindekarboksilazę, gama glutamiltranspeptidazę, karbamido azotą, albuminą, kraujo kreatininą, bendrą bilirubiną ir bendrą serumo baltymų kiekį.

Šlapimą reikia tirti bent pradedant bandymą, per bandymo vidurį ir galiausiai bandymo pabaigoje analizuojant nustatytu laiku paimtus bandinius. Šlapimo analizė apima išvaizdą, tūrį, osmoliališkumą ar santykinį tankį, pH, baltymus, gliukozę ir kraują ar kraujo ląsteles. Galima naudoti papildomus parametrus, jei būtina išplėsti stebimo (-ų) poveikio (-ių) tyrimą.

Be to, svarstytini tyrimai bendrų audinių pakitimų žymekliams nustatyti. Kitos analizės, kurių gali prireikti norint tinkamai įvertinti medžiagos toksiškumą, apima lipidų, hormonų, rūgščių ir šarmų pusiausvyros, metemoglobino ir cholinesterazės inhibavimo analizę. Galima naudoti papildomus klinikinius biocheminius tyrimus, jei būtina išplėsti stebimų poveikių tyrimą. Šios analizės turi būti atliekamos tam tikrų klasių cheminių medžiagų atžvilgiu arba dėl jų atlikimo turi būti sprendžiama konkrečiu atveju.

Apskritai bandymą reikia daryti lanksčiai, atsižvelgiant į gyvūnų rūšį ir stebimus ar numatomus konkrečios medžiagos poveikius.

1.5.5.3. *Bendroji nekroskopija*

Visiems bandymui naudotiems gyvūnams daroma visiška ir išsami bendroji nekroskopija, kurią sudaro kruopštus kūno išorės paviršiaus, visų angų, kaukolės, krūtinės ir pilvo ertmių bei jų turinio tyrimas. Visų gyvūnų kepenys su tulžies pūsle, inkstai, antinksčiai, sėklidės, antsėklidžiai, kiaušidės, gimdos, skydliaukė (su prieskydine liauka), užkrūčio liaukos, blužnis, smegenys ir širdis (išskyrus nugaišusių ir (ar) numarintų bandymo metu) atskiriami nuo prilipusių audinių ir kuo greičiau sveriami švieži, kad neišdžiūtų.

▼C1

Naudojant audiniui ir vėlesniam histopatologiniam tyrimui tinkamiausią fiksavimo terpę, turi būti užkonservuojami šie audiniai: visi organai su makroskopiniais pakitimais, smegenys (tipiškos sritys, įskaitant didžiąsias smegenis, smegenėles ir kaulų čiulpus/-Varoli tiltą), stuburo smegenys (trijų lygių: kaklo, vidurinio krūtinės ir juosmens), hipofizis, akys, skydliaukė, prieskydine liauka, užkrūčio liauka, stemplė, seilių liaukos, skrandis, plonosios ir storosios žarnos (įskaitant Peyerio plokšteles), kepenys, tulžies pūslė, kasa, inkstai, antinksčiai, blužnis, širdis, trachėja ir plaučiai, aorta, lytinės liaukos, gimda, pagalbiniai lyties organai, patelių pieno liaukos, prostata, šlapimo pūslė, limfmazgiai (somatiniams poveikiams nustatyti geriau imti vieną limfmazgį dozės davimo kelyje, o kitą – toli nuo dozės davimo kelio), periferiniai nervai (sėdmens ar blauzdikaulio) geriau prie pat raumens, kaulų čiulpų dalis (ir (ar) šviežiai išsiurbti kaulų čiulpai) ir oda. Klinikiniai ir kiti duomenys gali parodyti, jog būtina tirti papildomus audinius. Taip pat konservuojami visi organai, kurie pagal žinomas bandomosios medžiagos savybes gali būti jos paveikti.

1.5.5.4. *Histopatologiniai tyrimai*

Turi būti daromi išsamūs histopatologiniai kontrolinių ir didelės dozės grupių gyvūnų užkonservuotų organų ir audinių tyrimai. Jei didelės dozės grupėje pastebima su veikimu bandomąja medžiaga susijusių pokyčių, ištiriami visų kitų dozių grupių gyvūnai.

Turėtų būti ištirti visi makroskopiniai pakitimai.

Jei naudojama pagalbinė grupė, turi būti atliekamas tų audinių ir organų, kurie paveikti medžiagą gavusiose grupėse, histopatologinis tyrimas.

2. DUOMENYS IR ATASKAITA

2.1. DUOMENYS

Turi būti pateikti kiekvieno gyvūno duomenys. Papildomai visi duomenys turi būti apibendrinami lentelėse, kiekvienai bandymo grupei nurodomas bandymo pradžioje turėtų gyvūnų skaičius, darant bandymą rastų nugaišusių ar dėl gyvūnų gerovės priežasčių numarintų gyvūnų skaičius ir kiekvienos žūties ar numarinimo dėl gyvūnų gerovės priežasčių laikas, gyvūnų su toksiškumo požymiais skaičius, stebimų toksiškumo požymių aprašymas, įskaitant kiekvieno toksiškumo poveikio atsiradimo momentą, trukmę ir sunkumą, gyvūnų su organų pakitimais skaičių, pakitimų tipą ir gyvūnų su kiekvieno tipo pakitimais procentinę dalį.

Jei tinka, skaitmeniniai rezultatai turi būti įvertinti atitinkamu ir plačiai taikomu statistiniu metodu. Statistiniai metodai ir analizei skirti duomenys turi būti pasirinkti planuojant bandymą.

2.2. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

▼C1

2.2.1. **Bandomoji medžiaga:**

— fizikinė būsena, grynumas ir fizikinės ir cheminės savybės,

— tapatumas,

— nešiklis (jei naudojamas): nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei nešiklis ne vanduo.

2.2.2. **Bandomieji gyvūnai:**

— naudota rūšis ir veislė,

— gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,

— šaltinis, laikymo sąlygos, maistas ir t. t.,

— kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje.

2.2.3. **Bandymo sąlygos:**

— dozės dydžio parinkimo pagrindimas,

— išsami informacija apie bandomosios medžiagos/preparato ruošimą, jo dėjimą į maistą, gautą koncentraciją, preparato stabilumą ir vienalytiškumą,

— išsami informacija apie bandomosios medžiagos davimo būdą,

— tikrosios dozės (mg/kg kūno masės/parai) ir bandomosios medžiagos koncentracijos maiste/geriamajame vandenyje (ppm) perskaičiavimo į tikrąją dozę faktorius, jei naudojamas,

— išsami informacija apie maisto ir vandens kokybę.

2.2.4. **Rezultatai:**

— kūno masė ir kūno masės pokyčiai,

— maisto ir vandens suvartojimas, jei aktualu,

— toksinio atsako duomenys pagal lytį ir dozę, įskaitant toksiškumo požymius,

— atliekant klinikinius stebėjimus pastebėto poveikio pobūdis, sunkumas ir trukmė (grįžtamojo pobūdžio ar ne),

— oftalmologinio tyrimo rezultatai,

— hematologiniai bandymai su atitinkamomis pamatinėmis vertėmis,

— klinikiniai biocheminiai bandymai su atitinkamomis pamatinėmis vertėmis,

— kūno masė numarinant, organų masė ir organo/kūno masės santykis,

— nekroskopijos duomenys,

— išsamus visų histopatologinio tyrimo rezultatų aprašymas,

— statistinis rezultatų apdorojimas, jei daromas.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

▼C1

B.28. **POŪMIS TOKSIŠKUMAS PER ODĄ. 90 DIENŲ KARTOTINIŲ DOZIŲ TOKSIŠKUMO GRAUŽIKAMS BANDYMAS**

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. APIBRĖŽTYS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandomoji medžiaga uždedama nustatytomis dozėmis ant keleto eksperimentinių grupių gyvūnų odos paviršiaus, vieną dozę duodant vienos grupės gyvūnams 90 dienų. Uždedant medžiagą, gyvūnai stebimi kiekvieną dieną tam, kad būtų nustatomi toksiškumo požymiai. Darant bandymą nugaišę ar numarinti gyvūnai skrodžiami, o baigus bandymą išlikę gyvūnai taip pat numarinami ir skrodžiami.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Pasiruošimas bandymui**

Prieš bandymą gyvūnai mažiausiai 5 dienas yra laikomi ir šeriami eksperimentinėmis sąlygomis. Prieš pradedant bandymą sveiki jauni gyvūnai atsitiktinai atrenkami ir suskirstomi į bandomąją bei kontrolinę grupes. Prieš pat bandymą nuo bandomųjų gyvūnų nugaros nukerpamas kailis. Kailį galima ir nuskusti, tačiau tai reikėtų atlikti likus vienai parai iki bandymo pradžios. Paprastai kartotinis nukirpimas ar nuskutimas atliekamas kas savaitę. Kai kailis kerpamas arba skutamas, reikia stengtis nesubraižyti odos. Bandomajai medžiagai uždėti turėtų būti nukerpama ne mažiau kaip 10 % kūno paviršiaus. Sprendžiant, nuo kokio dydžio ploto pašalinti kailį, turėtų būti atsižvelgiama į gyvūno kūno svorį, ir į apdangalo dydį. Tiriant kietąsias medžiagas, kurios prireikus gali būti sutrinamos į miltelius, jos sudrėkinamos vandeniu arba, jei būtina, kitu tinkamu nešikliu tam, kad būtų užtikrintas geras bandomosios medžiagos ir odos sąlytis. Skystosios bandomosios medžiagos paprastai naudojamos neskiestos. Medžiagos paprastai dedamos kasdien 5–7 kartus per savaitę.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

1.6.2.1. *Eksperimentiniai gyvūnai*

Gali būti naudojama suaugusi žiurkė, triušis ar jūrų kiaulytė. Gali būti naudojamos kitos rūšys, bet jų naudojimas turėtų būti pagrindžiamas.. Bandymo pradžioje naudojamų gyvūnų svorio intervalas turėtų būti ne daugiau kaip ± 20 % atitinkamo vidutinio svorio. Jei prieš ilgalaikį bandymą atliekamas pusiau ūmus odos bandymas, abiejų bandymų metu reikėtų naudoti tos pačios rūšies ar veislės gyvūnus.

▼C1

1.6.2.2. *Skaičius ir lytis*

Kiekvieno dydžio dozė bandoma su ne mažiau 10 gyvūnų (penkios patelės ir penki patinėliai), turinčių sveiką odą. Patelės turėtų būti neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos. Jeigu numatoma, kad bandymo eigoje dalį gyvūnų teks numarinti, pradinis jų skaičius atitinkamai padidinamas. Be to, papildomai 20 gyvūnų grupei (po dešimt kiekvienos lyties) galima skirti didelę medžiagos dozę 90 dienų ir 28 dienas po veikimo medžiaga stebėti toksinio poveikio grįžtamumą, pastovumą ar uždelstą pasireiškimą.

1.6.2.3. *Dozės*

Turėtų būti išbandomos mažiausiai 3 bandomosios medžiagos dozės, ir turi būti kontrolinė grupė arba nešiklio kontrolinė grupė, jei naudojamas nešiklis. Gyvūnai turi būti veikiami medžiaga bent 6 valandas per dieną. Bandomoji medžiaga turėt būti uždedama panašiu laiku kiekvieną dieną ir tam tikrais intervalais (kas savaitę arba kas dvi savaites) pakoreguojama taip, kad gyvūno kūno svorio atžvilgiu būtų išlaikoma pastovi dozė. Su kontrolinės grupės gyvūnais reikia elgtis lygiai taip pat kaip ir su bandomaisiais gyvūnais, išskyrus tai, kad jie negauna bandomosios medžiagos. Jei siekiant lengviau dozuoti medžiagą naudojamas nešiklis, kontrolinės grupės gyvūnai veikiami nešikliu taip pat kaip bandomieji gyvūnai; jie turi gauti tokį patį nešiklio kiekį, kokį gavo didžiausios dozės grupės gyvūnai. Didžiausia dozė turėtų būti tokia, kad sukeltų toksinį poveikį, bet nesukeltų gyvūnų žūties (arba tik nedidelį gaištamumą). Mažiausia dozė turėtų būti tokia, kad nebūtų pastebėta jokių toksiškumo požymių. Jeigu yra tinkamas poveikio žmogui įvertinimas, mažiausia dozė turėtų būti šiek tiek didesnė už poveikio žmogui dozę. Būtų geriausia, jeigu vidurinė dozė būtų tokia, kad sukeltų mažiausią pastebimą toksinį poveikį. Jeigu naudojama daugiau tarpinių dozių, jos turėtų būti išskirstomos taip, kad toksinis poveikis būtų laipsniškas. Mažų ir tarpinių dozių bei kontrolinėje grupėse gaištamumas turėtų būti nedidelis, kad būtų galima prasmingai įvertinti rezultatus.

Jeigu bandomoji medžiaga, kuria veikiama, ypač suerzina odą, tai reikėtų sumažinti jos koncentracijas ir šitai galbūt susilpnintų medžiagos, duodamos didele doze, sukeliamus toksinius poveikius arba šie visai išnyktų. Jei oda buvo ypač pažeista, tai reikia tučtuojau nutraukti bandymą ir pradėti naują, naudojant mažesnes bandomosios medžiagos koncentracijas.

1.6.3. **Ribinis bandymas**

Jeigu preliminarus bandymas naudojant 1 000 mg/kg dozę arba didesnę dozę, susijusią su tikėtinu žmogaus sąlyčiu su bandomąja medžiaga, jeigu toks žinomas, nesukelia aiškaus toksinio poveikio, tolimesnis bandymas nėra būtinas.

1.6.4. **Stebėjimų laikotarpis**

Bandomieji gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną, registruojant toksiškumo požymius. Reikia nurodyti nugaišimo bei toksiškumo požymių pasireiškimo ir išnykimo laiką.

▼C1

1.6.5. **Bandymo eiga**

Gyvūnai turėtų būti laikomi atskiruose narveliuose. Gyvūnai veikiami bandomąja medžiaga 90 dienų, geriausia – septynis kartus per savaitę.

Gyvūnai, esantys bet kurioje pagalbinėje grupėje ir skirti vėlesniems stebėjimams, turėtų būti laikomi dar 28 dienas, neveikiant jų medžiaga, kad būtų galima nustatyti, ar gyvūnai atsigauna po toksinio poveikio, ar jis išlieka. Veikimas medžiaga turėtų trukti šešias valandas per dieną.

Bandomoji medžiaga turėtų būti tvarkingai uždedama ant odos paviršiaus plotelio, sudarančio apie 10 % viso kūno paviršiaus ploto. Jei bandomos ypač toksiškos medžiagos, odos plotas, ant kurio dedama medžiaga, gali būti mažesnis, tačiau kuo daugiau jo reikia padengti kuo plonesniu ir vienodesniu medžiagos sluoksniu.

Veikimo metu bandomoji medžiaga turėtų liestis su oda akytu marlės tvarsčiu ir nedirginančia lipnia juostele. Bandomoji vieta turėtų būti papildomai tinkamai uždengta, kad marlės tvarstis ir bandomoji medžiaga laikytųsi bei būtų užtikrinama, kad gyvūnai nepraris bandomosios medžiagos. Gali būti naudojami ribotuvai, kad bandomoji medžiaga nebūtų praryjama, bet visiško imobilizavimo metodas nerekomenduojamas.

Veikimo pabaigoje nuo odos, ją plaunant vandeniu ar kokiu kitu atitinkamu valymo būdu, turėtų būt pašalintas bandomosios medžiagos likutis.

Visi gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną ir registruojami toksiškumo požymiai, įskaitant jų pasireiškimo pradžią, laipsnį bei trukmę. Stebint narveliuose laikomus gyvūnus, reikia registruoti odos ir kailio, akių ir gleivinės pasikeitimus, taip pat kvėpavimo, kraujo, autonominės ir centrinės nervų sistemų ir somatomotorinio aktyvumo ir elgsenos pasikeitimus. Kiekvieną savaitę reikėtų įvertinti pašaro suvartojimą bei pasverti gyvūnus. Reguliarus gyvūnų stebėjimas svarbus siekiant užtikrinti, jog bandymo metu nebūtų prarandama gyvūnų dėl tokių priežasčių kaip kanibalizmas, audinių autolizė ar narvo pastatymas netinkamoje vietoje. Pasibaigus bandymui visi likę gyvi bandomųjų grupių gyvūnai, nepriskirti pagalbinei grupei, numarinami ir skrodžiami. Kai pastebimi gaištantys gyvūnai, jie pašalinami iš bandymo ir skrodžiami.

Paprastai visi gyvūnai, įskaitant ir kontrolinės grupės gyvūnus, yra tiriami šitaip:

a) prieš pradedant duoti bandomąją medžiagą ir bandymo pabaigoje turi būti daromas, pageidautina visų, bet jei neįmanoma, tai bent didžiausios dozės ir kontrolinės grupių gyvūnų oftalmologinis tyrimas naudojant oftalmoskopą ar lygiavertę tinkamą įrangą. Jei nustatomi akių pakitimai, turi būti ištirti visi gyvūnai.

b) bandymo pabaigoje, reikėtų įvertinti tokius hematologinius rodiklius kaip hematokritas, hemoglobino koncentracija, eritrocitų skaičius, absoliutus bei skirtingų populiacijų leukocitų skaičius ir įvertinti krešėjimo potencialą, remiantis tokiais kriterijais, kaip krešėjimo trukme, protrombino ir tromboplastino susidarymo trukmė arba kraujo plokštelių (trombocitų) skaičius.

▼C1

c) bandymo pabaigoje reikėtų atlikti klinikinius biocheminius tyrimus. Atliekant šiuos tyrimus, reikėtų, jei reikalinga, nustatyti elektrolitų balansą, angliavandenių metabolizmą bei įvertinti kepenų ir inkstų veiklą. Parenkant specifinius tyrimus, reikėtų atsižvelgti į pastebėtus bandomosios medžiagos veikimo būdus. Siūloma nustatyti kalcį, fosforą, chlorą, natrį, kalį, badavimo metu susidarančią gliukozę (atsižvelgiant į konkrečiai gyvūnų rūšiai/veislei tinkamą badavimo laikotarpį), serumo glutamato piruvato transaminazę ([1]), serumo glutamato oksalacetato transaminazę ([2]), ornitino dekarboksilazę, gama glutamilo transpeptidazę, šlapale esantį azotą, albuminą, bendrą bilirubino, esančio kraujo kreatinine, kiekį bei atlikti serumo baltymų bendro kiekio nustatymą. Siekiant tinkamai įvertinti toksinį poveikį, gali reikėti atlikti lipidų, hormonų rūgščių/šarmų balanso, methemoglobino ir cholinesterazės aktyvumo tyrimus. Papildomi biocheminiai tyrimai gali būti atliekami tuo atveju, kai būtina išsamiau išnagrinėti nustatytus reiškinius.

d) šlapimo analizės paprastai atlikti nereikia, nebent ją reikia atlikti atsižvelgiant į numatomą ar pastebėtą toksinį poveikį.

Jeigu nėra tinkamų pamatinių anksčiau atliktų bandymų duomenų, prieš pradedant medžiagos dozavimą reikėtų apsvarstyti hematologinius ir klinikinius biocheminius parametrus.

1.6.6. **Bendroji nekroskopija**

Turėtų būti atlikta visapusiška bendra visų gyvūnų nekroskopija, kurios metu tiriamas kūno išorinis paviršius, visos angos, kiaušo, krūtinės ir pilvo ertmės bei jų turinys. Po nekroskopijos kuo skubiau (kad neišdžiūtų) pasveriamos dar drėgnos kepenys, inkstai, antinksčiai ir sėklidės. Galimiems vėlesniems histopatologiniams tyrimams turėtų būti tinkamoje terpėje išsaugomi tokie audiniai ir organai: visi esminiai pažeidimai, smegenys – įskaitant pailgųjų smegenų/smegenų tilto pjūvius, smegenėlių ir smegenų žievę, hipofizė, tiroidinė/paratiroidinė liauka, bet koks užkrūčio liaukos audinys, (trachėja), plaučiai, širdis, aorta, seilių liaukos, kepenys, blužnis, inkstai, antinksčiai, kasa, lytinės liaukos, gimda (pagalbiniai lytiniai organai), tulžies pūslė (jei yra), stemplė, skrandis, dvylikapirštė žarna, tuščioji žarna, klubinė žarna, akloji žarna, tiesioji žarna, riestoji žarna, šlapimo pūslė, pagrindinis (didysis) limfmazgis, (patelių pieno liauka), (šlaunies raumenynas), periferinis nervas, (akys), (krūtinkaulis su kaulų čiulpais), (šlaunikaulis, įskaitant ir segmentinį paviršių), (stuburo smegenys trimis lygiais – sprando, krūtinės ląstos ir juosmens) ir (ašarų liaukos). Audinius, paminėtus skliausteliuose, reikia tirti tik jei to reikia atsižvelgiant į nustatytą toksinį poveikį arba nustatytą toksinį poveikį konkrečiam organui.

1.6.7. **Histopatologinis tyrimas**

a) reikėtų visapusiškai histopatologiškai ištirti kontrolinės grupės ir tos grupės, kuriai duodama didelė medžiagos dozė, gyvūnų odą ir organus,

b) reikėtų ištirti visus pagrindinius pažeidimus,

([1]) Dabar žinoma kaip serumo alanino aminotransferazė.
([2]) Dabar žinoma kaip serumo aspartato aminotransferazė.

▼C1

c) reikėtų ištirti tuos kitas dozes gavusių gyvūnų organus, kurie paveikti medžiagos,

d) jei naudojamos žiurkės, reikėtų histopatologiniu aspektu ištirti gyvūnų, kurie veikiami mažomis ir tarpinėmis medžiagos dozėmis, plaučius siekiant įsitikinti, jog jie nėra užkrėsti, nes šituo remiantis nesunkiai galima įvertinti gyvūnų sveikatos būklę. Kitų histopatologinių tyrimų šių grupių gyvūnams atlikti nereikia, tačiau jei didelę dozę gavusių gyvūnų tam tikri organai yra paveikti, tuos pačius organus reikia ištirti ir šiose grupėse.

e) kai naudojama pagalbinė grupė, reikia atlikti audinių ir organų, kuriuose, tiriant kitas gyvūnų grupes, paveiktas bandomąja medžiaga, buvo pastebėti medžiagos sukelti poveikiai, histopatologinę analizę.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti pateikiami apibendrintai, pasitelkiant lenteles, kuriose nurodomas kiekvienos bandomosios grupės gyvūnų skaičius bandymo pradžioje, gyvūnų, kuriuose buvo pastebėti pažeidimai, skaičius, pažeidimų tipai bei gyvūnų, kuriuose pasireiškė kiekvieno tipo pažeidimai, skaičius, išreikštas procentais. Rezultatus reikėtų vertinti atitinkamu statistiniu metodu. Galima naudoti bet kokį visuotinai pripažintą statistinį metodą.

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Jei įmanoma, bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

— rūšis, veislė, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras,

— bandymo sąlygos,

— dozės dydžiai (įskaitant nešiklį, jei šis buvo naudojamas) ir koncentracijos,

— duomenys apie toksinį atsaką pagal tirtą lytį ir duotą dozę,

— jei įmanoma, dozės dydis, kuriam esant nepastebėta jokio neigiamo poveikio,

— nugaišimo laikas bandymo metu arba informacija, kad gyvūnai išgyveno iki bandymo pabaigos,

— toksinio ir kitokio poveikio apibūdinimas (ypač atkreipiant dėmesį į klinikinių tyrimų duomenis),

— kiekvienos anomalijos pastebėjimo laikas ir tolesnė eiga,

— duomenys apie pašarą bei kūno masę,

— oftalmologinių stebėjimų rezultatai,

— naudoti hematologiniai tyrimai ir jų metu gauti rezultatai,

— naudoti klinikinės biochemijos tyrimai ir jų metu gauti visi (įskaitant bet kurios šlapimo analizės) duomenys,

— nekroskopijos metu gauti duomenys,

▼C1

— visų histopatologinių tyrimų metu gautų duomenų išsamus apibūdinimas,

— rezultatų statistinė analizė, jei įmanoma,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų aiškinimas.

3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼M4

B.29. **PUSIAU LĖTINIS TOKSIŠKUMAS ĮKVĖPUS. 90 DIENŲ TYRIMAS**

SANTRAUKA

Šis atnaujintasis B.29 bandymo metodas parengtas tam, kad būtų galima išsamiai apibūdinti pusiau lėtinį bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą, pasireiškiantį 90 dienų laikotarpiu duodant dozę per kvėpavimo takus, ir gauti patikimų duomenų, reikalingų kiekybiniams inhaliacinės rizikos vertinimams. 10 patinų ir 10 patelių grupės 90 dienų (13 savaičių) laikotarpiu šešias valandas per parą veikiamos a) bandomąja chemine medžiaga, taikant tris arba daugiau koncentracijos lygių, b) išvalytu oru (neigiama kontrolė) ir (arba) c) nešikliu (nešiklio kontrolė). Paprastai gyvūnai veikiami penkias dienas per savaitę, tačiau galima taikyti ir septynių dienų per savaitę poveikį. Bandymai visada atliekami ir su patinais, ir su patelėmis, tačiau, jeigu žinoma, kad kurios nors lyties gyvūnai yra jautresni tam tikrai bandomajai cheminei medžiagai, patinams ir patelėms gali būti taikomi skirtingi koncentracijos lygiai. Šis metodas tyrimo vadovui suteikia lanksčią galimybę įtraukti pagalbines (grįžtamumo tyrimų) grupes, taikyti numarinimą nebaigus bandymo, bronchoalveolinį plovimą (BAP), atlikti neurologinius tyrimus ir papildomus klinikinius patologinius bei histopatologinius tyrimus, kad būtų galima geriau apibūdinti bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą.

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka OECD „Test Guideline“ 413 (OECD bandymo gairės Nr. 413) (2009). Originalios pusiau lėtinio toksiškumo įkvėpus bandymų gairės „Test Guideline“ 413 (TG 413) priimtos 1981 m. (1). Šis (B.29) bandymo metodas (lygiavertis atnaujintosioms TG 413 (2009)) atnaujintas siekiant jį suderinti su mokslo pasiekimais ir patenkinti dabartines ir būsimas reglamentavimo reikmes.

2. Pusiau lėtinio toksiškumo įkvėpus tyrimai pirmiausia atliekami siekiant nustatyti reglamentavimo tikslais taikytinas koncentracijas, skirtas įvertinti darbo aplinkoje darbuotojams gresiančią riziką. Be to, jie atliekami siekiant įvertinti žmonių gyvenamosiose vietose gresiančią riziką, transportavimo riziką ir aplinkosauginę riziką. Šis metodas suteikia galimybę apibūdinti neigiamą poveikį, sukeltą 90 dienų (apie 10 % žiurkės gyvenimo trukmės) kasdien per kvėpavimo takus duodant kartotinę bandomosios cheminės medžiagos dozę. Atlikus pusiau lėtinio toksiškumo įkvėpus tyrimus gauti duomenys gali būti naudojami atliekant kiekybinius rizikos vertinimus ir parenkant per lėtinio poveikio tyrimus taikytinas koncentracijas. Šis bandymo metodas nėra specialiai skirtas nanomedžiagų bandymams. Aprašant šį bandymo metodą vartojamos apibrėžtys pateiktos šio skyriaus pabaigoje ir rekomendaciniame dokumente (RD) Nr. 39 (2).

PIRMINIAI ASPEKTAI

3. Siekdama užtikrinti aukštesnę tyrimo kokybę ir kaip galima labiau sumažinti gyvūnų naudojimą, bandymų laboratorija, prieš atlikdama tyrimą, turėtų įvertinti visą turimą informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą. Pasirinkti tinkamas bandymų koncentracijas gali padėti informacija apie bandomosios cheminės medžiagos tapatumą, cheminę struktūrą, fizines ir chemines savybes, taip pat toksiškumo bandymų *in vitro* arba *in vivo* rezultatai, numatomas (-i) panaudojimo būdas (-ai) ir galimas poveikis žmogui, turimi (Q)SAR duomenys ir toksikologiniai duomenys apie panašios struktūros chemines medžiagas, taip pat duomenys, gauti atlikus kitus kartotinio poveikio tyrimus. Jeigu yra tikėtinas arba jeigu atliekant tyrimą pastebimas neurotoksinis poveikis, tyrimo vadovas gali nuspręsti įtraukti atitinkamus vertinimus, pvz., funkcinių stebėjimų rinkinį (FSR) ir judėjimo aktyvumo vertinimą. Nors gali būti labai svarbu užtikrinti tinkamą su konkrečiais tyrimais susijusių dozių davimo laiką, ši papildoma veikla neturėtų trukdyti įgyvendinti pagrindinio tyrimo planą.

▼M4

4. Ėsdinančių arba dirginančių bandomųjų cheminių medžiagų tirpalai gali būti bandomi taikant koncentracijas, kurioms esant pasiekiamas reikiamas toksiškumo lygis. Daugiau informacijos pateikta RD Nr. 39 (2). Tačiau veikiant gyvūnus šiomis medžiagomis taikytinos tikslinės koncentracijos turėtų būti gana mažos, kad nesukeltų ženklaus skausmo ir kančių, bet pakankamos, kad būtų galima pratęsti koncentracijos ir reakcijos tarpusavio priklausomybės kreivę iki tokių lygių, kuriems esant būtų pasiektas reglamentavimo arba mokslinis tikslas, kurio siekiama bandymu. Šios koncentracijos turėtų būti parenkamos atsižvelgiant į konkretų atvejį ir, pageidautina, remiantis tinkamai suplanuotu ribų nustatymo tyrimu, suteikiančiu informacijos apie pavojingas pasekmes, dirginimo ribinę vertę ir poveikio pasireiškimo laiką (žr. 11–13 skirsnius). Turėtų būti pateiktas koncentracijos pasirinkimo pagrindimas.

5. Gaištantys gyvūnai arba skausmą ar sunkias ilgalaikes kančias akivaizdžiai patiriantys gyvūnai turėtų būti humaniškai numarinami. Gaištantys gyvūnai laikomi atliekant bandymą nugaišusiais gyvūnais. Sprendimo numarinti gaištančius arba sunkiai kenčiančius gyvūnus priėmimo kriterijai ir numatomos arba neišvengiamos žūties nustatymo rekomendacijos yra pateikti OECD rekomendaciniame dokumente dėl pasekmių žmonėms (3).

METODO APRAŠYMAS

Gyvūnų rūšies parinkimas

6. Turėtų būti naudojami sveiki, jauni, bet suaugę plačiai naudojamų laboratorinių padermių graužikai. Tinkamiausia rūšis yra žiurkės. Jeigu naudojama kita rūšis, turėtų būti pateiktas jos naudojimo pagrindimas.

Gyvūnų paruošimas

7. Patelės turėtų būti dar be vados ir neapvaisintos. Atsitiktinės atrankos dieną gyvūnai turėtų būti jauni, bet suaugę, 7–9 savaičių amžiaus. Kūno masė pagal kiekvieną lytį turėtų ± 20 % tikslumu atitikti vidutinę tos lyties gyvūnų masę. Gyvūnai atrenkami atsitiktine tvarka, paženklinami, kad būtų įmanoma identifikuoti kiekvieną gyvūną, ir ne mažiau kaip penkias paras iki bandymo pradžios laikomi savo narveliuose, kad priprastų prie laboratorinių sąlygų.

Gyvūnų laikymas

8. Kad būtų patogiau stebėti ir kad būtų išvengta painiavos, kiekvienas gyvūnas turėtų būti išskirtinai paženklintas, pageidautina, naudojant poodinius atsakiklius. Bandomųjų gyvūnų laikymo patalpos temperatūra turėtų būti 22 ± 3 °C. Tinkamiausias santykinis drėgnis – 30–70 %, bet jis gali būti nepasiekiamas, jeigu naudojamas nešiklis yra vanduo. Prieš dozės davimą ir davus dozę gyvūnai turėtų būti laikomi narveliuose suskirstyti grupėmis pagal lytį ir koncentraciją; narvelyje laikomų gyvūnų skaičius turėtų būti toks, kad būtų galima aiškiai stebėti kiekvieną gyvūną ir kad būtų patiriama kuo mažiau žalos dėl kanibalizmo ir grumtynių. Jeigu dozė gyvūnams duodama tik per nosį, gali reikėti juos pripratinti prie uždaromųjų vamzdelių. Uždaromieji vamzdeliai gyvūnams neturėtų kelti didelės fizinės, terminės arba suvaržymo įtampos. Varžymas gali turėti fiziologinių pasekmių, pvz., turėti poveikio kūno temperatūrai (hipertermija) ir (arba) per minutę įkvepiamam tūriui. Jeigu yra bendrųjų duomenų, rodančių, kad tokių pastebimų pokyčių neįvyksta, pripratinimas prie uždaromųjų vamzdelių nebūtinas. Gyvūnai, kurių visas kūnas veikiamas aerozoliu, poveikio laikotarpiu turėtų būti laikomi atskirai, kad bandomasis aerozolis nebūtų filtruojamas per kitų narvelyje esančių gyvūnų kailį. Išskyrus poveikio laikotarpį, gyvūnams šerti tinka įprastas ir sertifikuotas laboratorijose naudojamas pašaras, duodant neribotą geriamo vandens kiekį. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, taikant 12 h šviesos ir 12 h tamsos seką.

▼M4

Inhaliacinės kameros

9. Parenkant inhaliacinę kamerą, turėtų būti atsižvelgiama į bandomosios cheminės medžiagos pobūdį ir bandymo tikslą. Pirmenybė teikiama dozės davimui tik per nosį (ši sąvoka apima sąvokas „tik per galvą“, „tik per nosį“ ir „tik per šnipą“). Pirmenybė dozės davimui tik per nosį paprastai teikiama tiriant skystųjų arba kietųjų dalelių aerozolius ir garus, kurie gali kondensuotis ir tapti aerozoliais. Specialieji tyrimo tikslai gali būti sėkmingiau pasiekti taikant poveikio per visą kūną metodą, tačiau tai turi būti pagrįsta tyrimo ataskaitoje. Siekiant užtikrinti atmosferos pastovumą naudojant poveikio per visą kūną kamerą, visa bandomųjų gyvūnų užimama erdvė turėtų neviršyti 5 % kameros tūrio. Poveikio tik per nosį ir poveikio per visą kūną metodų principai ir konkretūs šių metodų privalumai bei trūkumai aprašyti RD Nr. 39 (2).

TOKSIŠKUMO TYRIMAI

Ribinės koncentracijos

10. Kitaip nei ūmaus poveikio tyrimams, pusiau lėtinio toksiškumo įkvėpus tyrimams ribinių koncentracijų nenustatyta. Didžiausioji bandytina koncentracija turėtų būti nustatoma atsižvelgiant į šiuos dalykus: 1) didžiausiąją pasiekiamą koncentraciją, 2) „blogiausiu atveju“ taikytiną poveikio žmonėms lygį, 3) poreikį užtikrinti tinkamą deguonies tiekimą ir (arba) 4) gyvūnų gerovės aspektus. Jeigu nėra duomenimis pagrįstų ribų, gali būti taikomos Reglamente (EB) Nr. 1272/2008 (13) nustatytos ūmaus poveikio ribos (t. y. neviršijant 5 mg/l koncentracijos, jeigu tai aerozoliai, 20 mg/l, jeigu tai garai, ir 20 000 ppm, jeigu tai dujos); žr. RD Nr. 39 (2). Jeigu atliekant dujų arba labai lakių bandomųjų cheminių medžiagų (pvz., šaldymo medžiagų) bandymus būtina viršyti šias ribas, turi būti pateiktas pagrindimas. Ribinė koncentracija turėtų sukelti akivaizdų toksiškumą nesukeldama pernelyg didelio streso gyvūnams ir netrumpindama jų gyvenimo trukmės (3).

Ribų nustatymo tyrimas

11. Prieš pradedant pagrindinį tyrimą, dažniausiai gali reikėti atlikti ribų nustatymo tyrimą. Ribų nustatymo tyrimas yra išsamesnis už orientacinį tyrimą, nes jis susijęs ne tik su koncentracijų parinkimu. Per ribų nustatymo tyrimą gautos žinios gali padėti sėkmingai atlikti pagrindinį tyrimą. Pvz., ribų nustatymo tyrimas gali suteikti techninės informacijos apie analizės metodus, dalelių dydžius, toksinio poveikio mechanizmų nustatymą, klinikinės patologijos ir histopatologinių tyrimų duomenis ir apytikrius vertinimus, koks NNPL ir kokia didžiausioji leidžiama koncentracija (DLK) galėtų būti taikomi atliekant pagrindinį tyrimą. Tyrimo vadovas gali nuspręsti atlikti ribų nustatymo tyrimą, kad nustatytų kvėpavimo takų dirginimo ribinę vertę (pvz., atliekant histopatologinį kvėpavimo takų tyrimą, plaučių funkcijos tyrimus arba bronchoalveolinį plovimą), didžiausiąją koncentraciją, kuri būtų leidžiama kaip nesukelianti pernelyg didelio streso gyvūnams, ir parametrus, kuriais būtų geriausiai apibūdinamas bandomosios cheminės medžiagos toksiškumas.

12. Ribų nustatymo tyrimas gali būti atliekamas taikant vieną arba daugiau koncentracijos lygių. Atsižvelgiant į pasirinktas pasekmes, kiekvieną koncentracijos lygį atitinkanti dozė duodama šešiems patinams ir trims–šešioms patelėms. Ribų nustatymo tyrimas turėtų trukti ne mažiau kaip penkias dienas, bet paprastai – ne ilgiau kaip 28 dienas. Tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateiktas per pagrindinį tyrimą taikytinų koncentracijų parinkimo pagrindimas. Pagrindinio tyrimo tikslas – įrodyti koncentracijos ir reakcijos tarpusavio priklausomybę remiantis numanoma sunkiausia pasekme. Tinkamiausia mažiausioji koncentracija – nepastebimo neigiamo poveikio lygio koncentracija, didžiausioji – akivaizdų toksiškumą sukelianti koncentracija, nesukelianti pernelyg didelio streso gyvūnams ir netrumpinanti jų gyvenimo trukmės (3)

▼M4

13. Parenkant per ribų nustatymo tyrimą taikytinus koncentracijos lygius, turėtų būti atsižvelgiama į visą turimą informaciją, įskaitant struktūros ir savybių ryšius ir duomenis apie panašias chemines medžiagas (žr. 3 skirsnį). Ribų nustatymo tyrimu gali būti patikrintos ir (arba) atmestos pasekmės, kurios laikomos sunkiausiomis mechaniniu požiūriu vertinamomis pasekmėmis, pvz., cholinesterazės inhibavimas organiniais fosforo junginiais, methemoglobino susidarymas veikiant eritrocitotoksinėms medžiagoms, skydliaukės hormonų (T_3, T_4) reakcija į tirotoksines medžiagas, poveikis baltymams, laktatdehidrogenazei arba neutrofilams atliekant bronchoalveolinį plovimą, siekiant pašalinti nekenksmingas prastai tirpstančias daleles arba plaučius dirginančius aerozolius.

Pagrindinis tyrimas

14. Pagrindinis pusiau lėtinio toksiškumo tyrimas paprastai atliekamas taikant tris koncentracijos lygius ir prireikus taikant vienalaikę neigiamą kontrolę (naudojant orą) ir (arba) nešiklio kontrolę (žr. 18 skirsnį). Parenkant poveikio lygius turėtų būti pasitelkiami visi turimi duomenys, įskaitant sisteminio toksiškumo tyrimų rezultatus, metabolizmo ir kinetinių savybių duomenis (labai svarbu užtikrinti, kad nebūtų taikomos tokios didžiausiosios koncentracijos, kuriomis būtų įsotinti kinetiniai procesai). Kiekviena bandomoji grupė sudaroma iš dešimties graužikų patinų ir dešimties patelių, kurie 13 savaičių laikotarpiu (bendra tyrimo trukmė ne trumpesnė kaip 90 dienų) penkias dienas per savaitę šešias valandas per parą veikiami bandomąja chemine medžiaga. Gyvūnai gali būti veikiami ir septynias dienas per savaitę (pvz., tiriant įkvepiamus vaistus). Jeigu žinoma, kad kurios nors lyties gyvūnai yra jautresni konkrečiai bandomajai cheminei medžiagai, siekiant nustatyti kuo tikslesnę koncentracijos ir reakcijos tarpusavio priklausomybę, kaip aprašyta 15 skirsnyje, skirtingų lyčių gyvūnams gali būti taikomi skirtingi koncentracijos lygiai. Jeigu naudojant kitos rūšies graužikus nei žiurkės dozė duodama tik per nosį, ilgiausia poveikio trukmė gali būti pakoreguojama siekiant sumažinti tos rūšies gyvūnų patiriamą kančią. Jeigu taikomas trumpesnis nei šešių valandų per parą poveikis arba jeigu būtina atlikti ilgalaikio (pvz., 22 valandų per parą) poveikio per visą kūną tyrimą, turėtų būti pateiktas atitinkamas pagrindimas (žr. RD Nr. 39) (2). Poveikio metu gyvūnas neturėtų būti šeriamas, išskyrus atvejus, kai poveikio trukmė ilgesnė kaip šešios valandos. Vandens gali būti duodama per visą poveikio per visą kūną laikotarpį.

15. Turėtų būti nurodyta, kokiam organui (-ams) skirtos pasirinktos tikslinės koncentracijos, ir taikant šias koncentracijas turėtų būti užtikrinta aiški koncentracijos ir reakcijos tarpusavio priklausomybė:

— taikant didžiausiąją koncentraciją turėtų būti padarytas toksinis poveikis, tačiau neturėtų pasireikšti ilgalaikių požymių arba gyvūnai neturėtų nugaišti, nes tokiu atveju nebūtų galima atlikti prasmingo vertinimo,

— tarpinis (-iai) koncentracijos lygis (-iai) turėtų skirtis tiek, kad būtų galima nustatyti toksinio poveikio lygius tarp mažiausiosios ir didžiausiosios koncentracijos,

— taikant mažiausiąją koncentraciją neturėtų būti daroma toksinio poveikio ir neturėtų būti pastebima jo požymių.

Numarinimas nebaigus bandymo

16. Jeigu numatoma marinti gyvūnus nebaigus bandymo, kiekvienam poveikio lygiui naudotinas gyvūnų skaičius turėtų būti padidintas numatomu iki tyrimo pabaigos numarinti gyvūnų skaičiumi. Turėtų būti pateiktas marinimo nebaigus tyrimų taikymo pagrindimas; atliekant statistinę analizę, turėtų būti tinkamai atsižvelgiama į numarinamų gyvūnų skaičių.

▼M4

Pagalbinis (grįžtamumo) tyrimas

17. Siekiant nustatyti toksinio poveikio grįžtamumą, tvarumą arba delsą, reikiamos trukmės, bet ne ilgesniu kaip 14 dienų laikotarpiu po dozės davimo gali būti atliekamas pagalbinis (grįžtamumo) tyrimas. Pagalbinės (grįžtamumo) grupės sudaromos iš dešimties patinų ir dešimties patelių, kurie per pagrindinį tyrimą veikiami kartu su bandomaisiais gyvūnais. Pagalbinės (grįžtamumo) grupės turėtų būti veikiamos didžiausiąja bandomosios cheminės medžiagos koncentracija; prireikus turėtų būti taikoma vienalaikė kontrolė naudojant orą ir (arba) nešiklį (žr. 18 skirsnį).

Kontroliniai gyvūnai

18. Su vienalaikės neigiamos kontrolės (naudojant orą) gyvūnais turėtų būti elgiamasi taip pat, kaip su bandomosios grupės gyvūnais, išskyrus tai, kad jie veikiami išvalytu oru, o ne bandomąja chemine medžiaga. Jeigu siekiant palengvinti bandymo atmosferos sukūrimą naudojamas vanduo arba kita cheminė medžiaga, atliekant tyrimą naudojama nešiklio kontrolės grupė, o ne neigiamos kontrolės (naudojant orą) grupė. Jeigu įmanoma, kaip nešiklis turėtų būti naudojamas vanduo. Jeigu kaip nešiklis naudojamas vanduo, kontroliniai gyvūnai turėtų būti veikiami oru, kurio drėgnis turėtų būti toks pat, koks taikomas grupėms, kurioms duodama dozė. Tinkamas nešiklis turėtų būti parenkamas remiantis tinkamai atliktu išankstiniu tyrimu arba istoriniais duomenimis. Jeigu nešiklio toksiškumas nėra gerai žinomas, tyrimo vadovas gali nuspręsti taikyti ir neigiamą kontrolę (naudojant orą), ir nešiklio kontrolę, tačiau primygtinai rekomenduojama to nedaryti. Jeigu istoriniai duomenys rodo, kad nešiklis netoksiškas, neigiamos kontrolės (naudojant orą) grupės naudoti nebūtina, turėtų būti taikoma tik nešiklio kontrolė. Jeigu atlikus nešiklyje paruoštos bandomosios cheminės medžiagos išankstinį tyrimą nustatoma, kad medžiaga nėra toksiška, vadinasi, ir nešiklis, esant ištirtai koncentracijai, nėra toksiškas, todėl turėtų būti taikoma kontrolė naudojant šį nešiklį.

POVEIKIO SĄLYGOS

Koncentracijų taikymas

19. Gyvūnai veikiami bandomąja medžiaga dujų, garų, aerozolių arba jų mišinių pavidalu. Per tyrimą naudotina fizinė būsena priklauso nuo fizinių ir cheminių bandomosios cheminės medžiagos savybių, pasirinktų koncentracijų ir (arba) fizinio pavidalo, kuris veikiausiai bus tvarkant ir naudojant bandomąją cheminę medžiagą. Higroskopinės ir chemiškai reaguojančios bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti bandomos sauso oro sąlygomis. Turėtų būti imamasi atsargumo priemonių, kad būtų išvengta sprogių koncentracijų susidarymo. Iš dalelių sudarytos medžiagos gali būti apdorojamos mechaniškai, siekiant sumažinti dalelių dydį. Daugiau patarimų pateikta RD Nr. 39 (2).

Dalelių dydžio pasiskirstymas

20. Dalelių rūšiavimas pagal dydį turėtų būti taikomas visiems aerozoliams ir garams, kurie gali kondensuotis ir tapti aerozoliais. Kad poveikis būtų padarytas visoms svarbioms kvėpavimo takų sritims, rekomenduojama naudoti aerozolius, kurių masės medianinis aerodinaminis skersmuo (MMAS) yra 1–3 μm, o geometrinis standartinis nuokrypis (σ_g) – 1,5–3,0 (4). Nors turėtų būti imamasi pagrįstų priemonių, kad šio standarto būtų laikomasi, jeigu jo įgyvendinti neįmanoma, turėtų būti pateikta ekspertų nuomonė. Pvz., metalų garų dalelės bus mažesnės už šį standartą, o įelektrintų dalelių ir pluoštų – didesnės.

▼M4

Bandomosios cheminės medžiagos paruošimas nešiklyje

21. Geriausia, kad bandomoji cheminė medžiaga būtų bandoma nenaudojant nešiklio. Jeigu būtina naudoti nešiklį norint pasiekti reikiamą bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją ir užtikrinti reikiamą dalelių dydį, pirmenybė turėtų būti teikiama vandeniui. Visuomet, kai bandomoji cheminė medžiaga ištirpinama nešiklyje, turėtų būti įrodytas jos stabilumas.

POVEIKIO SĄLYGŲ STEBĖJIMAS

Oro srautas kameroje

22. Kiekvieno poveikio metu turėtų būti atidžiai reguliuojamas, nuolat stebimas ir ne rečiau kaip kartą per valandą registruojamas per poveikio kamerą tekantis oro srautas. Bandymo atmosferoje susidariusios koncentracijos (arba jos pastovumo laiko atžvilgiu) stebėjimas realiuoju laiku yra vienas iš visų dinaminių parametrų matavimų, suteikiantis galimybę netiesiogiai kontroliuoti visus svarbius dinaminius inhaliacinius parametrus. Jeigu koncentracija stebima tiesiogiai, oro srautų matavimo dažnumas gali būti sumažintas iki vieno matavimo kiekvieną dieną per kiekvieną poveikio seansą. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas tam, kad būtų išvengta pakartotinio įkvėpimo dozės davimo tik per nosį kamerose. Deguonies koncentracija turėtų būti ne mažesnė kaip 19 %, anglies dioksido – ne didesnė kaip 1 %. Jeigu yra pagrindo manyti, kad šio standarto įgyvendinti neįmanoma, turėtų būti matuojamos deguonies ir anglies dioksido koncentracijos. Jeigu pirmąją poveikio dieną atlikti matavimai rodo, kad šių dujų lygiai yra tinkami, daugiau matavimų atlikti nebūtina.

Kameros temperatūra ir santykinis drėgnis

23. Kameroje turėtų būti palaikoma 22 ± 3 °C temperatūra. Ir dozę duodant tik per nosį, ir per visą kūną, jeigu įmanoma, per kiekvieną poveikio seansą turėtų būti nuolat stebimas ir kas valandą registruojamas santykinis drėgnis gyvūnų kvėpavimo zonoje. Tinkamiausias santykinis drėgnis – 30–70 %, tačiau jis gali būti nepasiekiamas (pvz., bandant vandens pagrindo mišinius) arba neišmatuojamas dėl trukdžių, atsirandančių bandomajai cheminei medžiagai taikant bandymo metodą.

Bandomoji cheminė medžiaga. Vardinė koncentracija

24. Jeigu įmanoma, turėtų būti apskaičiuota ir užregistruota vardinė koncentracija poveikio kameroje. Vardinė koncentracija yra sukurtos bandomosios cheminės medžiagos masės ir viso oro srauto, perleisto per inhaliacinių kamerų sistemą, tūrio santykis. Vardinė koncentracija nėra naudojama apibūdinti poveikį gyvūnui, tačiau, vardinę koncentraciją palyginus su faktine, nustatomas generavimo, kurį užtikrina bandymų sistema, efektyvumas, kuriuo remiantis galima nustatyti generavimo problemas.

Bandomoji cheminė medžiaga. Faktinė koncentracija

25. Faktinė koncentracija yra bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, nustatyta paėmus ėminį iš inhaliacinėje kameroje esančios gyvūno kvėpavimo zonos. Faktines koncentracijas galima nustatyti specialiaisiais metodais (pvz., taikant tiesioginio ėminių ėmimo, adsorbcijos arba cheminių reakcijų metodus ir tada atliekant analizinį apibūdinimą) arba nespecialiaisiais metodais, pvz., atliekant gravimetrinę analizę naudojant filtrus. Gravimetrinė analizė gali būti taikoma tik vienos sudedamosios dalies miltelių aerozoliams arba mažo lakumo skystųjų dalelių aerozoliams ir turėtų būti grindžiama tinkamais prieš tyrimą atliktais bandomosios cheminės medžiagos savybių apibūdinimais. Iš daugiau kaip vienos sudedamosios dalies sudarytų miltelių

▼M4

aerozolių koncentracijos taip pat gali būti nustatomos atliekant gravimetrinę analizę. Tačiau tam reikalingi analitiniai duomenys, įrodantys, kad ore esančios medžiagos sudėtis panaši į pirminės medžiagos sudėtį. Jeigu tokios informacijos nėra, tyrimo metu gali reikėti vienodais intervalais atlikti pakartotinę bandomosios cheminės medžiagos (geriausia, kad ji būtų ore) analizę. Jeigu aerozolinės medžiagos gali garuoti arba sublimuoti, turėtų būti įrodyta, kad pasirinktu metodu surinktos visos fazės.

26. Jeigu įmanoma, per visą tyrimą turėtų būti naudojama viena bandomosios cheminės medžiagos partija, o bandomasis ėminys turėtų būti laikomas tokiomis sąlygomis, kad būtų išsaugotas jo grynumas, homogeniškumas ir stabilumas. Prieš pradedant tyrimą reikėtų apibūdinti bandomosios cheminės medžiagos savybes, įskaitant jos grynumą ir, jeigu tai techniškai įmanoma, tapatumą, taip pat nustatytų teršalų ir priemaišų kiekius. Be kitų duomenų, tai galima pagrįsti šiais duomenimis: sulaikymo trukme ir susijusia didžiausios koncentracijos sritimi, molekuline mase, nustatyta atlikus spektroskopinę arba dujų chromatografijos analizę, arba kitais įverčiais. Nors bandomojo ėminio tapatumo nustatymas nėra bandymų laboratorijos pareiga, bandymų laboratorijai gali būti naudinga patvirtinti bent kai kurias pateikėjo nurodytas savybes (pvz., spalvą, fizinę būseną ir t. t.).

27. Jeigu įmanoma, turėtų būti palaikoma pastovi poveikio atmosfera. Poveikio sąlygų pastovumui įrodyti gali būti naudojamas stebėjimo realiuoju laiku prietaisas, pvz., aerozoliams gali būti naudojamas aerozolių fotometras, garams – bendro angliavandenilių kiekio analizatorius. Faktinė kameroje susidariusi koncentracija turėtų būti matuojama kiekvieną poveikio dieną, ne mažiau kaip tris kartus pagal kiekvieną poveikio lygį. Jeigu tai neįmanoma dėl nedidelių oro srauto greičių arba mažų koncentracijų, gali būti imamas vienas ėminys per vieną poveikio laikotarpį. Būtų geriausia, kad tokiu atveju šis ėminys būtų imamas per visą poveikio laikotarpį. Atskiri kameroje susidariusios koncentracijos ėminiai neturėtų nukrypti nuo vidutinės kameroje susidariusios koncentracijos daugiau kaip ± 10 %, kai tiriamos dujos ir garai, arba daugiau kaip ± 20 %, kai tiriami skystųjų arba kietųjų dalelių aerozoliai. Turėtų būti apskaičiuotas ir ataskaitoje nurodytas pusiausvyros nusistovėjimo kameroje laikotarpis (t_{95}). Poveikio laikotarpis apima bandomosios cheminės medžiagos sukūrimo trukmę. Į šį laikotarpį įtraukiamas pusiausvyros nusistovėjimo kameroje laikotarpis (t_{95}) ir irimo laikas. t_{95} apskaičiavimo gairės pateiktos RD Nr. 39 (2).

28. Jeigu tiriami labai sudėtingi mišiniai, sudaryti iš dujų ir (arba) garų, ir aerozoliai (pvz., deginimo atmosferos ir bandomosios cheminės medžiagos, pučiamos iš specialiai varomų galutinio naudojimo produktų arba prietaisų), kiekvienos fazės veikimas inhaliacinėje kameroje gali būti skirtingas. Todėl iš kiekvienos fazės (dujų ir (arba) garų ir aerozolio) turėtų būti parinkta bent viena indikacinė cheminė medžiaga (analitė); paprastai šiuo tikslu pasirenkama pagrindinė veiklioji mišinio sudedamoji dalis. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga yra mišinys, turėtų būti nurodyta viso mišinio, o ne tik veikliosios sudedamosios dalies arba indikacinės cheminės medžiagos (analitės) analizinė koncentracija. Daugiau informacijos apie faktines koncentracijas pateikta RD Nr. 39 (2).

Bandomoji cheminė medžiaga. Dalelių dydžio pasiskirstymas

29. Aerozolių dalelių dydžio pasiskirstymas turėtų būti nustatomas bent kartą per savaitę pagal kiekvieną koncentracijos lygį, naudojant pakopinį ėmiklį arba alternatyvų prietaisą, pvz., aerodinaminį dalelių rūšiuotuvą (ADR). Jeigu galima įrodyti, kad pakopiniu ėmikliu ir alternatyviu prietaisu gaunami lygiaverčiai rezultatai, atliekant tyrimą gali būti naudojamas alternatyvus prietaisas.

▼M4

30. Siekiant įsitikinti pagrindinio prietaiso surenkamuoju veiksmingumu, kartu su pagrindiniu prietaisu turėtų būti naudojamas antrasis prietaisas, pvz., gravimetrinis filtras, gaudyklė arba barboteris. Atlikus dalelių dydžio analizę nustatyta masės koncentracija turėtų neviršyti priimtinų filtruojamosios analizės būdu nustatytos masės koncentracijos ribų [žr. RD Nr. 39 (2)]. Jeigu, taikant visas bandomas koncentracijas, lygiavertiškumą galima įrodyti pradiniame tyrimo etape, tolesnius patvirtinamuosius matavimus galima praleisti. Gyvūnų gerovės sumetimais turėtų būti imamasi priemonių, kad būtų kuo mažiau negalutinių duomenų, dėl kurių galėtų reikėti pakartoti tyrimą.

31. Garuose esančios dalelės turėtų būti rūšiuojamos tuo atveju, jeigu bent kiek tikėtina, kad susidarant aerozoliui gali kondensuotis garai, arba jeigu garų atmosferoje aptinkama dalelių, dėl kurių gali susidaryti mišrių fazių.

STEBĖJIMAI

32. Prieš poveikio laikotarpį, poveikio laikotarpiu ir pasibaigus poveikio laikotarpiui, turėtų būti atliekami klinikiniai gyvūnų stebėjimai. Atsižvelgiant į gyvūnų reakciją poveikio laikotarpiu, stebėjimus gali reikėti atlikti dažniau. Jeigu gyvūnų stebėjimą apsunkina gyvūnų uždaromųjų vamzdelių naudojimas, prastas poveikio per visą kūną kamerų apšvietimas arba neskaidrios atmosferos, gyvūnai turėtų būti atidžiai apžiūrimi po dozės davimo. Stebėjimais prieš kitos dienos poveikį galima įvertinti toksinio poveikio grįžtamumą arba pasunkėjimą.

33. Visi stebėjimai registruojami, išsaugant atskirus įrašus apie kiekvieną gyvūną. Kai gyvūnai numarinami dėl humaniškų priežasčių arba randami nugaišę, kiek įmanoma tiksliau užregistruojamas žūties laikas.

34. Narveliuose turėtų būti stebimi odos ir kailio, akių ir gleivinės, kvėpavimo ir kraujotakos sistemų, centrinės nervų sistemos, somatomotorinės veiklos ir elgsenos pakitimai. Ypač reikėtų stebėti, ar nepasireiškia drebulys, traukuliai, viduriavimas, mieguistumas, miego ir komos būsenos, ar neteka seilės. Matuojant temperatūrą tiesiojoje žarnoje, galima gauti patvirtinamųjų sulėtėjusio kvėpavimo arba nukritusios ar pakilusios temperatūros įrodymų, susijusių su dozės davimu arba izoliavimu. Į tyrimo protokolą gali būti įtraukti papildomi vertinimai, pvz., kinetikos, biomonitoringo, plaučių funkcijos, plaučių audinyje besikaupiančių mažo tirpumo medžiagų užsilaikymo ir elgsenos pokyčių.

KŪNO MASĖ

35. Kiekvieno gyvūno masė turėtų būti registruojama prieš pat pirmąjį poveikį (nulinę dieną), o vėliau – dukart per savaitę (pvz., pirmadieniais ir penktadieniais, siekiant įrodyti gyvūnų atsigavimą per savaitgalį, kai nedaroma poveikio, arba tokiais laiko intervalais, kad būtų galima įvertinti sisteminį toksiškumą) ir kai gyvūnas nugaišta arba yra numarinamas. Jeigu per pirmąsias dvi savaites nepasireiškia jokio poveikio, likusiu tyrimo laikotarpiu kūno masė gali būti matuojama kas savaitę. Pagalbiniai (grįžtamumo tyrimų) gyvūnai (jeigu naudojami) atsigavimo laikotarpiu turėtų būti ir toliau sveriami kas savaitę. Baigus tyrimą, visi gyvūnai turėtų būti pasverti netrukus po numarinimo, kad būtų galima tiksliai apskaičiuoti organų ir kūno masių santykius.

PAŠARŲ IR VANDENS SUVARTOJIMAS

36. Pašarų suvartojimas turėtų būti matuojamas kas savaitę. Gali būti matuojamas ir vandens suvartojimas.

▼M4

KLINIKINĖ PATOLOGIJA

37. Klinikinės patologijos vertinimai turėtų būti taikomi visiems gyvūnams, įskaitant kontrolinius ir pagalbinius (grįžtamumo tyrimų) gyvūnus, kai jie numarinami. Turėtų būti užregistruotas laikotarpis nuo poveikio pabaigos iki kraujo paėmimo, ypač jeigu tiriama pasekmė sparčiai nyksta. Ėminių ėmimas baigus duoti dozę būtinas pagal tuos parametrus, kuriems būdingas trumpas plazmos pusinės eliminacijos laikas (pvz., COHb, CHE ir MetHb).

38. 1 lentelėje nurodyti klinikinės patologijos parametrai, kurie paprastai privalomi atliekant visus toksikologinius tyrimus. Nereikalaujama visada atlikti šlapimo analizę, tačiau ji gali būti atliekama, jeigu manoma, kad tai būtų naudinga atsižvelgiant į numatomą arba nustatytą toksiškumą. Kad būtų geriau apibūdintas bandomosios cheminės medžiagos toksiškumas, tyrimo vadovas gali nuspręsti įvertinti papildomus parametrus (pvz., cholinesterazė, lipidai, hormonai, rūgščių ir bazių balansas, methemoglobinas arba Heinco kūneliai, kreatino kinazė, mieloidų ir eritroidų santykis, troponinai, arterinio kraujo dujos, laktato dehidrogenazė, sorbitolio dehidrogenazė, glutamato dehidrogenazė ir gamaglutamiltranspeptidazė.)

1 lentelė

Įprastiniai klinikinės patologijos parametrai

Hematologiniai tyrimai	
Eritrocitų kiekis	Bendras leukocitų kiekis
Hematokritas	Įvairių leukocitų kiekiai
Hemoglobino koncentracija	Trombocitų kiekis
Vidutinis hemoglobino kiekis eritrocituose	Krešėjimo aktyvumas (pasirinkti vieną rodiklį):
Vidutinis eritrocito tūris	— Protrombino laikas
Vidutinė eritrocitų hemoglobino koncentracija	— Krešėjimo laikas
Retikulocitai	— Dalinis tromboplastino laikas
Klinikinės chemijos tyrimai	
Gliukozė (*)	Alanino aminotransferazė
Bendras cholesterolio kiekis	Aspartato aminotransferazė
Trigliceridai	Šarminė fosfatazė
Kraujo šlapalo azoto kiekis	Kalis
Bendras bilirubino kiekis	Natris
Kreatininas	Kalcis
Bendras baltymų kiekis	Fosforas
Albuminas	Chloridas
Globulinas	
Šlapimo analizė (neprivaloma)	
Išvaizda (spalva ir drumstumas)	Bendras baltymų kiekis
Tūris	Gliukozė
Savitasis svoris arba osmosinis slėgis	Kraujas ir (arba) kraujo kūneliai
pH	

(*) Kadangi dėl ilgo nešėrimo laikotarpio gali atsirasti gliukozės kiekio matavimo skirtumų, lyginant gavusius dozę ir kontrolinius gyvūnus, tyrimo vadovas turėtų nustatyti, ar reikėtų nešerti gyvūnų. Jeigu taikomas nešėrimo laikotarpis, jis turėtų būti pritaikytas naudojamai rūšiai; žiurkėms turėtų būti taikomas 16 val. laikotarpis (nešėrimas per naktį). Gliukozės kiekis nešeriamų gyvūnų organizme gali būti nustatomas po nešėrimo per naktį paskutiniąją poveikio savaitę arba po nešėrimo per naktį prieš skrodimą (pastaruoju atveju – kartu su visais kitais patologijos parametrais).

▼M4

39. Jeigu yra įrodymų, kad pagrindinė kaupimosi ir užsilaikymo vieta yra apatiniai kvėpavimo takai (t. y. alveolės), tada, norint kiekybiškai išanalizuoti prielaidomis pagrįsto dozės poveikio parametrus, daugiausia dėmesio skiriant alveolitui, plaučių uždegimui ir fosfolipidozei, būtų galima rinktis bronchoalveolinio plovimo (BAP) metodą. Šis metodas suteikia galimybę tinkamai ištirti dozės ir reakcijos tarpusavio priklausomybę ir per tam tikrą laiką įvykusius alveolių pažeidimų pokyčius. BAP skystis gali būti analizuojamas siekiant nustatyti įvairių leukocitų kiekius, bendrą baltymų kiekį ir laktato dehidrogenazę. Kiti parametrai, į kuriuos būtų galima atsižvelgti, yra parametrai, rodantys lizosomų pažeidimus, fosfolipidozę, fibrozę ir dirginamąjį arba alerginį uždegimą, galbūt įtraukiant uždegimą sukeliančių citokinų ir (arba) chemokinų tyrimą. BAP matavimais paprastai papildomi histopatologinių tyrimų rezultatai, tačiau BAP matavimai negali atstoti šių tyrimų rezultatų. Plaučių plovimo gairės pateiktos RD Nr. 39 (2).

OFTALMOLOGINIS TYRIMAS

40. Naudojant oftalmoskopą arba lygiavertį įrenginį, prieš duodant bandomosios cheminės medžiagos dozę turėtų būti atliekami visų gyvūnų akies dugno, laužiamosios terpės, rainelės ir junginės oftalmologiniai tyrimai, o baigus duoti dozę – tokie pat didžiausiosios koncentracijos bei kontrolinės grupės tyrimai. Jeigu nustatoma akių pakitimų, turėtų būti tiriami ir visi kitų grupių, įskaitant pagalbinę (grįžtamumo tyrimų), gyvūnai.

BENDROJI PATOLOGIJA IR ORGANŲ MASĖ

41. Turėtų būti visiškai nuleidžiamas visų bandomųjų gyvūnų, įskaitant nugaišusius atliekant bandymą arba numarintus ir pašalintus iš tyrimo gyvūnų gerovės sumetimais, kraujas (jeigu įmanoma) ir atliekamas šių gyvūnų bendrasis skrodimas. Turėtų būti užregistruotas laikas nuo kiekvieno paskutinio dozės davimo kiekvienam gyvūnui iki jo numarinimo. Jeigu skrodimo negalima atlikti iš karto po to, kai aptinkamas nugaišęs gyvūnas, gyvūnas turėtų būti laikomas pakankamai šaltoje vietoje (bet neužšaldomas), siekiant kuo labiau pristabdyti autolizę. Skrodimai turėtų būti atliekamai kaip galima anksčiau, paprastai – per dieną arba dvi. Visi dideli patologiniai pakitimai turėtų būti užregistruojami pagal kiekvieną gyvūną, ypatingą dėmesį skiriant kvėpavimo takų pakitimams.

42. 2 lentelėje nurodyti organai ir audiniai, kurie turėtų būti užkonservuojami atliekant bendrąjį skrodimą, naudojant histopatologiniam tyrimui tinkamą fiksavimo terpę. Skliausteliuose ([…]) nurodyti organai ir audiniai, taip pat kai kurie kiti organai ir audiniai, dėl kurių konservavimo sprendžia tyrimo vadovas. **Paryškintuoju** šriftu nurodytieji organai turėtų būti nuvalyti ir pasverti kaip galima greičiau po atskyrimo, kol neišdžiuvo. Skydliaukė ir sėklidžių prielipai turėtų būti sveriami tik esant reikalui, nes valymo įrankiai gali pakenkti histopatologiniam tyrimui. Audiniai ir organai turėtų būti fiksuojami 10 % buferiniame formaline arba kitokiame tinkamame fiksatyve kaip galima greičiau po skrodimo, ne mažiau kaip 24–48 valandos iki valymo, atsižvelgiant į ketinamą naudoti fiksatyvą.

▼M4

2 lentelė

Atliekant bendrąjį skrodimą konservuojami organai ir audiniai

Antinksčiai	Stemplė
Aorta	[Uoslės receptoriai]
Kaulų čiulpai (ir (arba) šviežiai paruošta punkcija)	**Kiaušidės**
Smegenys (įskaitant didžiųjų smegenų, smegenėlių ir pailgųjų smegenų (smegenų tilto) išpjovas)	Kasa
Akloji žarna	Prieskydinės liaukos
Gaubtinė žarna	Periferinis nervas (sėdimasis arba blauzdikaulio, pageidautina, arti raumens)
Dvylikapirštė žarna	Hipofizė
[Sėklidžių prielipai]	Prostata
[Akys (tinklainė, regos nervas) ir akių vokai]	Tiesioji žarna
Šlaunikaulis ir kelio sąnarys	Seilių liaukos
Tulžies pūslė (jeigu yra)	Sėklinės pūslelės
[Harderio liaukos]	Oda
Širdis	Stuburo smegenys (sprando, krūtinės ląstos ir juosmens)
Klubinė žarna	**Blužnis**
Tuščioji žarna	Krūtinkaulis
Inkstai	Skrandis
[Ašarų liaukos (viršakiduobinės)]	Dantys
Gerklos (trys lygiai, įskaitant antgerklio pagrindą)	**Sėklidės**
Kepenys	**Užkrūčio liauka**
Plaučiai (visos vieno lygmens skiltys, įskaitant pagrindinius bronchus)	**Skydliaukės**
Limfmazgiai, imami iš plaučių vartų srities, ypač jeigu tiriamos mažo tirpumo kietųjų dalelių bandomosios cheminės medžiagos. Atliekant nuodugnesnius tyrimus, per kuriuos nagrinėjami imuniniai aspektai, gali būti imama daugiau mazgų, pvz., iš tarpuplaučio, kaklo, pažandžių ir (arba) ausų sričių.	[Liežuvis]
	Trachėja (ne mažiau kaip du lygiai, iš kurių vienas – išilginis keteros pjūvis, ir vienas – skersinis pjūvis
	[Šlapimtakis]
Limfmazgiai (labiausiai nutolę nuo infekcijos vartų)	[Šlaplė]
Pieno liauka (patelių)	Šlapimo pūslė
Raumuo (šlaunies)	**Gimda**
Nosiaryklės audiniai (ne mažiau keturių lygių; į vieną lygį įtraukiant nosiaryklės latakus ir nosies limfinius audinius (NLA))	Tiksliniai organai
	Visi labai pakitę audiniai ir jų masės

▼M4

43. Plaučiai turėtų būti išimami sveiki, pasveriami ir apdorojami tinkamu fiksatyvu užtikrinant 20–30 cm vandens sluoksnio slėgį, kad būtų išsaugota plaučių struktūra (5). Išpjovos turėtų būti imamos iš visų vieno lygmens skilčių, įskaitant pagrindinius bronchus, bet, jeigu atliekamas plaučių plovimas, neišplautos skiltys turėtų būti išpjaunamos trimis lygmenimis (ne iš eilės).

44. Tiriami ne mažiau kaip keturių lygių nosiaryklės audiniai; vienas iš jų turėtų būti nosinės ryklės angos audinys (5) (6) (7) (8) (9), kad būtų galima tinkamai ištirti ragėjantįjį, pereinamąjį (be blakstienėlių, kvėpuojamąjį), kvėpuojamąjį (su blakstienėlėmis, kvėpuojamąjį) ir uodžiamąjį epitelius bei limfodrenažinį audinį (NALT) (10) (11). Turėtų būti ištirti trys gerklų lygiai; vienas iš jų turėtų būti antgerklio pagrindas. Turėtų būti ištirti ne mažiau kaip du trachėjos lygiai; vienas iš jų turėtų būti išilginis pagrindinių bronchų išsišakojimo keteros pjūvis ir vienas – skersinis pjūvis.

HISTOPATOLOGINIS TYRIMAS

45. Turėtų būti atliktas visų 2 lentelėje nurodytų organų ir audinių histopatologinis tyrimas, apimantis kontrolinę ir didžiausiosios koncentracijos grupes, taip pat visus gyvūnus, kurie tyrimo metu nugaišo arba buvo numarinti. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas kvėpavimo takams, tiksliniams organams ir labai pakitusiems audiniams. Visose grupėse turėtų būti tiriami didžiausiosios koncentracijos grupės gyvūnų organai ir audiniai, dėl kurių nustatyta pakitimų. Norėdamas įrodyti aiškią reakciją į tam tikrą koncentraciją, tyrimo vadovas gali nuspręsti atlikti papildomų grupių histopatologinius tyrimus. Jeigu naudojama pagalbinė (grįžtamumo tyrimų) grupė, atliekant histopatologinį tyrimą turėtų būti tiriami visi audiniai ir organai, kuriems padarytas poveikis dozę gavusiose grupėse. Jeigu didžiausiosios koncentracijos grupėje nebaigus bandymo nugaišta labai daug gyvūnų ar kyla kitokių problemų, mažinančių duomenų reikšmingumą, turėtų būti atliktas kito pagal dydį (mažesnio) koncentracijos lygio histopatologinis tyrimas. Reikėtų mėginti rasti sąsajų tarp bendrųjų stebėjimų ir mikroskopinės analizės rezultatų.

DUOMENYS IR ATASKAITOS

Duomenys

46. Turėtų būti pateikti kiekvieno gyvūno kūno masės, pašarų suvartojimo, klinikinės patologijos tyrimų, organų masės ir histopatologinių tyrimų duomenys. Klinikinių stebėjimų duomenys turėtų būti apibendrinti lentelėse, pagal kiekvieną bandomąją grupę nurodant naudotų gyvūnų skaičių, gyvūnų, kuriems pasireiškė toksiškumo požymių, skaičių, atliekant bandymą nugaišusių arba dėl humaniškų priežasčių numarintų gyvūnų skaičių, kiekvieno gyvūno žūties laiką, taip pat pateikiant toksinio poveikio aprašymą, pasireiškimo laiką ir grįžtamumą, skrodimo išvadas. Visi rezultatai – kiekybiniai ir papildomi – turėtų būti įvertinti taikant tinkamą statistinį metodą. Gali būti taikomas bet kuris visuotinai pripažintas statistinis metodas; statistiniai metodai turėtų būti parenkami planuojant tyrimą.

Bandymo ataskaita

47. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikta tokia informacija (jeigu taikytina):

Bandomieji gyvūnai ir jų laikymas

— Laikymo sąlygų aprašymas, nurodant gyvūnų skaičių narvelyje (arba skaičiaus pokytį), kraiko medžiagą, aplinkos temperatūrą ir santykinį drėgnį, šviesos ir tamsos kaitą paros metu ir šėrimo režimą.

▼M4

— Naudota rūšis (padermė) ir, jeigu tai ne žiurkės, kitos rūšies naudojimo pagrindimas. Gali būti pateikti pirminiai ir istoriniai duomenys, jeigu jie susiję su gyvūnais, kuriems buvo taikomos panašios poveikio, laikymo ir nešėrimo sąlygos.

— Gyvūnų skaičius, amžius ir lytis.

— Atsitiktinės atrankos metodas.

— Prieš bandymą sudarytų sąlygų aprašymas, nurodant šėrimo režimą, izoliavimo ir apsaugos nuo ligų būdą.

Bandomoji cheminė medžiaga

— Fizinė būsena, grynumas ir, jeigu taikytina, fizinės ir cheminės savybės (įskaitant izomeriją).

— Identifikavimo duomenys ir Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos (angl. CAS) registracijos numeris, jeigu jis žinomas.

Nešiklis

— Nešiklio naudojimo pagrindimas ir nešiklio parinkimo pagrindimas (jeigu tai ne vanduo).

— Istoriniai arba vienalaikiai duomenys, įrodantys, kad nešiklis nedaro neigiamo poveikio tyrimo rezultatams.

Inhaliacinė kamera

— Išsamus inhaliacinės kameros aprašas, nurodant tūrį ir pateikiant diagramą.

— Įrangos, naudotos darant poveikį gyvūnams ir kuriant atmosferą, šaltinis ir aprašas.

— Temperatūros, drėgnio, dalelių dydžio ir faktinės koncentracijos matavimo įranga.

— Oro šaltinis ir kondicionavimo sistema.

— Įrangos kalibravimo siekiant užtikrinti homogenišką bandymo atmosferą metodai.

— Slėgių skirtumas (teigiamas ar neigiamas).

— Kameroje esančios dozės davimo angos (jeigu dozė duodama tik per nosį); gyvūnų vieta kameroje (jeigu dozė duodama per visą kūną).

— Bandymo atmosferos pastovumas.

— Temperatūros ir drėgnio jutiklių vieta ir kameroje sukurtos bandymo atmosferos ėminių ėmimas.

— Tiekiamo ir (arba) ištraukiamo oro apdorojimas.

— Oro srauto greičiai, per dozės davimo angą tekančio oro srauto greitis (jeigu dozė duodama tik per nosį) arba gyvūnų kiekis kameroje (jeigu dozė duodama per visą kūną).

— Inhaliacinės kameros pusiausvyros pasiekimo laikas (t_{95}).

— Tūrio pokyčių kiekis per valandą.

— Matavimo prietaisai (jeigu naudojami).

Poveikio duomenys

— Tikslinės koncentracijos parinkimo pagrindiniam tyrimui pagrindimas.

▼M4

— Vardinės koncentracijos (inhaliacinėje kameroje sukurtos bandomosios cheminės medžiagos bendrosios masės ir viso per kamerą perleisto oro srauto tūrio santykis).

— Faktinės bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, nustatytos gyvūnų kvėpavimo zonoje; jeigu bandomi mišiniai, įgaunantys įvairias fizines būsenas (dujos, garai, aerozoliai), kiekviena iš šių būsenų gali būti analizuojama atskirai.

— Visos koncentracijos ore turėtų būtų nurodomos masės vienetais (pvz., mg/l, mg/m^3 ir t. t.), o ne tūrio vienetais (pvz., ppm, ppb ir t. t.).

— Dalelių dydžio pasiskirstymas, masės medianinis aerodinaminis skersmuo (MMAS) ir geometrinis standartinis nuokrypis (σ_g), nurodant jų apskaičiavimo metodus. Turėtų būti pateiktos atliktos atskiros dalelių dydžio analizės.

Bandymo sąlygos

— Išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos paruošimą, nurodant procedūras, taikytas siekiant sumažinti kietųjų medžiagų dalelių dydį arba paruošti bandomosios cheminės medžiagos tirpalus.

— Įrangos, naudotos kuriant bandymo atmosferą ir veikiant gyvūnus bandymo atmosfera, aprašas (pageidautina, pateikiant diagramą).

— Išsami informacija apie įrangą, naudotą stebėti kameros temperatūrą, drėgnį ir oro srautą kameroje (t. y. kalibravimo kreivės nubrėžimas).

— Išsami informacija apie įrangą, naudotą imti ėminius, skirtus nustatyti kameroje susidariusią koncentraciją ir dalelių dydžio pasiskirstymą.

— Išsami informacija apie taikytą cheminės analizės metodą ir metodo tinkamumo patvirtinimą (nurodant bandomosios cheminės medžiagos regeneravimo iš ėminių ėmimo terpės veiksmingumą).

— Atsitiktinės atrankos, taikytos suskirstant gyvūnus į bandomąją ir kontrolinę grupes, metodas.

— Išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę (nurodant pašaro tipą ir (arba) šaltinį, vandens šaltinį).

— Bandomųjų koncentracijų parinkimo pagrindimas.

Rezultatai

— Kameros temperatūrų, drėgnio ir oro srautų lentelės.

— Kameros vardinės ir faktinės koncentracijos duomenų lentelės.

— Dalelių dydžių lentelės, pateikiant analizinių ėminių ėmimo duomenis, dalelių dydžių pasiskirstymą ir MMAS bei σ_g skaičiavimus.

— Kiekvieno gyvūno reakcijos duomenų ir koncentracijos lygio lentelės (t. y. gyvūnų, kuriems pasireiškė toksiškumo požymių, įskaitant gaištamumą, poveikio pobūdį, sunkumą, pasireiškimo laiką ir trukmę).

▼M4

— Kiekvieno gyvūno masės lentelės.

— Pašaro suvartojimo lentelės.

— Klinikinės patologijos duomenų lentelės.

— Kiekvieno gyvūno skrodimo išvados ir histopatologinių tyrimų rezultatai, jeigu yra.

Rezultatų aptarimas ir aiškinimas

— Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas metodų, taikytų siekiant laikytis šio bandymo metodo kriterijų, pvz., susijusių su ribine koncentracija arba dalelių dydžiu, aprašymui.

— Atsižvelgiant į bendruosius rezultatus, turėtų būti aprašyta dalelių įkvėpimo galimybė, ypač jeigu nebuvo įmanoma taikyti dalelių dydžio kriterijaus.

— Pateikiant bendrąjį tyrimo vertinimą, turėtų būti nurodytas metodų, taikytų nustatyti vardines ir faktines koncentracijas, nuoseklumas ir faktinės koncentracijos santykis su vardine koncentracija.

— Turėtų būti aprašyta tikėtina žūties priežastis ir vyraujantis veikimo būdas (sisteminis ar vietinis).

— Atsižvelgiant į OECD rekomendaciniame dokumente dėl pasekmių žmonėms (3) nustatytus kriterijus, turėtų būti pateiktas paaiškinimas, ar kilo poreikis humaniškai numarinti gyvūnus, patiriančius skausmą arba sunkią ilgalaikę kančią.

— Turėtų būti nurodytas (-i) tikslinis (-iai) organas (-ai).

— Turėtų būti apibrėžti nepastebimo neigiamo poveikio lygis (NNPL) ir mažiausio pastebimo neigiamo poveikio lygis (MPNPL).

LITERATŪRA

1. OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.

2. OECD (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing,* Environmental Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

3. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in SAFEty Evaluation, Environmental Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

4. Whalan.E and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

5. Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material,* Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229–258.

6. Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309–312.

7. Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231–238.

▼**M4**

8. Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215–263.

9. Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353–372.

10. Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219–224.

11. Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140–141: 281–285.

12. Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419–428.

13. 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353, 2008 12 31, p. 1.

▼**M4**

1 priedėlis

APIBRĖŽTIS

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

▼M4

B.30. LĖTINIO TOKSIŠKUMO TYRIMAI

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka OECD „Test Guideline“ (TG) 452 (OECD bandymo gairės Nr. 452) (2009). Originalios bandymo gairės TG 452 priimtos 1981 m. Šis atnaujintasis B.30 bandymo metodas parengtas atsižvelgiant į poreikį įvertinti naujausius pasiekimus gyvūnų gerovės srityje ir norminių reikalavimų pasikeitimus (1) (2) (3) (4). B.30 bandymo metodas buvo atnaujinamas kartu su šio priedo B.32 skyriumi „Kancerogeniškumo tyrimai“ ir šio priedo B.33 skyriumi „Jungtiniai lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimai“, siekiant gauti papildomos informacijos remiantis per tyrimą naudotais gyvūnais ir pateikti išsamesnių rekomendacijų dėl dozės parinkimo. Šis bandymo metodas skirtas taikyti bandant labai įvairias chemines medžiagas, įskaitant pesticidus ir pramonines chemines medžiagas.

2. Daugelis lėtinio toksiškumo tyrimų atliekami naudojant graužikų rūšis, todėl šis metodas pirmiausia taikytinas tyrimams, atliekamiems naudojant šias rūšis. Jeigu tokius tyrimus reikėtų atlikti naudojant ne graužikų rūšis, jiems taip pat gali būti taikomi aprašant šį bandymo metodą ir šio priedo B.27 skyriuje „90 dienų kartotinės dozės toksiškumo per virškinamąjį traktą ne graužikams tyrimas“ (5) išdėstyti principai ir procedūros su atitinkamais pakeitimais, kaip aprašyta OECD rekomendaciniame dokumente Nr. 116 dėl lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimų planavimo ir atlikimo.

3. Atliekant lėtinio toksiškumo tyrimus, dozė paprastai gali būti duodama trimis būdais – per burną, per odą ir per kvėpavimo takus. Dozės davimo būdas parenkamas atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos fizines ir chemines savybes ir labiausiai paplitusį poveikio žmonėms būdą. Daugiau informacijos apie poveikio būdo parinkimą pateikta OECD rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (6).

4. Šis bandymo metodas iš esmės skirtas poveikio per virškinamąjį traktą būdui, nes šis būdas dažniausiai taikomas atliekant lėtinio toksiškumo tyrimus. Norint įvertinti žmonių sveikatai gresiančią riziką ir (arba) laikantis tam tikros reglamentavimo tvarkos gali reikėti atlikti ilgalaikio lėtinio toksiškumo tyrimus, per kuriuos dozė būtų duodama per odą ir kvėpavimo takus, tačiau techniniu požiūriu abu poveikio būdai yra gana sudėtingi. Šie tyrimai turės būti planuojami atsižvelgiant į konkretų atvejį, tačiau čia aprašytu bandymo metodu, skirtu įvertinti lėtinį toksiškumą, kai dozė duodama per burną, gali būti remiamasi rengiant inhaliacinių ir (arba) odinių tyrimų protokolą, atsižvelgiant į rekomendacijas dėl poveikio laikotarpių, klinikinių ir patologinių parametrų ir t. t. Yra parengtos OECD rekomendacijos dėl bandomųjų cheminių medžiagų dozių davimo per kvėpavimo takus (6) (7) ir per odą (6). Planuojant ilgesnius tyrimus, per kuriuos dozės duodamos per kvėpavimo takus, pirmiausia turėtų būti remiamasi šio priedo B.8 skyriumi (8) ir šio priedo B.29 skyriumi (9), taip pat OECD rekomendaciniu dokumentu dėl ūmaus poveikio įkvėpus bandymų (7). Jeigu bandymai atliekami taikant poveikio per odą būdą, turėtų būti remiamasi šio priedo B.9 skyriumi (10).

▼M4

5. Atliekant lėtinio toksiškumo tyrimą gaunama informacijos apie galimus pavojus sveikatai, galinčius kilti dėl kartotinio poveikio gana ilgu naudojamos rūšies gyvūnų gyvenimo laikotarpiu. Tyrimas suteikia informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos toksinį poveikį, padeda nustatyti tikslinius organus ir kaupimosi galimybę. Be to, jis gali padėti apytiksliai nustatyti nepastebimo neigiamo poveikio lygį, kuris gali būti naudojamas nustatant saugaus poveikio žmonėms kriterijus. Taip pat pabrėžiamas gyvūnų kruopščių klinikinių stebėjimų būtinumas, kad būtų gauta kuo daugiau informacijos.

6. Pagal šį bandymo metodą atliekamų tyrimų tikslai:

— bandomosios cheminės medžiagos lėtinio toksiškumo nustatymas,

— tikslinių organų nustatymas,

— dozės ir reakcijos tarpusavio priklausomybės apibūdinimas,

— nepastebimo neigiamo poveikio lygio (NNPL) arba orientacinės dozės (OD) nustatymo pagrindo nustatymas,

— žmonėms taikomų poveikio lygių lėtinio toksinio poveikio prognozavimas,

— duomenų teikimas rengiant bandymų hipotezes dėl veikimo būdo (6).

PIRMINIAI ASPEKTAI

7. Vertindama bandomosios cheminės medžiagos toksines savybes, bandymų laboratorija, prieš atlikdama tyrimą, turėtų apsvarstyti visą turimą informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą, kad planuojant tyrimą pirmiausia būtų siekiama padidinti lėtinio toksiškumo tyrimo veiksmingumą ir sumažinti gyvūnų naudojimą. Parengti tyrimo planą padės informacija apie bandomosios cheminės medžiagos tapatumą, cheminę struktūrą, fizines ir chemines savybes, veikimo būdą, taip pat toksiškumo bandymų *in vitro* arba *in vivo* rezultatai, numatomas (-i) panaudojimo būdas (-ai) ir galimas poveikis žmogui, turimi (Q)SAR duomenys ir toksikologiniai duomenys apie panašios struktūros chemines medžiagas, turimi toksikokinetiniai duomenys (vienos dozės ir, jeigu yra, kartotinės dozės kinetinės savybės) ir duomenys, gauti atlikus kitus kartotinio poveikio tyrimus. Lėtinis toksiškumas turėtų būti nustatomas tik gavus pirminės informacijos apie toksiškumą, pagrįstos 28 dienų ir (arba) 90 dienų kartotinės dozės toksiškumo bandymais. Atliekant bendrąjį konkrečios bandomosios cheminės medžiagos galimo neigiamo poveikio sveikatai vertinimą, turėtų būti apsvarstyta galimybė taikyti etapinį lėtinio toksiškumo bandymo metodą (11) (12) (13) (14).

8. Prieš pradedant tyrimą, atsižvelgiant į bandymo planą ir tikslus, turėtų būti nustatyti tinkamiausi statistiniai rezultatų analizės metodai. Turėtų būti apsvarstyta, ar rengiant statistinius duomenis turėtų būti atlikta pataisa atsižvelgiant į išgyvenimo rodiklius ir analizė pirmalaikio vienos arba daugiau grupių pašalinimo atveju. Rekomendacijų dėl tinkamos statistinės analizės ir pagrindinės informacijos apie tarptautiniu mastu pripažintus statistinius metodus pateikta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (6), taip pat rekomendaciniame dokumente Nr. 35 dėl lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimų analizės ir vertinimo (15).

▼M4

9. Atliekant lėtinio toksiškumo tyrimą, visada turėtų būti atsižvelgiama į pagrindinius principus ir aspektus, išdėstytus OECD rekomendaciniame dokumente Nr. 19 dėl klinikinių požymių, kaip pasekmių žmonėms, pasireiškimo vertinant saugumą naudojamiems bandomiesiems gyvūnams pripažinimo, vertinimo ir taikymo (16), pirmiausia jo 62 skirsnyje. Tame skirsnyje teigiama: *„Jeigu per kartotinės dozės tyrimus gyvūnams pasireiškia klinikinių požymių, kurie progresuoja ir dėl kurių toliau prastėja sveikatos būklė, turėtų būti priimtas informacija pagrįstas sprendimas, ar nereikėtų humaniškai numarinti gyvūno. Priimant sprendimą turėtų būti atsižvelgiama į informacijos, kuri būtų gauta tęsiant tyrimą su šiuo gyvūnu, vertės ir šio gyvūno bendrosios būklės santykį. jeigu nusprendžiama tęsti bandymą su šiuo gyvūnu, atsižvelgiant į poreikį, turėtų būti padidintas stebėjimų dažnumas. Be to, galbūt būtų įmanoma labai nepakenkiant bandymo tikslui laikinai nutraukti dozės davimą, jeigu dėl to sumažėtų skausmas ar kančia, arba sumažinti bandomąją dozę.“*

10. Išsamių rekomendacijų dėl dozės parinkimo lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimams principų ir jų svarstymų pateikta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (6), taip pat Tarptautinio gamtos mokslų instituto leidiniuose (17) (18). Pagrindinė dozės parinkimo strategija priklauso nuo tyrimo pagrindinio tikslo arba tikslų (6 skirsnis). Parenkant tinkamus dozių dydžius, pavojų atranka turėtų būti vykdoma atsižvelgiant į mažų dozių sukeliamas reakcijas ir į tų pavojų reikšmę. Tai ypač svarbu tada, kai ketinama atlikti jungtinį lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimą (šio priedo B.33 skyrius) (11 skirsnis).

11. Turėtų būti apsvarstyta galimybė atlikti jungtinį lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimą (šio priedo B.33 skyrius), o ne atskirai atlikti lėtinio toksiškumo tyrimą (B.30 bandymo metodas) ir kancerogeniškumo tyrimą (šio priedo B.32 skyrius). Palyginti su dviem atskirais tyrimais, atliekant bendrą bandymą užtikrinamas didesnis veiksmingumas laiko ir išlaidų požiūriu, neprarandant duomenų kokybės nei lėtinio poveikio, nei kancerogeniškumo bandymo etapu. Tačiau, atliekant jungtinį lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimą (šio priedo B.33 skyrius), turėtų būti kruopščiai apsvarstyti dozės parinkimo principai (9 ir 20–25 skirsniai); be to, pripažinta, kad pagal tam tikras reglamentavimo sistemas gali reikėti atlikti atskirus tyrimus.

12. Aprašant šį bandymo metodą vartojamos apibrėžtys pateiktos šio skyriaus pabaigoje ir rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (6).

BANDYMO PRINCIPAS

13. Bandomoji cheminė medžiaga kasdien skirtingomis dozėmis duodama kelioms bandomųjų gyvūnų grupėms; įprastas dozės davimo laikotarpis – 12 mėnesių, tačiau, atsižvelgiant į norminius reikalavimus, gali būti taikomos ilgesnės arba trumpesnės trukmės (žr. 33 skirsnį). Ši trukmė parenkama taip, kad būtų pakankamai ilga, jog aiškiai pasireikštų kaupiamasis toksiškumas, tačiau jis nebūtų painiojamas su senėjimo pakitimais. Jeigu pasirenkama ne 12 mėnesių trukmė, ji turėtų būti pagrįsta, ypač jeigu ta trukmė trumpesnė nei 12 mėnesių. Bandomoji cheminė medžiaga paprastai duodama per burną, tačiau gali būti tinkamas ir dozės davimas per kvėpavimo takus arba per odą. Pagal tyrimo planą taip pat gali būti numatyta vienas arba daugiau kartu marinti gyvūnus nebaigus bandymo, pvz., po trijų ir šešių mėnesių; šiuo tikslu gali būti įtraukiamos papildomos gyvūnų grupės (žr. 19 skirsnį). Dozių davimo laikotarpiu atidžiai stebima, ar gyvūnams nepasireiškė toksiškumo požymių. Bandymo metu nugaišę arba numarinti gyvūnai skrodžiami, o baigus bandymą numarinami ir skrodžiami išgyvenę gyvūnai.

▼M4

METODO APRAŠYMAS

Gyvūnų rūšies parinkimas

14. Šiuo bandymo metodu pirmiausia vertinamas graužikams pasireiškiantis lėtinis toksiškumas (žr. 2 skirsnį), tačiau pripažįstama, kad pagal tam tikras reglamentavimo tvarkas gali reikėti atlikti panašius ne graužikų tyrimus. Gyvūnų rūšies pasirinkimas turėtų būti pagrįstas. Ne graužikų rūšims pasireiškiančio lėtinio toksiškumo tyrimų planas ir atlikimas prireikus turėtų būti grindžiami aprašant šį bandymą ir šio priedo B.27 skyriuje „90 dienų kartotinės dozės toksiškumo per virškinamąjį traktą ne graužikams tyrimas“ (5) išdėstytais principais. Daugiau informacijos apie gyvūnų rūšies ir padermės pasirinkimą pateikta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (6).

15. Pagal šį bandymo metodą pirmenybė teikiama žiurkėms, tačiau gali būti naudojami ir kitų rūšių graužikai, pvz., pelės. Žiurkės ir pelės yra tinkamiausi bandomieji gyvūnai, nes jų gyvenimo trukmė palyginti trumpa, jos plačiai naudojamos atliekant farmakologinius ir toksikologinius tyrimus, jos jautrios auglių sukėlimui, yra pakankami gerai aprašytų padermių. Atsižvelgiant į šias savybes, yra daug informacijos apie jų fiziologiją ir patologiją. Turėtų būti naudojami sveiki, jauni, bet suaugę plačiai naudojamų laboratorinių padermių gyvūnai. Lėtinio toksiškumo tyrimas turėtų būti atliekamas naudojant tos pačios padermės ir iš to paties šaltinio gautus gyvūnus, kaip ir naudotieji per trumpesnės trukmės išankstinį (-ius) toksiškumo tyrimą (-us). Patelės turėtų būti dar be vados ir neapvaisintos.

Laikymo ir šėrimo sąlygos

16. Gyvūnai gali būti laikomi po vieną arba mažomis tos pačios lyties grupėmis; galimybė laikyti gyvūnus po vieną turėtų būti svarstoma tik tuo atveju, jeigu tai moksliškai pagrįsta (19) (20) (21). Narveliai turėtų būti išdėstyti taip, kad galimas narvelių išdėstymo poveikis tyrimo rezultatams turėtų būtų kuo mažesnis. Bandomųjų gyvūnų laikymo patalpos temperatūra turėtų būti 22 °C (± 3 °C). Nors santykinis drėgnis turėtų būti ne mažesnis kaip 30 % ir, pageidautina, ne didesnis kaip 70 % (išskyrus patalpų valymo metą), turėtų būti siekiama palaikyti 50–60 % santykinį drėgnį. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, taikant 12 h šviesos ir 12 h tamsos seką. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijose naudojamas pašaras, neribojant geriamojo vandens kiekio. Šėrimo režimas turėtų atitikti visus bandomųjų gyvūnų rūšies mitybos reikalavimus; pašaro sudėtyje turėtų būti kuo mažiau teršalų, įskaitant (be kitų teršalų) pesticidų likučius, patvariuosius organinius teršalus, fitoestrogenus, sunkiuosius metalus ir mikotoksinus. Turėtų būti periodiškai – bent pradedant tyrimą ir pasikeitus naudojamai partijai – parengiama analitinė informacija apie pašarines medžiagas ir pašaro sudėtyje esančių teršalų lygius; ši informacija turėtų būti pateikta galutinėje ataskaitoje. Turėtų būti rengiama atitinkama analitinė informacija apie tyrimo metu naudojamą geriamąjį vandenį. Pašaro parinkimui gali turėti įtakos poreikis tinkamai įmaišyti bandomąją cheminę medžiagą ir laikytis gyvūnų mitybos reikalavimų, kai bandomoji cheminė medžiaga duodama su pašaru.

Gyvūnų paruošimas

17. Turėtų būti naudojami sveiki gyvūnai, ne trumpiau kaip septynias paras pratinti prie laboratorinių sąlygų ir anksčiau nenaudoti kitiems bandymams. Jeigu naudojami graužikai, dozė gyvūnams turėtų būti pradedama duoti kaip galima anksčiau po atjunkymo ir pripratinimo, pageidautina, ne vėliau nei gyvūnams sueina aštuonios savaitės. Gyvūnai turėtų būti apibūdinti nurodant rūšį, padermę, šaltinį, lytį, masę ir amžių. Pradedant tyrimą kiekvienos lyties gyvūnų kūno masės skirtumai turi būti kuo mažesni ir pagal kiekvieną lytį

▼M4

nenukrypti nuo visų tyrime dalyvaujančių gyvūnų kūno masės vidurkio daugiau kaip ± 20 %. Gyvūnai turėtų būti atsitiktine tvarka suskirstyti į kontrolines ir bandomąsias grupes. Gyvūnus suskirsčius atsitiktine tvarka, grupių vidutinės kūno masės pagal lytį neturėtų smarkiai skirtis. Jeigu yra statistiniu požiūriu didelių skirtumų, atsitiktinis suskirstymo etapas turėtų būti pakartotas (jeigu tai įmanoma). Kiekvienam gyvūnui turėtų būti suteiktas unikalus identifikavimo numeris, kuriuo gyvūnas visam laikui pažymimas jį ištatuiruojant, implantuojant mikroschemą arba kitu tinkamu būdu.

PROCEDŪRA

Gyvūnų skaičius ir lytis

18. Turėtų būti naudojami abiejų lyčių gyvūnai. Turėtų būti naudojama tiek gyvūnų, kad baigus tyrimą kiekvienoje grupėje liktų pakankamai gyvūnų išsamiai biologinei ir statistinei analizei. Jeigu naudojami graužikai, kiekvieno dydžio dozei skirtos grupės paprastai sudaromos iš 20 patinų ir 20 patelių; jeigu naudojami ne graužikai, rekomenduojama grupes sudaryti iš ne mažiau kaip keturių patinų ir keturių patelių. Jeigu tyrimams naudojamos pelės, į kiekvieno dydžio dozei skirtą grupę gali reikėti įtraukti daugiau gyvūnų, kad būtų galima atlikti visus reikiamus hematologinius tyrimus.

Rezervo sudarymas atsižvelgiant į gyvūnų marinimą nebaigus bandymo, pagalbinių grupių sudarymas ir kontrolinių gyvūnų parūpinimas

19. Jeigu tai moksliškai pagrįsta, rengiantis tyrimui gali būti sudarytas rezervas (ne mažiau kaip po 10 kiekvienos lyties gyvūnų kiekvienoje grupėje) atsižvelgiant į gyvūnų marinimą nebaigus bandymo, pvz., po šešių mėnesių, kad būtų galima gauti informacijos apie toksikologinių pakitimų vystymąsi ir mechanistinės informacijos. Jeigu tokios informacijos apie bandomąją cheminę medžiagą jau turima remiantis anksčiau atliktais kartotinės dozės toksiškumo tyrimais, gyvūnų marinimo nebaigus bandymo moksliškai pagrįsti negalima. Taip pat gali būti naudojamos pagalbinės grupės, skirtos stebėti galimų tiriamos bandomosios cheminės medžiagos sukeltų toksikologinių pakitimų grįžtamumą; šios grupės paprastai naudojamos tik didžiausiajai tyrimo dozei ir kontrolei. Be to, gali būti numatyta papildoma kontrolinių gyvūnų grupė (paprastai – po penkis kiekvienos lyties gyvūnus), skirta prireikus stebėti ligos būklę tyrimo metu (22). Jeigu numatytas gyvūnų marinimas nebaigus bandymo arba pagalbinių ar kontrolinių grupių naudojimas, tyrimo plane numatytas gyvūnų skaičius turėtų būti padidintas numatytu nebaigus tyrimo numarinti gyvūnų skaičiumi. Šie gyvūnai turėtų stebimi taip pat, kaip pagrindinio tyrimo lėtinio toksiškumo etapo gyvūnai, įskaitant kūno masės stebėjimą, pašarų ir vandens suvartojimo stebėjimą, hematologinius ir klinikinės biochemijos matavimus ir patologinius tyrimus, tačiau taip pat gali būti numatyta (grupėse, kuriose numatytas gyvūnų marinimas nebaigus bandymo) atlikti tik tokius matavimus, kurie yra susiję su specifiniais, pagrindiniais matais, pvz., neurotoksiškumu arba imunotoksiškumu.

Dozių dydžių grupės ir dozuotė

20. Rekomendacijos dėl visų su dozių dydžių parinkimu ir dozių dydžių skirtumų nustatymu susijusių aspektų pateiktos rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (6). Turėtų būti naudojamos bent trijų dydžių dozės ir taikoma vienalaikė kontrolė, išskyrus atvejus, kai atliekamas ribinis bandymas (žr. 27 skirsnį). Dozių dydžiai paprastai grindžiami trumpesnio laikotarpio kartotinių dozių arba ribų nustatymo tyrimų rezultatais ir turėtų būti nustatomi atsižvelgiant į visus turimus toksikologinius ir toksikokinetinius duomenis apie bandomąją medžiagą arba panašias chemines medžiagas.

▼M4

21. Jeigu dozė neturėtų būti ribojama atsižvelgiant į bandomosios medžiagos fizines ir chemines savybes arba biologinį poveikį, didžiausioji dozė paprastai turėtų būti parenkama tokia, kad būtų galima nustatyti pagrindinius tikslinius organus ir toksinį poveikį, nesukeliant kančios, sunkaus toksiškumo, liguistumo arba žūties. Atsižvelgiant į toliau 22 skirsnyje išdėstytus veiksnius, didžiausioji dozė turėtų būti parenkama tokia, kad ją taikant būtų sukeliami pastebimi toksiškumo požymiai, pvz., pasireiškiantys kūno masės prieaugio sumažėjimu (apie 10 %).

22. Tačiau, atsižvelgiant į tyrimo tikslus (žr. 6 skirsnį), didžiausioji dozė gali būti parinkta mažesnė už dozę, kurią taikant būtų pastebimi toksiškumo požymiai, pvz., jeigu taikant dozę sukeliamas dominantis neigiamas poveikis, turintis nedidelės įtakos gyvenimo trukmei arba kūno masei. Didžiausioji dozė neturėtų viršyti 1 000 mg/kg kūno masės per parą (ribinė dozė, žr. 27 skirsnį).

23. Dozių dydžiai ir dozių dydžių skirtumai gali būti parinkti tokie, kad būtų galima nustatyti dozės ir reakcijos tarpusavio priklausomybę ir NNPL arba gauti kitokį siekiamą tyrimo rezultatą, pvz., nustatyti orientacinę dozę (OD) (žr. 25 skirsnį) taikant mažiausiąją dozę. Nustatant mažesniąsias dozes, turėtų būti atsižvelgiama į tokius veiksnius, kaip numatomas dozės ir reakcijos tarpusavio priklausomybės kreivės nuolydis, dozės, kurias taikant atsiranda reikšmingų metabolizmo arba toksinio poveikio būdo pokyčių, kai tikimasi gauti ribinę vertę arba atskaitos tašką mažiausiosios dozės ekstrapoliavimui.

24. Dozių dydžių skirtumai parenkami atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos savybes ir aprašant šį metodą negali būti iš anksto numatyti, tačiau tinkamas bandymų veiksmingumas dažnai užtikrinamas tada, kai nustatant mažėjančius dozių dydžius taikomi koeficientai nuo 2 iki 4; be to, jeigu taikomi labai dideli dozių dydžių skirtumai (pvz., taikomi didesni koeficientai nei 6–10), dažnai patartina naudoti ketvirtąją bandomąją grupę. Apskritai reikėtų vengti taikyti didesnius koeficientus nei 10; jeigu tokie taikomi, jie turėtų būti pagrindžiami.

25. Kaip išsamiau aprašyta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (6), konkrečios dozės turėtų būti nustatomos atsižvelgiant į tokius veiksnius:

— žinomus arba numanomus netiesiškumus arba dozės ir reakcijos tarpusavio priklausomybės kreivės išlinkio taškus,

— toksikokinetines savybes ir dozių intervalus, kuriuose pasireiškia metabolizmo paskatinimo, įsotinimo efektai arba išorinės ir vidinės dozių tarpusavio netiesiškumas, arba kuriuose nurodytųjų dalykų nepasireiškia,

— pirminius pakitimus, poveikio rodiklius arba pagrindinių aiškiai nepastebimų biologinių procesų veikimo požymius,

— pagrindinius (arba numanomus) veikimo būdo aspektus, pvz., dozes, kurias taikant pradeda reikštis citotoksiškumas, sutrikdomi hormonų lygiai, nustelbiami homeostaziniai mechanizmai ir t. t.,

— dozės ir reakcijos tarpusavio priklausomybės kreivės sritis, kuriose būtina atlikti ypač tikslius vertinimus, pvz., numanomos orientacinės dozės (OD) arba numanomos ribinės vertės sritis,

— numanomus poveikio žmonėms lygius.

▼M4

26. Kontrolinė grupė – tai dozės negaunančių gyvūnų grupė arba nešiklio kontrolės grupė, jeigu bandomajai cheminei medžiagai duoti naudojamas nešiklis. Išskyrus poveikį bandomąja chemine medžiaga, su kontrolinės grupės gyvūnais turėtų būti elgiamasi lygiai taip pat, kaip su bandomųjų grupių gyvūnais. Naudojant nešiklį, kontrolinės grupės gyvūnams duodamas didžiausias nešiklio tūris, skiriamas dozę gaunančioms grupėms. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga duodama su pašaru ir dėl prastesnio skonio gyvūnai suvartoja mažiau pašaro, gali būti naudinga pasitelkti papildomą kartu šeriamą kontrolinę grupę, kad būtų užtikrinta geresnė kontrolė.

27. Jeigu, remiantis išankstinių tyrimų informacija, galima numatyti, kad, taikant šiam tyrimui aprašytas metodikas, vieno dydžio dozės, atitinkančios bent 1 000 mg/kg kūno masės per parą, bandymas nesukels neigiamo poveikio ir jeigu toksinio poveikio nesitikima atsižvelgiant į panašios struktūros cheminių medžiagų duomenis, visas trijų dydžių dozės tyrimas gali būti laikomas nebūtinu. 1 000 mg/kg kūno masės per parą ribinė vertė gali būti taikoma tada, kai nereikia skirti didesnės dozės atsižvelgiant į poveikį žmogui.

Bandomosios cheminės medžiagos dozių paruošimas ir davimas

28. Bandomoji cheminė medžiaga paprastai duodama per burną, su pašaru ar geriamuoju vandeniu arba leidžiama zondu. Daugiau informacijos apie dozės davimo būdus ir metodus pateikta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (6). Dozės davimo būdas ir metodas parenkami atsižvelgiant į tyrimo tikslą, fizines ir chemines bandomosios cheminės medžiagos savybes, jos biologinį įsisavinimą ir vyraujantį poveikio žmonėms būdą ir metodą. Pasirinktas dozės davimo būdas ir metodas turi būti pagrįsti. Gyvūnų gerovės sumetimais dozės leidimas zondu paprastai turėtų būti pasirenkamas tik duodant tokias chemines medžiagas, kurių davimo būdas ir metodas iš esmės atitinka galimą poveikio žmogui būdą ir metodą (pvz., duodant vaistus). Maisto produktuose arba aplinkoje esančios cheminės medžiagos, įskaitant pesticidus, paprastai duodamos su pašaru arba vandeniu. Tačiau tam tikrais atvejais, pvz., tiriant poveikį darbe, gali būti tinkamesni kiti dozės davimo būdai.

29. Prireikus bandomoji cheminė medžiaga ištirpinama arba pagaminama jos suspensija tinkamame nešiklyje. Reikėtų atsižvelgti į šias nešiklio ir kitų priedų savybes, jeigu taikytina: poveikį sugerčiai, pasiskirstymui, metabolizmui arba bandomosios cheminės medžiagos sulaikymui; poveikį bandomosios cheminės medžiagos cheminėms savybėms, dėl kurių gali pasikeisti jos toksiškumo savybės; poveikį maisto ar vandens suvartojimui arba gyvūnų įmitimui. Rekomenduojama, jeigu įmanoma, pirmenybę teikti vandeniniam tirpalui arba suspensijai, tada svarstyti galimybę naudoti aliejaus (pvz., kukurūzų) tirpalą arba emulsija ir tik po to – galimybę naudoti tirpalus kituose nešikliuose. Jeigu kaip nešiklis naudojamas ne vanduo, turėtų būti žinomos to nešiklio toksinės savybės. Reikėtų turėti informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos stabilumą ir duodamų tirpalų arba pašarų homogeniškumą (jeigu taikytina) dozės davimo sąlygomis (pvz., su pašaru).

30. Jeigu cheminės medžiagos duodamos su pašaru arba geriamuoju vandeniu, svarbu užtikrinti, kad įmaišomi bandomosios cheminės medžiagos kiekiai netrikdytų įprasto mitybos režimo arba vandens balanso. Atliekant ilgalaikio toksiškumo tyrimus, kai dozė duodama su pašaru, bandomosios cheminės medžiagos koncentracija pašaro sudėtyje paprastai turėtų neviršyti 5 % viršutinės ribos visame pašarų kiekyje, kad būtų išvengta mitybos disbalanso. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga duodama su pašaru, gali būti taikoma pastovi koncentracija (mg/kg pašaro arba ppm) arba pastovus dozės dydis, nustatomas atsižvelgiant į gyvūno kūno masę (mg/kg kūno masės) ir apskaičiuojamas kas savaitę. Turėtų būti nurodytas pasirinktas variantas.

▼M4

31. Jeigu dozė duodama per burną, bandomoji cheminė medžiaga gyvūnams duodama kasdien (septynias dienas per savaitę), paprastai – 12 mėnesių laikotarpiu (taip pat žr. 33 skirsnį), tačiau atsižvelgiant į norminius reikalavimus gali reikėti taikyti ilgesnę trukmę. Pasirinkus bet kurią kitą dozės davimo tvarką, pvz., penkių dienų per savaitę, ją būtina pagrįsti. Jeigu dozė duodama per odą, gyvūnai paprastai veikiami bandomąja chemine medžiaga ne trumpiau kaip šešias valandas per parą, septynias dienas per savaitę, kaip nurodyta šio priedo B.9 skyriuje (10), 12 mėnesių laikotarpiu. Dozės davimas per kvėpavimo takus vykdomas šešias valandas per parą, septynias paras per savaitę, bet gali būti taikomas ir penkių parų per savaitę poveikis, jeigu jis pagrindžiamas. Įprastas dozės davimo laikotarpis – 12 mėnesių. Jeigu naudojant kitos rūšies graužikus nei žiurkės dozė duodama tik per nosį, ilgiausia poveikio trukmė gali būti pakoreguojama siekiant sumažinti tos rūšies gyvūnų patiriamą kančią. Jeigu dozė duodama trumpiau kaip šešias valandas per parą, būtina tai pagrįsti. Taip pat žr. šio priedo B.8 skirsnį (8).

32. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga leidžiama zondu, tai turėtų būti daroma kasdien panašiu metu, naudojant skrandžio zondą arba tinkamą intubacinį vamzdelį. Paprastai duodama viena dozė per parą, bet, jeigu, pvz., cheminė medžiaga turi vietinio dirginamojo poveikio, paros dozė gali būti duodama padalyta į kelias dalis (pvz., du kartus per parą). Didžiausias vienkartinis duodamo skysčio kiekis priklauso nuo bandomojo gyvūno dydžio. Tūris turėtų būti kaip įmanoma mažesnis ir, jeigu naudojami graužikai, paprastai neturėtų viršyti 1 ml/100 g kūno masės (22). Bandomojo tirpalo tūrio nepastovumas turi būti kiek įmanoma sumažintas, keičiant koncentraciją taip, kad visų dydžių dozių tūris būtų pastovus. Cheminėms medžiagoms, kurios gali turėti ėsdinamojo arba dirginamojo poveikio, taikoma išimtis; tokios medžiagos turi būti atskiestos siekiant išvengti sunkaus vietinio poveikio. Turėtų būti vengiama atlikti bandymus taikant koncentracijas, kurios galėtų turėti ėsdinamojo arba dirginamojo poveikio virškinimo traktui.

Tyrimo trukmė

33. Nors Šis bandymo metodas pirmiausia sumanytas kaip 12 mėnesių lėtinio toksiškumo tyrimas, tyrimo planas gali būti taikomas trumpesniems (pvz., šešių arba devynių mėnesių) arba ilgesniems (pvz., 18 arba 24 mėnesių) tyrimams, atsižvelgiant į tam tikrų reglamentavimo tvarkų reikalavimus arba siekiant specifinių mechanistinių tikslų. Jeigu pasirenkama ne 12 mėnesių trukmė, ji turėtų būti pagrįsta, ypač jeigu ta trukmė trumpesnė nei 12 mėnesių. Pagalbinės grupės, įtrauktos tiriamos bandomosios cheminės medžiagos sukeliamų toksikologinių pakitimų grįžtamumo stebėjimo tikslais, turėtų negauti dozės ne mažiau kaip keturias savaites, bet ne ilgiau kaip trečdalį visos tyrimo trukmės nutraukus dozės davimą. Daugiau patarimų, įskaitant patarimus dėl išgyvenimo per tyrimą įvertinimo, pateikta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (6).

STEBĖJIMAI

34. Visi gyvūnai turėtų būti tikrinami, ar jie sveiki arba nenugaišę; paprastai tai turėtų būti daroma kiekvienos dienos pradžioje ir pabaigoje, įskaitant savaitgalius ir švenčių dienas. Bendrieji klinikiniai stebėjimai turėtų būti atliekami bent kartą per parą, pageidautina, tuo pačiu paros metu, atsižvelgiant į stipriausią numatomą poveikį po dozės davimo, kai dozė leidžiama zondu.

▼M4

35. Kartą prieš pirmąjį dozės davimą (kad būtų galima palyginti atskirus gyvūnus), po to – pasibaigus pirmajai tyrimo savaitei, o vėliau – kas mėnesį turėtų būti atliekami išsamūs visų gyvūnų klinikiniai stebėjimai. Stebėjimų protokolas turėtų būti sudarytas taip, kad stebėtojų kaita būtų kuo mažesnė ir kad stebėtojai būtų paskiriami neatsižvelgiant į bandomąją grupę. Kiekvieną kartą šie stebėjimai turėtų būti atliekami tuo pačiu metu, perkėlus gyvūną iš jo narvelio į tam skirtą vietą. Stebėjimai turėtų būti kruopščiai registruojami, pageidautina, pagal toje laboratorijoje aiškiai apibrėžtą vertinimo sistemą. Turėtų būti stengiamasi užtikrinti, kad stebėjimo sąlygų kaita būtų kuo mažesnė. Be kitų dalykų, turėtų būti registruojami odos, kailio, akių, gleivinės pakitimai, išskyrų atsiradimas ir autonominis aktyvumas (pvz., ašarojimas, plaukų pašiaušimas, vyzdžio dydis, neįprasti kvėpavimo pakitimai). Taip pat turėtų būti registruojami eisenos, pozos, reakcijos į paėmimą rankomis pakitimai, traukulių arba toninių judesių atsiradimas, stereotipinis (pvz., besaikis valymasis, pasikartojantis sukimasis ratu) arba keistas elgesys (pvz., savęs luošinimas, vaikščiojimas atbulomis) (24).

36. Naudojant oftalmoskopą arba kitą tinkamą įrangą, prieš pirmąjį bandomosios cheminės medžiagos davimą turėtų būti atlikti visų gyvūnų oftalmologiniai tyrimai. Baigus tyrimą, turėtų būti atlikti visų gyvūnų arba bent didžiausiąją dozę gavusios grupės ir kontrolinės grupės oftalmologiniai tyrimai. Jeigu nustatoma akių pakitimų, susijusių su dozės davimu, turėtų būti ištirti visi gyvūnai. Jeigu struktūrinė analizė arba kita informacija rodo toksinį poveikį akims, akių tyrimų dažnumas turėtų būti didesnis.

37. Jeigu anksčiau atlikus cheminės medžiagos 28 dienų ir (arba) 90 dienų kartotinės dozės toksiškumo bandymus nustatyta, kad cheminė medžiaga gali sukelti neurotoksinį poveikį, prieš pradedant tyrimą ir kas tris mėnesius nuo tyrimo pradžios, bet ne ilgiau kaip 12 mėnesių laikotarpiu, o taip pat baigus tyrimą (jeigu jis trunka ilgiau nei 12 mėnesių) galima (bet neprivaloma) įvertinti jutimines reakcijas į įvairaus pobūdžio dirgiklius (24) (pvz., klausos, regos ir proprioreceptorinius) (25) (26) (27), spaudimo (jėgos) stiprumą (28) ir judėjimo aktyvumą (29). Išsamesnės informacijos apie procedūras, kurios galėtų būti taikomos, pateikta atitinkamuose literatūros šaltiniuose. Tačiau galima taikyti ir čia nurodytiems metodams alternatyvius metodus.

38. Jeigu anksčiau atlikus cheminės medžiagos 28 dienų ir (arba) 90 dienų kartotinės dozės toksiškumo bandymus nustatyta, kad cheminė medžiaga gali sukelti imunotoksinį poveikį, baigus tyrimą galima (bet neprivaloma) atlikti išsamesnius šios pasekmės tyrimus.

Kūno masė, pašarų ir (arba) vandens suvartojimas ir pašaro efektyvumas

39. Visi gyvūnai turėtų būti pasveriami prieš pradedant duoti dozę, kitas 13 savaičių – ne rečiau kaip kartą per savaitę, o vėliau – bent kartą per mėnesį. Pirmąsias 13 savaičių – ne rečiau kaip kartą per savaitę, o vėliau – bent kartą per mėnesį turėtų būti matuojamas pašaro suvartojimas ir pašaro efektyvumas. Jeigu cheminė medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu, pirmąsias 13 savaičių – ne rečiau kaip kartą per savaitę, o vėliau – bent kartą per mėnesį turėtų būti matuojamas vandens suvartojimas. Galimybė matuoti vandens suvartojimą turėtų būti svarstoma ir atliekant tyrimus, per kuriuos pasikeičia gėrimo įpročiai.

▼M4

Hematologiniai ir klinikinės biochemijos tyrimai

40. Atliekant tyrimus, per kuriuos naudojami graužikai, po trijų, šešių ir dvylikos mėnesių, taip pat baigus tyrimą (jeigu jis trunka ilgiau nei 12 mėnesių), turėtų būti atlikti ne mažesnių kaip dešimties patinų ir dešimties patelių grupių hematologiniai tyrimai, visada naudojant tuos pačius gyvūnus. Jeigu atliekant tyrimus naudojamos pelės, norint atlikti visus reikiamus hematologinius tyrimus gali reikėti pagalbinių gyvūnų (žr. 18 skirsnį). Jeigu atliekant tyrimus naudojami ne graužikai, ėminiai dar nebaigus tyrimo ir jį baigus, kaip aprašyta graužikų atveju, imami iš mažesnio gyvūnų skaičiaus (pvz., jeigu tiriami šunys – iš keturių kiekvienos lyties gyvūnų kiekvienoje grupėje). Nepaisant to, ar naudojami graužikai, ar ne graužikai, matavimų po trijų mėnesių galima neatlikti, jeigu per anksčiau atliktą 90 dienų tyrimą, per kurį buvo taikomi panašūs dozių dydžiai, nebuvo pastebėta poveikio hematologiniams parametrams. Kraujo ėminiai turėtų būti imami iš nurodytos vietos, pvz., širdies punkcijos vietos arba iš užakiduobinio ančio, taikant nuskausminimą.

41. Turėtų būti ištirti šie parametrai (30): bendras leukocitų kiekis ir įvairių leukocitų kiekiai, eritrocitų kiekis, trombocitų kiekis, hemoglobino koncentracija, hematokritas (procentinė kraujo ląstelių tūrio dalis), vidutinis eritrocito tūris (VET), vidutinis hemoglobino kiekis eritrocituose (VHKE), vidutinė eritrocitų hemoglobino koncentracija (VEHK), protrombino laikas ir dalinis aktyvintas tromboplastino laikas. Atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą, prireikus gali būti matuojami ir kiti hematologiniai parametrai, pvz., Heinco kūneliai arba kita netipinė eritrocitų morfologija, arba methemoglobinas. Apskritai turėtų būti laikomasi lankstaus požiūrio, kuriuo būtų atsižvelgiama į pastebėtą ir (arba) numatomą atitinkamos bandomosios cheminės medžiagos poveikį. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga turi poveikio kraujodaros sistemai, gali reikėti nustatyti retikulocitų kiekį ir atlikti kaulų čiulpų citologijos tyrimus, tačiau to nebūtina daryti nuolat.

42. Siekiant ištirti svarbiausius toksinius poveikius audiniams, ypač inkstams ir kepenims, reikėtų atlikti kraujo ėminių, paimtų iš ne mažiau kaip dešimties kiekvienos grupės patinų ir dešimties patelių (visada iš tų pačių gyvūnų) tokiais pat laiko intervalais, kaip nurodyta dėl hematologinių tyrimų, klinikinius biocheminius tyrimus. Jeigu atliekant tyrimus naudojamos pelės, norint atlikti visus reikiamus klinikinės biochemijos tyrimus, gali reikėti pagalbinių gyvūnų. Jeigu atliekant tyrimus naudojami ne graužikai, ėminiai dar nebaigus tyrimo ir jį baigus, kaip aprašyta graužikų atveju, imami iš mažesnio gyvūnų skaičiaus (pvz., jeigu tiriami šunys – iš keturių kiekvienos lyties gyvūnų kiekvienoje grupėje). Nepaisant to, ar naudojami graužikai, ar ne graužikai, matavimų po trijų mėnesių galima neatlikti, jeigu per anksčiau atliktą 90 dienų tyrimą, per kurį buvo duodamos panašaus dydžio dozės, nebuvo pastebėta poveikio klinikinės biochemijos parametrams. Rekomenduojama, kad prieš kraujo pavyzdžių ėmimą gyvūnai (išskyrus peles) būtų nešeriami per naktį. Turėtų būti ištirti šie parametrai (30): gliukozė, šlapalas (šlapalo azotas), kreatininas, bendras baltymų kiekis, albuminas, kalcis, natris, kalis, bendras cholesterolio kiekis, ne mažiau kaip du atitinkami kepenų ląstelių tyrimai (alaninaminotransferazė, aspartataminotransferazė, glutamato dehidrogenazė ir bendras tulžies rūgščių kiekis) (31) ir ne mažiau kaip du atitinkami kepenų ir tulžies sistemos tyrimai (šarminė fosfatazė, gamaglutamiltransferazė, 5’-nukleotidazė, bendras bilirubino kiekis, bendras tulžies rūgščių kiekis) (31). Be to, atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą, gali būti naudinga išmatuoti kitus klinikinės chemijos parametrus, pvz., trigliceridų koncentraciją nešėrus, specifinius hormonus ir cholinesterazę. Apskritai turėtų būti laikomasi lankstaus požiūrio, kuriuo būtų atsižvelgiama į pastebėtą arba numatomą atitinkamos bandomosios cheminės medžiagos poveikį.

▼M4

43. Turėtų būti atlikti ne mažiau kaip dešimties kiekvienos grupės patinų ir dešimties patelių šlapimo tyrimai, ėminius imant tokiais pat intervalais, kokie taikomi hematologinės ir klinikinės chemijos tyrimų tikslais. Matavimų po trijų mėnesių galima neatlikti, jeigu per anksčiau atliktą 90 dienų tyrimą, per kurį buvo duodamos panašaus dydžio dozės, nebuvo pastebėta poveikio šlapimo analizės rezultatams. Ekspertų rekomendacijoje dėl klinikinės patologijos tyrimų pateiktas toks parametrų sąrašas (30): išvaizda, tūris, osmosinis slėgis arba savitasis svoris, pH, bendras baltymų kiekis ir gliukozė. Taip pat gali būti tiriamas ketonas, urobilinogenas, bilirubinas ir paslėptasis kraujas. Prireikus išplėsti pastebėto (-ų) poveikio (-ų) tyrimą, gali būti naudojami papildomi parametrai.

44. Paprastai laikoma, kad pradiniai hematologiniai ir klinikinės biochemijos kintamieji prieš pradedant duoti dozę turėtų būti nustatomi atliekant šunų tyrimus, bet jų nebūtina nustatyti atliekant graužikų tyrimus (30). Visgi, jeigu istoriniai pradiniai duomenys (žr. 50 skirsnį) yra netinkami, turėtų būti svarstoma galimybė parengti minėtus duomenis.

Patologija

Bendrasis skrodimas

45. Paprastai atliekamas išsamus visų tiriamųjų gyvūnų bendrasis skrodimas, atidžiai ištiriant kūno paviršių ir visas jo angas, kaukolę, krūtinės ląstą, pilvo ertmes ir jų turinį. Tačiau taip pat gali būti numatyta (grupėse, kuriose numatytas gyvūnų marinimas nebaigus bandymo, arba pagalbinėse grupėse) atlikti tik tokius matavimus, kurie yra susiję su specifiniais, pagrindiniais matais, pvz., neurotoksiškumu arba imunotoksiškumu (žr. 19 skirsnį). Šių gyvūnų nebūtina skrosti ar su jais atlikti tolesnių procedūrų, aprašytų kituose skirsniuose. Kontrolinius gyvūnus gali reikėti skrosti atsižvelgiant į konkretų atvejį ir vadovaujantis tyrimo vadovo nuožiūra.

46. Turėtų būti pasveriami visų gyvūnų, išskyrus nurodytuosius 45 skirsnio paskutinėje dalyje, organai. Visų gyvūnų (išskyrus gaištančius ir (arba) numarintus nebaigus bandymo) antinksčiai, sėklidžių prielipai, širdis, inkstai, kepenys, kiaušidės, blužnis, sėklidės, skydliaukė (sveriama po fiksavimo, kartu su prieskydinėmis liaukomis) ir gimda turėtų būti nuvalyti, jeigu reikia, pašalinant prigludusius audinius, ir po skrodimo kuo greičiau pasverti, kol neišdžiuvo. Jeigu atliekant tyrimą naudojamos pelės, antinksčių sverti nebūtina.

47. Atsižvelgiant į audinio tipą ir numatomą vėliau atlikti histopatologinį tyrimą, tinkamiausioje fiksavimo terpėje turėtų būti konservuojami šie audiniai (32) (laužtiniuose skliaustuose nurodytų audinių konservuoti nebūtina):

Visi labai pakitę audiniai	Širdis	Kasa	Skrandis (įskrandis, liaukinė skrandžio dalis)
Antinksčiai	Klubinė žarna	Prieskydinė liauka	[Dantys]
Aorta	Tuščioji žarna	Periferinis nervas	Sėklidės
Smegenys (įskaitant didžiųjų smegenų, smegenėlių ir pailgųjų smegenų (smegenų tilto) išpjovas)	Inkstai	Hipofizė	Užkrūčio liauka
Akloji žarna	Ašarų liauka (viršakiduobinė)	Prostata	Skydliaukė
Gimdos kaklelis	Kepenys	Tiesioji žarna	[Liežuvis]

▼M4

Koaguliatorių liauka	Plaučiai	Seilių liauka	Trachėja
Gaubtinė žarna	Limfmazgiai (paviršiniai ir giluminiai)	Sėklinės pūslelės	Šlapimo pūslė
Dvylikapirštė žarna	Pieno liauka (patelėms – privaloma, patinams – jeigu galima ištirti akimi)	Skeleto raumuo	Gimda (su gimdos kakleliu)
Sėklidžių prielipai	[Viršutiniai kvėpavimo takai, įskaitant nosį, kriaukles ir šalutines nosies ertmes]	Oda	[Šlapimtakis]
Akys (su tinklaine)	Stemplė	Stuburo smegenys (trys lygiai: sprando, krūtinės ląstos ir juosmens)	[Šlaplė]
[Šlaunikaulis su kelio sąnariu]	[Uoslės receptoriai]	Blužnis	Makštis
Tulžies pūslė (jeigu tiriamos ne žiurkės)	Kiaušidės	[Krūtinkaulis]	Kaulų čiulpų išpjova ir (arba) šviežiai paruošta kaulų čiulpų punkcija
Harderio liauka			

Jeigu tai poriniai organai, pvz., inkstai, antinksčiai, turėtų būti konservuojami abu organai. Atsižvelgiant į gautas klinikines ir kitokias išvadas, gali reikėti ištirti papildomus audinius. Be to, atsižvelgiant į žinomas bandomosios cheminės medžiagos savybes, turėtų būti konservuojami visi numanomi tiksliniai organai. Atliekant tyrimus, per kuriuos dozė duodama per odą, turėtų būti konservuojami organai, nurodyti kaip konservuotini, kai dozė duodama per burną; be to, labai svarbu, kad būtų paimti ir užkonservuoti specifiniai odos ėminiai iš poveikio vietos. Atliekant inhaliacinius tyrimus, konservuotinų ir tirtinų kvėpavimo takų audinių sąrašas turėtų būti sudaromas remiantis šio priedo B.8 skyriuje (8) ir šio priedo B.29 skyriuje (9) pateiktomis rekomendacijomis. Tiriant kitus organus ir (arba) audinius (be specialiai konservuojamų kvėpavimo takų audinių), turėtų būti tiriami organai, nurodyti dėl poveikio per virškinamąjį traktą būdo pateiktame organų sąraše.

Histopatologinis tyrimas

48. Yra parengtos toksikologinės patologijos tyrimų geriausiosios patirties gairės (32). Turėtų būti atlikti bent šie histopatologiniai tyrimai:

— visų didžiausiąją dozę gavusios grupės ir kontrolinės grupės gyvūnų audinių,

— visų per tyrimą nugaišusių arba numarintų gyvūnų audinių,

— visų audinių su plika akimi matomais pakitimais,

— tikslinių audinių arba visų kitų dydžių dozes gavusių grupių gyvūnų audinių, dėl kurių didžiausiąją dozę gavusioje grupėje nustatyta su dozės davimu susijusių pakitimų,

— jeigu tai poriniai organai, pvz., inkstai, antinksčiai, turėtų būti tiriami abu organai.

▼M4

DUOMENYS IR ATASKAITOS

Duomenys

49. Turėtų būti pateikti kiekvieno gyvūno duomenys pagal visus vertinamus parametrus. Be to, visi duomenys turėtų būti apibendrinti lentelėse, pagal kiekvieną bandomąją grupę nurodant pradedant bandymą turėtų gyvūnų skaičių, atliekant bandymą nugaišusių arba dėl humaniškų priežasčių numarintų gyvūnų skaičių ir kiekvienos žūties arba numarinimo dėl humaniškų priežasčių laiką, gyvūnų su toksiškumo požymiais skaičių, pastebėtų toksiškumo požymių aprašymą, įskaitant kiekvieno toksinio poveikio pasireiškimo laiką, trukmę ir sunkumą, gyvūnų su audinių pakitimais skaičių, pakitimų tipą ir gyvūnų su kiekvieno tipo pakitimais procentinę dalį. Gyvūnams, kuriems pasireiškė toksinis poveikis arba atsirado audinių pakitimų, be pakitimų lygmens įvertinimo, suvestinių duomenų lentelėse turėtų būti pateikti vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai (ištisinio bandymo duomenų).

50. Istoriniai kontroliniai duomenys gali būti vertingi aiškinant tyrimo rezultatus, pvz., kai yra požymių, kad taikant vienalaikę kontrolę gauti duomenys iš esmės skiriasi, palyginti su naujausiais duomenimis, gautais stebint kontrolinius gyvūnus, esančius toje pačioje bandymo patalpoje arba kolonijoje. Istoriniai kontroliniai duomenys, jeigu jie vertinami, turėtų būti pateikti tos pačios laboratorijos ir turėtų būti susiję su to paties amžiaus ir padermės, išvestos penkerių metų laikotarpiu iki svarstomo tyrimo, gyvūnais.

51. Jeigu taikytina, skaitiniai rezultatai turėtų būti įvertinti tinkamu, visuotinai priimtinu statistiniu metodu. Statistiniai metodai ir analizei skirti duomenys turi būti pasirinkti planuojant bandymą (8 skirsnis). Parenkant duomenis, turėtų būti numatytos pataisos atsižvelgiant į gyvūnų išgyvenimą.

Bandymo ataskaita

52. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikta toliau nurodyta informacija.

Bandomoji cheminė medžiaga:

— fizinė būsena, grynumas, fizinės ir cheminės savybės,

— identifikavimo duomenys,

— cheminės medžiagos šaltinis,

— partijos numeris,

— cheminės analizės pažyma.

Nešiklis (jeigu naudojamas):

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas (jeigu tai ne vanduo).

Bandomieji gyvūnai:

— naudota rūšis ir (arba) padermė ir pasirinkimo pagrindimas,

— gyvūnų skaičius ir amžius pradedant bandymą, nurodant lytį,

▼M4

— šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.,

— kiekvieno gyvūno masė pradedant bandymą.

Bandymo sąlygos:

— dozės davimo būdo ir dozės parinkimo pagrindimas,

— jeigu taikytina, taikyti statistiniai duomenų analizės metodai,

— išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos ir pašaro paruošimą,

— analitiniai duomenys apie pasiektą koncentraciją, preparato stabilumą ir homogeniškumą,

— dozės davimo būdas ir išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos davimą,

— jeigu tai inhaliaciniai tyrimai: ar dozė duodama tik per nosį, ar per visą kūną,

— faktinės dozės (mg/kg kūno masės per parą) ir bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos pašare ir (arba) geriamajame vandenyje (mg/kg arba ppm) perskaičiavimo į faktinę dozę koeficientas, jeigu taikytina,

— išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę.

Rezultatai (turėtų būti pateiktos suvestinių duomenų lentelės ir kiekvieno gyvūno duomenys):

— išgyvenimo duomenys,

— kūno masė ir (arba) kūno masės pokyčiai,

— pašaro suvartojimas, pašaro efektyvumo skaičiavimai, jeigu jie buvo atlikti, ir vandens suvartojimas, jeigu taikytina,

— toksinės reakcijos duomenys pagal lytį ir dozės dydį, nurodant toksiškumo požymius,

— pastebėtų klinikinių požymių pobūdis, paplitimas (ir, jeigu įvertinta, sunkumas) ir trukmė (grįžtami ar negrįžtami),

— oftalmologinis tyrimas,

— hematologiniai tyrimai,

— klinikinės biochemijos tyrimai,

— šlapimo tyrimai,

— neurotoksiškumo arba imunotoksiškumo tyrimų rezultatai,

— galutinė kūno masė,

— organų masė (ir masių santykiai, jeigu taikytina),

— skrodimo išvados,

— išsamus visų su dozės davimu susijusių histopatologinio tyrimo rezultatų aprašymas,

— sugerties duomenys, jeigu yra.

▼M4

Statistinis rezultatų apdorojimas, jeigu taikytina.

Rezultatų aptarimas, apimantis:

— dozės ir reakcijos tarpusavio priklausomybes,

— veikimo būdo informacijos svarstymą,

— modeliavimo metodų aptarimą,

— OD, NNPL ir MPNPL nustatymą,

— istorinius kontrolinius duomenis,

— reikšmę žmonėms.

Išvados.

LITERATŪRA

1. OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2. Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the SAFEty Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.

3. Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145–191.

4. Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.

5. Šio priedo B.27 skyrius. 90 dienų kartotinės dozės toksiškumo per virškinamąjį traktą ne graužikams tyrimas.

6. OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

7. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

8. Šio priedo B.8 skyrius. Poūmis toksiškumas įkvėpus. 28 dienų tyrimas.

9. Šio priedo B.29 skyrius. Pusiau lėtinis toksiškumas įkvėpus. 90 dienų tyrimas.

10. Šio priedo B.9 skyrius. Kartotinės dozės (28 dienų) toksiškumas (per odą).

11. Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical SAFEty Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human SAFEty Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1–7.

12. Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical SAFEty Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.

13. Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical SAFEty Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37–68.

▼M4

14. Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al*. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical SAFEty Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69–98.

15. OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

16. OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

17. Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729–837.

18. ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

19. 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos, OL L 276, 2010 10 20, p. 33.

20. National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86–23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

21. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3–906255–04–2.

22. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

23. Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15–23.

24. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

25. Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.

26. Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691–704.

27. Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.

28. Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

29. Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599–609.

▼**M4**

30. Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and SAFEty Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198–201.

31. EMEA (draft) document „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity“ (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

32. Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

▼**M4**

1 priedėlis

APIBRĖŽTIS

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

▼C1

B.31. **TOKSIŠKUMO PRENATALINIAM VYSTYMUISI BANDYMAS**

1. **METODAS**

Šis metodas atitinka OECD TG 414 (2001).

1.1. ĮVADAS

Šis toksiškumo prenataliniam vystymuisi bandymo metodas skirtas suteikti bendros informacijos apie poveikį vaikingai patelei ir jos gimdoje augančio vaisiaus prenataliniam vystymuisi; tai gali būti poveikio motinai, iškaitant žūtį, įvertinimas, struktūrinės anomalijos arba vaisiaus augimo pakitimai. Funkciniai trūkumai, nors ir yra svarbi vystymosi dalis, nėra šio bandymo metodo sudėtinė dalis. Jie gali būti ištiriami darant atskirą bandymą arba kaip šio bandymo papildymas, naudojant neurotoksiškumo vystymuisi bandymo metodą. Jei reikia gauti daugiau informacijos apie funkcinių trūkumų ir kito postnatalinio poveikio bandymą, reikėtų atitinkamai žiūrėti toksiškumo dviejų kartų dauginimuisi bandymo metodą ir neurotoksiškumo vystymuisi bandymo metodą.

Gali tekti šį bandymo metodą specialiai pritaikyti atskiriems atvejams atsižvelgiant į konkrečias žinias, pvz., bandomosios medžiagos fizikines ir chemines arba toksikologines savybes. Toks pritaikymas priimtinas, kai įrodantys moksliniai duomenys rodo, kad dėl to bandymas bus informatyvesnis. Tokiais atvejais šie moksliniai įrodymai turi būti kruopščiai aprašyti bandymo ataskaitoje.

1.2. APIBRĖŽTYS

Vystymosi toksikologija – neigiamo poveikio organizmo vystymuisi, galinčio atsirasti dėl veikimo medžiaga prieš apvaisinimą, prenatalinio vystymosi laikotarpiu arba po gimimo iki lytinės brandos, tyrimas. Pagrindiniai toksiškumo vystymuisi požymiai: 1) organizmo žūtis, 2) struktūros anomalijos, 3) augimo pakitimas ir 4) funkciniai trūkumai. Vystymosi toksikologija anksčiau buvo vadinama teratologija.

Neigiamas poveikis – bet koks su veikimu medžiaga susijęs pakitimas, palyginti su pamatine verte, mažinantis organizmo gebą išgyventi, daugintis arba prisitaikyti prie aplinkos. Kalbant apie vystymosi toksikologiją neigiamas poveikis plačiausia prasme yra bet koks poveikis, kuris trukdo apvaisinto kiaušinėlio normaliam vystymuisi, prieš gimimą ir po jo.

Augimo pakitimas – palikuonio organo arba kūno masės ar dydžio pakitimas.

Pakitimai (anomalijos) – struktūriniai vystymosi pakitimai, kuriuos sudaro išsigimimai ir nukrypimai (28).

Išsigimimas/didelė anomalija – struktūrinis pakitimas, laikomas kenksmingu gyvūnui (taip pat gali būti mirtinas), paprastai retas.

▼C1

Nukrypimas/maža anomalija – struktūrinis pakitimas, kurio kenksmingas poveikis gyvūnui yra mažas arba jo visai nėra; gali būti laikinas ir gana dažnai pasitaikyti kontrolinėje populiacijoje.

Apvaisintas kiaušinėlis – apvaisinto kiaušinėlio dalių visuma bet kurioje vystymosi stadijoje nuo apvaisinimo iki gimimo, įskaitant ekstraembrionines membranas, gemalą arba vaisių.

Implantacija (nidacija) – blastocistos susijungimas su gimdos epitelio gleivine, įskaitant jos prasiskverbimą per gimdos epitelį ir jos įaugimą į gleivinę.

Gemalas – visų organizmų ankstyvoji arba vystymosi stadija, tiksliau apvaisinto kiaušinėlio vystymosi produktas nuo didžiosios ašies pasirodymo iki pagrindinių struktūrų atsiradimo.

Toksiškumas gemalui – kenksmingas poveikis normaliai gemalo struktūrai, vystymuisi, augimui, ir (arba) gyvybingumui.

Vaisius – apvaisintas palikuonis postembrioniniu laikotarpiu.

Toksiškumas vaisiui – kenksmingas poveikis normaliai vaisiaus struktūrai, vystymuisi, augimui ir (arba) gyvybingumui.

Persileidimas – apvaisinimo produktų – gemalo arba negyvybingo vaisiaus – priešlaikinis pašalinimas iš gimdos.

Resorbcija – reiškinys, kai gimdoje implantavęsis apvaisintas kiaušinėlis žūsta ir yra resorbuojamas arba buvo resorbuotas.

Ankstyvoji resorbcija – implantacijos pėdsakai be atpažįstamo gemalo ar vaisiaus.

Vėlyvoji resorbcija – žuvęs gemalas arba vaisius su išoriniais išsigimimą rodančiais pakitimais.

NOAEL – nepastebėto neigiamo poveikio ribos (*No observed adverse effect level*) santrumpa, tai yra didžiausia dozė arba veikimo koncentracija, nesukelianti pastebimo neigiamo poveikio.

1.3. ETALONINĖ MEDŽIAGA

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Paprastai bandomoji medžiaga duodama vaikingoms patelėms bent nuo implantacijos iki likus vienai parai iki numatyto numarinimo, kuris turi įvykti kiek įmanoma arčiau normalaus atsivedimo dienos, nerizikuojant prarasti duomenis, jei įvyktų priešlaikinis atsivedimas. Bandymų metodas nėra skirtas tik organogenezės laikotarpiui tirti (pvz., 5–15 parų graužikams, 6–18 parų triušiams), juo taip pat tiriamas poveikis visą gestacijos laikotarpį nuo ikiimplantacinio laikotarpio, jei tinka, iki likus vienai parai iki cezario pjūvio darymo. Prieš pat cezario pjūvio darymą patelės numarinamos, ištiriamas gimdos turinys ir įvertinamos išoriškai matomos vaisiaus anomalijos bei minkštojo audinio ir griaučių pakitimai.

▼C1

1.5. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.5.1. **Gyvūnų rūšies pasirinkimas**

Rekomenduojama bandymams pasirinkti tinkamiausią rūšį ir naudoti tas laboratorines rūšis bei veisles, kurios yra paprastai naudojamos darant toksiškumo prenataliniam vystymuisi bandymus. Tinkamiausia graužikų rūšis yra žiurkė, o ne graužikų – triušis. Kitos rūšies naudojimą reikėtų pagrįsti.

1.5.2. **Laikymo ir šėrimo sąlygos**

Bandomųjų gyvūnų patalpos temperatūra turi būti 22 °C (± 3 °C) graužikams ir 18 °C (± 3 °C) triušiams. Nors santykinė oro drėgmė turėtų būti mažiausiai 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikėtų siekti, kad ji būtų 50–60 %. Apšvietimas turi būti dirbtinis ir jo seka: 12 h šviesos ir 12 h tamsos. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, o geriamojo vandens kiekis neribojamas.

Poruojama šiam tikslui pritaikytuose narveliuose. Pageidautina suporuotus gyvūnus laikyti atskirai, tačiau taip pat leidžiama juos laikyti nedidelėmis grupėmis.

1.5.3. **Gyvūnų paruošimas**

Naudojami sveiki ir ankstesniuose bandymuose nenaudoti gyvūnai, kurie mažiausiai 5 paras buvo pratinami prie laboratorinių sąlygų. Apibūdinama bandomų gyvūnų rūšis, veislė, šaltinis, lytis, masė ir (arba) amžius. Kiek įmanoma, visų bandymo grupių gyvūnai turi būti vienodos masės ir amžiaus. Kiekvienai dozei naudojamos jaunos, suaugusios palikuonių neturėjusios patelės. Patelės poruojamos su tos pačios rūšies ir veislės patinais, be to, reikėtų vengti poravimo su tų pačių tėvų palikuonimis. Graužikams 0 gestacijos diena yra vaginalinio kamščio ir (arba) spermos atsiradimo diena; triušiams 0 diena paprastai yra suporavimo arba dirbtinio apvaisinimo diena, jei taikomas šis metodas. Apvaisintos patelės suskirstomos atsitiktiniu būdu į kontrolinę ir bandomąsias grupes. Narveliai išdėstomi taip, kad būtų kiek įmanoma sumažintas bet koks galimas poveikis dėl narvelio buvimo vietos. Kiekvienam gyvūnui turėtų būti priskirtas savitas identifikavimo numeris. Apvaisintos patelės atsitiktinės atrankos būdu paskirstomos į kontrolinę ir bandymo grupes; jei patelės apvaisinamos partijomis, kiekvienos partijos gyvūnai turi būti tolygiai paskirstyti po visas grupes. Patelės, apvaisintos to paties patino, panašiu būdu tolygiai paskirstomos po visas grupes.

1.6. BANDYMO EIGA

1.6.1. **Gyvūnų skaičius ir lytis**

Kiekvienoje bandymo ir kontrolinėje grupėje turi būti pakankamas patelių skaičius, kad darant skrodimą būtų maždaug 20 patelių su implantacijos vietomis. Grupės, kuriose būtų mažiau kaip 16 patelių su implantacijos vietomis, gali netikti. Patelių gaištamumas nebūtinai turi būti bandymo rezultatų negaliojimo priežastis, jei jis nėra didesnis kaip maždaug 10 %.

▼C1

1.6.2. **Dozių ruošimas**

Jei dozių ruošimui lengvinti naudojamas nešiklis arba kitas priedas, reikėtų atsižvelgti į tokias jo charakteristikas: poveikį absorbcijai, pasiskirstymui, medžiagų apykaitai ir bandomosios medžiagos sulaikymui arba išskyrimui; poveikį bandomosios medžiagos cheminėms savybėms, dėl kurių gali pasikeisti jos toksiškumo charakteristikos; poveikį maisto ar vandens suvartojimui arba gyvūnų įmitimui. Nešiklis turi neturėti toksiškumo vystymuisi ir dauginimuisi.

1.6.3. **Dozavimas**

Paprastai bandomosios medžiagos reikėtų duoti kasdien nuo implantacijos dienos (pvz., 5 paros po suporavimo) ir baigti dieną prieš numatytą cezario pjūvį. Jei išankstiniai bandymai, jei turimi jų duomenys, nerodo, kad yra didelė ikiimplantacinių nuostolių tikimybė, bandymą galima pratęsti ir įtraukti visą gestacijos laikotarpį nuo suporavimo iki vienos paros prieš numatytą numarinimą. Gerai žinoma, kad netinkamas elgesys su gyvūnais arba stresas gestacijos metu gali būti prenatalinio vados netekimo priežastimi. Siekiant apsisaugoti nuo prenatalinio vados netekimo dėl veiksnių, nesusijusių su bandomąja medžiaga, reikėtų be reikalo netrikdyti patelių arba vengti išorinių veiksnių sukeliamo streso, pvz., triukšmo.

Turi būti naudojamos mažiausiai trys skirtingų dozių bandomosios grupės ir lygiagrečiai viena kontrolinė grupė. Sveiki gyvūnai paskirstomi atsitiktiniu būdu į kontrolinę ir bandomųjų gyvūnų grupes. Dozės dydžiai turėtų skirtis taip, kad jų toksinį poveikį būtų galima sugraduoti. Jei nėra apribojimų dėl fizikinių ir cheminių arba biologinių bandomosios medžiagos savybių, didžiausia dozė pasirenkama tokia, kad būtų sukeltas tam tikras toksinis poveikis vystymuisi ir (arba) patelei (klinikiniai požymiai arba kūno masės mažėjimas), bet ne žūtį arba sunkias kančias. Mažiausiai viena tarpinė dozė turėtų sukelti mažiausią pastebimą toksinį poveikį. Mažiausia dozė neturėtų sukelti jokio toksinio poveikio patelei arba vaisiaus vystymuisi. Turi būti pasirinkta tokia mažėjanti dozės dydžių seka, kad būtų pastebėtas kiekviena su dozės dydžiu susieta reakcija ir nepastebėto neigiamo poveikio riba (NOAEL). Mažėjančioms dozės dydžio vertėms nustatyti dažnai pakanka dvigubo arba keturgubo koncentracijos skirtumo; tačiau norint naudoti labai didelius intervalus tarp dozių (pvz., daugiklis didesnis kaip 10), dažnai gerai būtų pridėti ketvirtą bandymo grupę. Nors bandymo tikslas – nustatyti patelių NOAEL, gali būti priimtini ir tie bandymai, kuriais tokia dozė nenustatoma (1).

Dozių dydžiai pasirenkami atsižvelgiant į visus turimus toksiškumo duomenis ir papildomą informaciją apie bandomosios medžiagos arba giminingų medžiagų apykaitą ir toksikokinetiką. Be to, ši informacija padės pagrįsti dozavimo režimo tinkamumą.

Lygiagrečiai naudojama kontrolinė grupė. Ši grupė turėtų būti medžiagos negaunanti kontrolinė grupė arba nešiklį gaunanti kontrolinė grupė, jei bandomajai medžiagai duoti naudojamas nešiklis. Visoms grupėms turėtų būti duodamas vienodas bandomosios medžiagos arba nešiklio tūris. Kontrolinės (-ių) grupės (-ių) gyvūnai prižiūrimi tokiu pat būdu, kaip ir bandymo grupės gyvūnai. Nešiklio kontrolinės grupės turėtų gauti nešiklio kiekį, atitinkanti didžiausią naudoj amą kiekį (kokį gauna mažiausia doze veikiama grupė).

▼C1

1.6.4. **Ribinis bandymas**

Jei darant bandymą pagal šiame bandymo aprašyme nurodytą metodiką su viena per virškinamąjį traktą duodama mažiausiai 1 000 mg/kg kūno masės per parą doze, toksinis poveikis vaikingai patelei arba jos palikuonims nepastebimas ir jei toks poveikis nenumatomas, atsižvelgiant į turimus duomenis (pvz., gimininges struktūros ir (arba) apykaitos junginių duomenis), nebūtina daryti viso bandymo naudojant tris dozių dydžius. Atsižvelgiant į tikėtiną žmonių sąlytį su medžiaga, ribiniam bandymui gali tekti naudoti didesnes dozes per virškinamąjį traktą. Kalbant apie kitus davimo būdus, pvz., įkvėpimą arba veikimą per odą, bandomosios medžiagos fizikinės ir cheminės savybės dažnai gali lemti ir riboti didžiausią galimą dozę (pvz., dėjimas ant odos neturi sukelti sunkaus vietinio toksinio poveikio).

1.6.5. **Dozių davimas**

Bandomoji medžiaga arba nešiklis paprastai duodamas per virškinamąjį traktą, naudojant zondą. Jei naudojamas kitas davimo būdas, bandymų laboratorija turėtų pagrįsti sprendimą ir nurodyti pasirinkimo priežastis, be to, padaryti atitinkamus būtinus pakeitimus (2)(3)(4). Bandomoji medžiaga turėtų būti duodama kiekvieną dieną maždaug tuo pačiu metu.

Dozė kiekvienam gyvūnui paprastai turėtų būti nustatoma atsižvelgiant į patį paskutinį jo svėrimą. Tačiau reikia atsargiai reguliuoti dozės dydį paskutinį gestacijos trimestrą. Dozė pasirenkama atsižvelgiant į turimus duomenis, kad būtų išvengta per didelio toksinio poveikio patelei. Tačiau jei pastebima, kad toksinis poveikis patelėms yra per didelis, jos turi būti humaniškai numarinamos. Jei per didelio toksiškumo požymiai pasireiškia kelioms vaikingoms patelėms, reikėtų apsvarstyti visos šios dozės grupės numarinimo klausimą. Kai bandomoji medžiaga duodama per zondą, gyvūnams turėtų būti duodama tik viena dozė, naudojant skrandžio zondą arba tinkamą intubacinį vamzdelį. Didžiausias gyvūnui duodamas vienkartinis skysčio tūris priklauso nuo bandomo gyvūno dydžio. Tūris neturi būti didesnis kaip 1 ml/100 g kūno masės, išskyrus vandeninius tirpalus, kurių galima duoti po 2 ml/100 g kūno masės. Jei kaip nešiklis naudojamas kukurūzų aliejus, tūris neturėtų būti didesnis kaip 0,4 ml/100 g kūno masės. Bandomojo tirpalo tūrio nepastovumas turi būti kiek įmanoma sumažintas, keičiant koncentraciją taip, kad visų dozių tūris būtų pastovus.

1.6.6. **Patelių stebėjimas**

Klinikiniai stebėjimai ir užrašai daromi mažiausiai kartą per dieną, geriau kasdien tuo pačiu laiku, atsižvelgiant į didžiausio laukiamo poveikio pasireiškimo laiką po medžiagos davimo. Užrašoma gyvūnų būklė, įskaitant gaištamumą, liguistumą, atitinkamus elgesio pokyčius ir visus akivaizdžius toksiškumo požymius.

1.6.7. **Kūno masė ir maisto suvartojimas**

Gyvūnai sveriami 0 gestacijos dieną arba ne vėliau kaip 3 gestacijos dieną, jei suporuoti gyvūnai tiekiami iš išorinio veislyno, pirmąją dozavimo dieną, mažiausiai kas 3 dieną dozavimo laikotarpiu ir numatyto numarinimo dieną.

▼C1

Maisto suvartojimas turėtų būti registruojamas kas tris paras ir turi sutapti su kūno masės nustatymu.

1.6.8. **Nekroskopija**

Patelės numarinamos dieną prieš numatomą atsivedimą. Patelės, kurioms prieš numatomą numarinimą pasireiškia persileidimo arba priešlaikinio atsivedimo požymiai, turėtų būti numarinamos ir atliekamas išsamus jų makroskopinis tyrimas.

Numarintai arba darant bandymą nugaišusiai patelei turėtų būti daromas makroskopinis tyrimas visoms struktūros anomalijoms arba patologiniams pakitimams nustatyti. Darant cezario pjūvį ir vėlesnį vaisiaus tyrimą, pateles geriau būtų vertinti nežinant bandymo grupės, kad būtų kiek įmanoma sumažintas subjektyvumas.

1.6.9. **Gimdos turinio tyrimas**

Iš karto po numarinimo arba kiek įmanoma greičiau po patelės nugaišimo gimda išimama ir patvirtinamas gestacijos faktas. Gimdos, kuriose nėra gestacijos požymių, turėtų būti papildomai tiriamos (pvz., graužikų atveju dažant amonio sulfidu arba Salewski metodu arba taikant kitą metodą triušiams) siekiant patvirtinti, kad nėra gestacijos (5).

Gimdos su vaisiumi, įskaitant kaklelį, pasveriamos. Gyvūnų, nugaišusių atliekant bandymą, gimdos su vaisiumi nesveriamos.

Turėtų būti nustatytas vaikingų patelių geltonkūnių (*corpora lutea*) skaičius.

Gimdos turinys tiriamas gemalo arba žuvusių ir gyvybingų vaisių skaičiui nustatyti. Turėtų būti apibūdintas resorbcijos laipsnis, siekiant nustatyti santykinį apvaisinto kiaušinėlio žūties laiką (žr. 1.2 skirsnį).

1.6.10. **Vaisių tyrimas**

Nustatoma kiekvieno vaisiaus masė ir lytis.

Tiriami kiekvieno vaisiaus išoriniai pakitimai (6).

Reikėtų ištirti vaisiaus griaučių ir minkštųjų audinių pakitimus (pvz., nukrypimus ir išsigimimus arba anomalijas) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Pageidautina, bet nereikalaujama klasifikuoti vaisiaus pakitimus. Jei daroma klasifikacija, turi būti aiškiai nurodyti kiekvienos kategorijos apibrėžimo kriterijai. Ypatingą dėmesį reikėtų atkreipti į dauginimosi trakto pakitimų požymius.

Kiekvienos graužikų vados pusė paruošiama griaučių pakitimams tirti. Likusi dalis paruošiama minkštų audinių pakitimų tyrimui ir jie tiriami taikant priimtus arba tinkamus serijinių pjūvių metodus arba kruopštaus bendrojo nekroskopijos metodus.

▼C1

Jei naudojami ne graužikai, pvz., triušiai, tiriami visi vaisiai minkštų audinių ir griaučių pakitimams nustatyti. Vaisių kūnai įvertinami darant išsamią nekroskopiją minkštų audinių pakitimams nustatyti, be to, gali būti įtrauktos metodikos papildomai įvertinti širdies vidinę struktūrą (25). Nupjaunama pusė tokiu būdu ištirtų vaisių galvų, kurios apdorojamos siekiant įvertinti minkštųjų audinių (įskaitant akis, smegenis, nosies kanalus ir liežuvį) pakitimus, taikant standartinius serijinių pjūvių metodus (26) arba tokio paties jautrumo metodą. Šių vaisių kūnai ir likę sveiki vaisiai apdorojami ir tiriami jų griaučių pakitimai, taikant tuos pačius metodus, kurie aprašyti graužikams.

2. **DUOMENYS**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Duomenys pateikiami atskirai apie kiekvieną patelę bei jų palikuonis ir apibendrinami lentelėse, kuriose nurodomas kiekvienos bandymo grupės ir kiekvienos kartos gyvūnų skaičius bandymo pradžioje, darant bandymą nugaišusių arba dėl gyvūnų gerovės priežasčių numarintų gyvūnų skaičius, visų gyvūnų žūties arba numarinimo laikas, vaikingų patelių skaičius, toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičius, pastebėtų toksiškumo požymių aprašymas, įskaitant pradžios laiką, trukmę ir bet kokio toksinio poveikio sunkumą, atlikti gemalo ar vaisiaus stebėjimo būdai ir visi atitinkami vados duomenys.

Skaitmeniniai rezultatai turi būti įvertinti taikant atitinkamą statistinį metodą, naudojant vadą kaip duomenų analizės statistinį vienetą. Turi būti taikomas visuotinai priimtas statistinis metodas; statistiniai metodai pasirenkami kaip bandymo schemos dalis ir turi būti pagrįsti. Turėtų būti pateikti duomenys apie gyvūnus, kurie neišgyveno iki numatyto numarinimo laiko. Prireikus šie duomenys gali būti naudojami grupių vidutinėms vertėms apskaičiuoti. Duomenų apie tokius gyvūnus tinkamumas ir jų įtraukimas arba neįtraukimas į kurios nors grupės vidurkį (-ius) turi būti pagrįstas ir sprendimas dėl jo priimamas kiekvienu atskiru atveju.

2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS

Toksiškumo prenataliniam vystymuisi bandymas įvertinamas atsižvelgiant į pastebėtą poveikį. Įvertinimą turi sudaryti ši informacija:

— patelės ir gemalo ar vaisiaus bandymo rezultatai, įskaitant ryšį tarp gyvūno veikimo bandomąja medžiaga ir bet kokio stebimo poveikio dažnumo ir sunkumo, arba tokio ryšio nebuvimą,

— kriterijai, taikyti vaisiaus išorės, minkštųjų audinių ir griaučių pakitimams klasifikuoti, jei buvo klasifikuojama,

▼C1

— prireikus, ankstesni duomenys apie kontrolinius gyvūnus bandymo rezultatų interpretavimui pagerinti,

— skaičiai, naudoti visoms procentinėms dalims arba rodikliams apskaičiuoti,

— atitinkama bandymo rezultatų statistinė analizė, jei reikia, kurioje pakaktų informacijos apie analizės metodą, kad nepriklausomas ekspertas ar statistikos specialistas galėtų iš naujo įvertinti bei atkurti analizės eigą.

Visuose bandymuose, kuriuos atlikus nepastebėta jokio toksinio poveikio, turėtų būti numatyti papildomi bandymai bandomosios medžiagos absorbcijai ir biologiniam kaupimuisi nustatyti.

2.3. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Toksiškumo prenataliniam vystymuisi bandymas suteiks informacijos apie poveikį patelėms gestacijos metu ir jų palikuonių vystymuisi gimdoje dėl kartotinio veikimo medžiaga. Bandymo rezultatus reikėtų interpretuoti atsižvelgiant į rezultatus, gautus darant pusiau lėtinio toksiškumo, toksiškumo dauginimuisi ir toksikokinetinius bandymus. Kadangi akcentuojamas ir bendrasis toksiškumas (toksinis poveikis patelėms), ir toksiškumas vystymuisi, bandymo rezultatai leis tam tikru laipsniu atskirti poveikį vystymuisi, kai nėra bendro toksiškumo, ir poveikį, kuris sukeliamas tik esant koncentracijai, kuri yra toksiška patelei (27).

3. **ATASKAITOS RENGIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Ataskaitą turi sudaryti ši konkreti informacija:

Bandomoji medžiaga:

— fizikinė būsena ir, jei reikia, fizikės ir cheminės savybės,

— tapatumas, įskaitant CAS numerį, jei žinomas ar priskirtas,

— grynumas.

Nešiklis (jei naudojamas):

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei tai ne vanduo.

Bandomieji gyvūnai:

— naudota rūšis ir veislė,

— gyvūnų skaičius ir amžius,

— šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.,

— atskirai kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje.

Bandymo sąlygos:

— dozės koncentracijos pasirinkimo pagrindimas,

— išsami informacija apie bandomosios medžiagos preparato ruošimą arba jos dėjimą į pašarą, gauta koncentracija, preparato stabilumas ir vienalytiškumas,

▼C1

— išsami informacija apie bandomosios medžiagos davimą,

— bandomosios medžiagos koncentracijos pašare ar geriamajame vandenyje (ppm) perskaičiavimas į tikrąją dozę (mg/kg kūno masės per parą), jei taikoma,

— aplinkos sąlygos,

— išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę.

Rezultatai:

Toksiškumo patelei duomenys atsižvelgiant į dozę, įskaitant šiuos, bet jais neapsiribojant:

— gyvūnų skaičius bandymo pradžioje, išgyvenusių gyvūnų skaičius, vaikingų patelių skaičius, persileidimų ir priešlaikinių atsivedimų skaičius,

— žūties darant bandymą diena arba iki numarinimo išgyvenusių gyvūnų skaičius,

— duomenys apie gyvūnus, neišgyvenusius iki numatyto numarinimo, užregistruojami, bet neįtraukiami į statistinį grupių palyginimą,

— visų anomalių klinikinių požymių pastebėjimo diena ir jų vėlesnė eiga,

— kūno masė, kūno masės kitimas ir gimdos su vaisiumi masė, įskaitant, neprivalomai, kūno masės kitimą su gimdos su vaisiumi masės pataisa,

— pašaro suvartojimas ir, jei matuotas, vandens suvartojimas,

— nekroskopijos rezultatai, įskaitant gimdos masę,

— NOAEL vertės: poveikio patelei ir poveikio vystymuisi.

Toksiškumo vystymuisi duomenys pagal dozę vadoms su implantais, įskaitant:

— geltonkūnių skaičių,

— implantacijų skaičių, gyvų ir žuvusių vaisių bei resorbcijų skaičių ir procentinę dalį,

— priešimplantacinių ir poimplantacinių nuostolių skaičių ir procentinę dalį.

Toksiškumo vystymuisi duomenys pagal dozę vadoms su gyvais vaisiais, įskaitant:

— gyvų palikuonių skaičių ir procentinę dalį,

— lyčių santykį,

— vaisių kūno masę, pageidautina pagal lytį ir abiejų lyčių kartu,

— išorinius, minkštųjų audinių ir griaučių išsigimimus ir kitus svarbius pakitimus,

— klasifikavimo kriterijus, jei taikomi,

▼C1

— vaisių ir vadų, turinčių kokių nors išorinių, minkštųjų audinių arba griaučių pakitimų, visą skaičių ir procentinę dalį, be to, atskirų anomalijų ir kitų atitinkamų pakitimų tipus ir dažnumą.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

4. **NUORODOS**

1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; p. 399–410.

2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; p. 386–398.

3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; p. 1–8.

4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie*, p. 247–367.

6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; p. 171–173.

8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; p. 381–391.

9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47, p. 229–242.

10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; p. 476.

11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127, p. 291–306.

12) Fritz, h. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; p. 313–320.

13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; p. 398–408.

14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; p. 309–316.

15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; p. 169–181.

▼C1

16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual*, p. 163–173.

17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; p. 411–445.

18) Staples, RE. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; p. 61–63.

19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; p. 313–355.

20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; p. 181–188.

21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton*. Thomas, Springfield, IL.

22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques*, Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, p. 251–277.

23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology*, Vol. 4. Plenum, NY.

24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung*. 28; p. 233–239.

25) Staples, RE. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; p. 37–38.

26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, h.J. and Kwasigroch, TE. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, p. 126–144.

27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798–63826.

28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; p. 249–292.

▼M4

B.32. KANCEROGENIŠKUMO TYRIMAI

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka OECD „Test Guideline“ (TG) 451 (OECD bandymo gairės Nr. 451) (2009). Originalios kancerogeniškumo bandymo gairės TG 451 priimtos 1981 m. Šis atnaujintasis B.32 bandymo metodas parengtas atsižvelgiant į poreikį įvertinti naujausius pasiekimus gyvūnų gerovės srityje ir norminių reikalavimų pasikeitimus (2) (3) (4) (5) (6). B.32 bandymo metodas buvo atnaujinamas kartu su šio priedo B.30 skyriumi „Lėtinio toksiškumo tyrimai“ ir šio priedo B.33 skyriumi „Jungtiniai lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimai“, siekiant gauti papildomos informacijos remiantis per tyrimą naudotais gyvūnais ir pateikti išsamesnių rekomendacijų dėl dozės parinkimo. B.32 bandymo metodas skirtas taikyti bandant labai įvairias chemines medžiagas, įskaitant pesticidus ir pramonines chemines medžiagas. Reikėtų atkreipti dėmesį, kad kai kurios vaistams taikytinos išsamios nuostatos ir reikalavimai gali skirtis (žr. Tarptautinės konferencijos dėl suderinimo (ICH) Vaistų kancerogeniškumo bandymų gaires S1B).

2. Daugelis kancerogeniškumo tyrimų atliekami naudojant graužikų rūšis, todėl šis metodas pirmiausia taikytinas tyrimams, atliekamiems naudojant šias rūšis. Jeigu tokius tyrimus reikėtų atlikti naudojant ne graužikų rūšis, jiems turėtų būti taikomi aprašant šį bandymo metodą ir šio priedo B.27 skyriuje „90 dienų kartotinės dozės toksiškumo per virškinamąjį traktą ne graužikams tyrimas“ (6) išdėstyti principai ir procedūros su atitinkamais pakeitimais. Daugiau patarimų pateikta OECD rekomendaciniame dokumente Nr. 116 dėl lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimų planavimo ir atlikimo (7).

3. Atliekant kancerogeniškumo tyrimus, dozė paprastai gali būti duodama trimis būdais – per burną, per odą ir per kvėpavimo takus. Dozės davimo būdas parenkamas atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos fizines ir chemines savybes ir labiausiai paplitusį poveikio žmonėms būdą. Daugiau informacijos apie poveikio būdo parinkimą pateikta OECD rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7).

4. Šis bandymo metodas iš esmės skirtas poveikio per virškinamąjį traktą būdui, nes šis būdas dažniausiai taikomas atliekant kancerogeniškumo tyrimus. Norint įvertinti žmonių sveikatai gresiančią riziką ir (arba) laikantis tam tikros reglamentavimo tvarkos gali reikėti atlikti kancerogeniškumo tyrimus, per kuriuos dozė būtų duodama per odą ir kvėpavimo takus, tačiau techniniu požiūriu abu poveikio būdai yra gana sudėtingi. Šie tyrimai turės būti planuojami atsižvelgiant į konkretų atvejį, tačiau čia aprašytu bandymo metodu, skirtu įvertinti kancerogeniškumą, kai dozė duodama per burną, gali būti remiamasi rengiant inhaliacinių ir (arba) odinių tyrimų protokolą, atsižvelgiant į rekomendacijas dėl poveikio laikotarpių, klinikinių ir patologinių parametrų ir t. t. Yra parengtos OECD rekomendacijos dėl bandomųjų cheminių medžiagų dozių davimo per odą (7) ir kvėpavimo takus (7) (8). Planuojant ilgesnius tyrimus, per kuriuos dozės duodamos per kvėpavimo takus, pirmiausia turėtų būti remiamasi šio priedo B.8 skyriumi (9) ir šio priedo B.29 skyriumi (10), taip pat OECD rekomendaciniu dokumentu dėl ūmaus poveikio įkvėpus bandymų (8). Jeigu bandymai atliekami taikant poveikio per odą būdą, turėtų būti remiamasi šio priedo B.9 skyriumi (11).

▼M4

5. Atliekant kancerogeniškumo tyrimą gaunama informacijos apie galimus pavojus sveikatai, galinčius kilti dėl kartotinio poveikio laikotarpiu, kuris gali atitikti ir visą naudojamos rūšies gyvūnų gyvenimo trukmę. Tyrimas suteikia informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos toksinį poveikį, įskaitant galimą kancerogeniškumą, ir gali padėti nustatyti tikslinius organus bei kaupimosi galimybę. Be to, jis gali padėti apytiksliai nustatyti nepastebimo neigiamo poveikio lygį, susijusį su toksiniu negenotoksinių kancerogenų poveikiu ir auglių sukėlimu; šis įvertis gali būti naudojamas nustatant saugaus poveikio žmonėms kriterijus. Taip pat pabrėžiamas gyvūnų kruopščių klinikinių stebėjimų būtinumas, kad būtų gauta kuo daugiau informacijos.

6. Pagal šį bandymo metodą atliekamų kancerogeniškumo tyrimų tikslai:

— nustatyti kancerogenines bandomosios cheminės medžiagos savybes, dėl kurių dažniau atsiranda neoplazmų, didėja piktybinių neoplazmų santykinė dalis arba trumpėja neoplazmų atsiradimo laikas, palyginti su vienalaikės kontrolės grupėmis,

— kancerogeninio poveikio tikslinio (-ų) organo (-ų) nustatymas,

— neoplazmų atsiradimo laiko nustatymas,

— auglius sukeliančios dozės ir reakcijos tarpusavio priklausomybės apibūdinimas,

— nepastebimo neigiamo poveikio lygio (NNPL) arba orientacinės dozės (OD) nustatymo pagrindo nustatymas,

— kancerogeninio poveikio ekstrapoliavimas siekiant nustatyti mažiausiosios dozės poveikio žmonėms lygius,

— duomenų teikimas rengiant bandymų hipotezes dėl veikimo būdo (2) (7) (12) (13) (14) (15).

PIRMINIAI ASPEKTAI

7. Vertindama galimą bandomosios cheminės medžiagos kancerogeniškumą, bandymų laboratorija, prieš atlikdama tyrimą, turėtų apsvarstyti visą turimą informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą, kad planuojant tyrimą pirmiausia būtų siekiama padidinti kancerogeniškumo tyrimo veiksmingumą ir sumažinti gyvūnų naudojimą. Labai svarbu turėti informacijos apie numanomo kancerogeno veikimo būdą ir atsižvelgti į šią informaciją (2) (7) (12) (13) (14) (15), nes tinkamiausio plano parinkimas gali priklausyti nuo, ar bandomoji cheminė medžiaga yra žinoma arba įtariama kaip kancerogeninė. Daugiau patarimų, susijusių su veikimo būdo aspektais, pateikta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7).

8. Parengti tyrimo planą padės informacija apie bandomosios cheminės medžiagos tapatumą, cheminę struktūrą, fizines ir chemines savybes, toksiškumo bandymų *in vitro* arba *in vivo*, įskaitant genotoksiškumo tyrimus, rezultatai, numatomas (-i) panaudojimo būdas (-ai) ir galimas poveikis žmogui, turimi (Q)SAR duomenys ir mutageniškumo ir (arba) genotoksiškumo, kancerogeniškumo ir kiti toksikologiniai duomenys apie panašios struktūros chemines medžiagas, turimi toksikokinetiniai duomenys (vienos dozės ir, jeigu yra, kartotinės dozės kinetinės savybės) ir duomenys, gauti

▼M4

atlikus kitus kartotinio poveikio tyrimus. Kancerogeniškumo vertinimas turėtų būti atliekamas tik gavus pirminės informacijos apie toksiškumą, pagrįstos 28 dienų ir (arba) 90 dienų kartotinės dozės toksiškumo bandymais. Be to, naudingos informacijos gali suteikti trumpalaikiai piktybinių auglių sukėlimo ir paskatinimo bandymai. Atliekant bendrąjį konkrečios bandomosios cheminės medžiagos galimo neigiamo poveikio sveikatai vertinimą, turėtų būti apsvarstyta galimybė taikyti etapinį kancerogeniškumo bandymo metodą (16) (17) (18) (19).

9. Prieš pradedant tyrimą, atsižvelgiant į bandymo planą ir tikslus, turėtų būti nustatyti tinkamiausi statistiniai rezultatų analizės metodai. Turėtų būti apsvarstyta, ar rengiant statistinius duomenis turėtų būti atlikta pataisa atsižvelgiant į išgyvenimo rodiklius, kaupiamosios auglių rizikos ir jos ryšio su išgyvenimo trukme analizė ir analizė pirmalaikio vienos arba daugiau grupių pašalinimo atveju. Rekomendacijų dėl tinkamos statistinės analizės ir pagrindinės informacijos apie tarptautiniu mastu pripažintus statistinius metodus pateikta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7), taip pat rekomendaciniame dokumente Nr. 35 dėl lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimų analizės ir vertinimo (20).

10. Atliekant kancerogeniškumo tyrimą, visada turėtų būti atsižvelgiama į pagrindinius principus ir aspektus, išdėstytus OECD rekomendaciniame dokumente Nr. 19 dėl klinikinių požymių, kaip pasekmių žmonėms, pasireiškimo vertinant saugumą naudojamiems bandomiesiems gyvūnams pripažinimo, vertinimo ir taikymo (21), pirmiausia jo 62 skirsnyje. Tame skirsnyje teigiama: *„Jeigu per kartotinės dozės tyrimus gyvūnams pasireiškia klinikinių požymių, kurie progresuoja ir dėl kurių toliau prastėja sveikatos būklė, turėtų būti priimtas informacija pagrįstas sprendimas, ar nereikėtų humaniškai numarinti gyvūno. Priimant sprendimą turėtų būti atsižvelgiama į informacijos, kuri būtų gauta tęsiant tyrimą su šiuo gyvūnu, vertės ir šio gyvūno bendrosios būklės santykį. jeigu nusprendžiama tęsti bandymą su šiuo gyvūnu, atsižvelgiant į poreikį, turėtų būti padidintas stebėjimų dažnumas. Be to, galbūt būtų įmanoma labai nepakenkiant bandymo tikslui laikinai nutraukti dozės davimą, jeigu dėl to sumažėtų skausmas ar kančia, arba sumažinti bandomąją dozę.“*

11. Išsamių rekomendacijų dėl dozės parinkimo lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimams principų ir jų svarstymų pateikta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7), taip pat Tarptautinio gamtos mokslų instituto leidiniuose (22) (23). Pagrindinė dozės parinkimo strategija priklauso nuo tyrimo pagrindinio tikslo arba tikslų (6 skirsnis). Parenkant tinkamus dozių dydžius, pavojų atranka turėtų būti vykdoma atsižvelgiant į mažų dozių sukeliamas reakcijas ir į tų pavojų reikšmę. Tai ypač svarbu tada, kai ketinama atlikti jungtinį lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimą (šio priedo B.33 skyrius) (12 skirsnis).

12. Turėtų būti apsvarstyta galimybė atlikti jungtinį lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimą (šio priedo B.33 skyrius), o ne atskirai atlikti lėtinio toksiškumo tyrimą (šio priedo B.30 skyrius) ir kancerogeniškumo tyrimą (šio priedo B.32 skyrius). Palyginti su dviem atskirais tyrimais, atliekant jungtinį bandymą užtikrinamas didesnis veiksmingumas laiko ir išlaidų požiūriu, neprarandant duomenų kokybės nei lėtinio poveikio, nei kancerogeniškumo bandymo etapu. Tačiau, atliekant jungtinį lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimą (šio priedo B.33 skyrius), turėtų būti kruopščiai apsvarstyti dozės parinkimo principai (11 ir 22–25 skirsniai); be to, pripažinta, kad pagal tam tikras reglamentavimo sistemas gali reikėti atlikti atskirus tyrimus.

▼M4

13. Aprašant šį bandymo metodą vartojamos apibrėžtys pateiktos šio skyriaus pabaigoje ir rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7).

BANDYMO PRINCIPAS

14. Bandomoji cheminė medžiaga kasdien, paprastai per burną, skirtingomis dozėmis duodama kelioms bandomųjų gyvūnų grupėms didžiąją jų gyvenimo trukmės dalį. Taip pat gali būti atliekami bandymai dozę duodant per kvėpavimo takus arba per odą. Atidžiai stebima, ar gyvūnams nepasireiškė toksiškumo požymių ir ar neatsirado neoplastinių pakitimų. Bandymo metu nugaišę arba numarinti gyvūnai skrodžiami, o baigus bandymą numarinami ir skrodžiami išgyvenę gyvūnai.

METODO APRAŠYMAS

Gyvūnų rūšies parinkimas

15. Šis bandymo metodas pirmiausia taikomas vertinant kancerogeniškumą graužikams (2 skirsnis). Galimybė naudoti ne graužikų rūšis gali būti svarstoma, jeigu turimi duomenys rodo, kad jie tinkamesni prognozuoti poveikį žmonių sveikatai. Gyvūnų rūšies pasirinkimas turėtų būti pagrįstas. Tinkamiausia graužikų rūšis yra žiurkės, bet galima naudoti ir kitų rūšių graužikus, pvz., peles. Nors pelių naudojimas atliekant kancerogeniškumo bandymus gali būti nelabai naudingas (24) (25) (26), pagal kai kurias dabartines reglamentavimo programas kancerogeniškumo bandymai naudojant peles vis dar yra būtini, jeigu nenustatoma, kad toks tyrimas moksliniu požiūriu nėra būtinas. Žiurkės ir pelės yra tinkamiausi bandomieji gyvūnai, nes jų gyvenimo trukmė palyginti trumpa, jos plačiai naudojamos atliekant farmakologinius ir toksikologinius tyrimus, jos jautrios auglių sukėlimui, yra pakankami gerai aprašytų padermių. Atsižvelgiant į šias savybes, yra daug informacijos apie jų fiziologiją ir patologiją. Daugiau informacijos apie gyvūnų rūšies ir padermės pasirinkimą pateikta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7).

16. Turėtų būti naudojami sveiki, jauni, bet suaugę plačiai naudojamų laboratorinių padermių gyvūnai. Pageidautina, kad kancerogeniškumo tyrimai būtų atliekami naudojant tos pačios padermės ir iš to paties šaltinio gautus gyvūnus, kokie buvo naudojami per trumpesnį (-ius) išankstinį (-ius) toksiškumo tyrimą (-us), tačiau, jeigu žinoma, kad naudojant šios padermės ir iš šio šaltinio gautus gyvūnus sunku įgyvendinti per ilgesnės trukmės tyrimus paprastai taikomus išgyvenimo kriterijus [žr. rekomendacinį dokumentą Nr. 116 (7)], turėtų būti svarstoma galimybė naudoti tokią gyvūnų padermę, kurios išgyvenimo per ilgesnės trukmės tyrimą rodiklis būtų priimtinas. Patelės turėtų būti dar be vados ir neapvaisintos.

Laikymas ir šėrimas

17. Gyvūnai gali būti laikomi po vieną arba mažomis tos pačios lyties grupėmis; galimybė laikyti gyvūnus po vieną turėtų būti svarstoma tik tuo atveju, jeigu tai moksliškai pagrįsta (27) (28) (29). Narveliai turėtų būti išdėstyti taip, kad galimas narvelių išdėstymo poveikis tyrimo rezultatams turėtų būtų kuo mažesnis. Bandomųjų gyvūnų laikymo patalpos temperatūra turėtų būti 22 °C (± 3 °C). Nors santykinis drėgnis turėtų būti ne mažesnis kaip 30 % ir, pageidautina, ne didesnis kaip 70 % (išskyrus patalpų valymo metą), turėtų būti siekiama palaikyti 50–60 % santykinį drėgnį. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, taikant 12 h šviesos ir 12 h tamsos seką. Gyvūnams šerti

▼M4

tinka įprastas laboratorijose naudojamas pašaras, neribojant geriamojo vandens kiekio. Šėrimo režimas turėtų atitikti visus bandomųjų gyvūnų rūšies mitybos reikalavimus; pašaro sudėtyje turėtų būti kuo mažiau teršalų, įskaitant (be kitų teršalų) pesticidų likučius, patvariuosius organinius teršalus, fitoestrogenus, sunkiuosius metalus ir mikotoksinus. Turėtų būti periodiškai – bent pradedant tyrimą ir pasikeitus naudojamai partijai – parengiama analitinė informacija apie pašarines medžiagas ir pašaro sudėtyje esančių teršalų lygius; ši informacija turėtų būti pateikta galutinėje ataskaitoje. Turėtų būti rengiama atitinkama analitinė informacija apie tyrimo metu naudojamą geriamąjį vandenį. Pašaro parinkimui gali turėti įtakos poreikis tinkamai įmaišyti bandomąją cheminę medžiagą ir laikytis gyvūnų mitybos reikalavimų, kai bandomoji cheminė medžiaga duodama su pašaru.

Gyvūnų paruošimas

18. Turėtų būti naudojami sveiki gyvūnai, ne trumpiau kaip septynias paras pratinti prie laboratorinių sąlygų ir anksčiau nenaudoti kitiems bandymams. Jeigu naudojami graužikai, dozė gyvūnams turėtų būti pradedama duoti kaip galima anksčiau po atjunkymo ir pripratinimo, pageidautina, ne vėliau nei gyvūnams sueina aštuonios savaitės. Gyvūnai turėtų būti apibūdinti nurodant rūšį, padermę, šaltinį, lytį, masę ir amžių. Pradedant tyrimą kiekvienos lyties gyvūnų kūno masės skirtumai turi būti kuo mažesni ir pagal kiekvieną lytį nenukrypti nuo visų tyrime dalyvaujančių gyvūnų kūno masės vidurkio daugiau kaip ± 20 %. Gyvūnai turėtų būti atsitiktine tvarka suskirstyti į kontrolines ir bandomąsias grupes. Gyvūnus suskirsčius atsitiktine tvarka, grupių vidutinės kūno masės pagal lytį neturėtų smarkiai skirtis. Jeigu yra statistiniu požiūriu didelių skirtumų, atsitiktinis suskirstymo etapas turėtų būti pakartotas (jeigu tai įmanoma). Kiekvienam gyvūnui turėtų būti suteiktas unikalus identifikavimo numeris, kuriuo gyvūnas visam laikui pažymimas jį ištatuiruojant, implantuojant mikroschemą arba kitu tinkamu būdu.

PROCEDŪRA

Gyvūnų skaičius ir lytis

19. Turėtų būti naudojami abiejų lyčių gyvūnai. Turėtų būti naudojama pakankamai gyvūnų, kad būtų galima atlikti išsamią biologinę ir statistinę analizę. Todėl kiekvienoje dozę gaunančioje ir vienalaikės kontrolės grupėje turėtų būti ne mažiau kaip po 50 kiekvienos lyties gyvūnų. Atsižvelgiant į tyrimo tikslą, gali būti įmanoma padidinti statistinį pagrindinių įverčių patikimumą nevienodai suskirstant gyvūnus į įvairių dydžių dozėms skirtas grupes, mažiausiajai dozei skirtas grupes sudarant iš daugiau kaip 50 gyvūnų, pvz., kad būtų galima apytikriai įvertinti kancerogeniškumą duodant mažiausiąsias dozes. Tačiau reikėtų pripažinti, kad nedaug padidinus grupės dydį tyrimo statistinis patikimumas padidės gana nežymiai. Daugiau informacijos apie statistinį tyrimo planavimą ir dozių dydžių parinkimą siekiant kuo labiau padidinti statistinį patikimumą pateikta OECD rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7).

Rezervo sudarymas atsižvelgiant į gyvūnų marinimą nebaigus bandymo ir pagalbinių (kontrolinių) grupių sudarymas

20. Jeigu tai moksliškai pagrįsta, rengiantis tyrimui gali būti sudarytas rezervas atsižvelgiant į gyvūnų marinimą nebaigus bandymo, pvz., po 12 mėnesių, kad būtų galima gauti informacijos apie neoplastinių pakitimų vystymąsi ir mechanistinės informacijos. Jeigu tokios informacijos apie bandomąją cheminę medžiagą jau turima remiantis anksčiau atliktais kartotinės dozės toksiškumo tyrimais, gyvūnų marinimo nebaigus bandymo moksliškai pagrįsti negalima. Jeigu pagal tyrimo planą numatytas gyvūnų marinimas nebaigus bandymo, kiekvieno dydžio dozei skirtoje grupėje, kurioje numatytas gyvūnų marinimas nebaigus bandymo, paprastai turėtų būti po 10 kiekvienos lyties gyvūnų, o bendras pagal tyrimo planą numatytas gyvūnų skaičius turėtų būti padidintas numatomu iki tyrimo pabaigos numarinti gyvūnų skaičiumi. Gali būti numatyta papildoma kontrolinių gyvūnų grupė (paprastai – po penkis kiekvienos lyties gyvūnus), skirta prireikus stebėti ligos būklę tyrimo metu (30). Daugiau patarimų pateikta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7).

▼M4

Dozių dydžių grupės ir dozuotė

21. Rekomendacijos dėl visų aspektų, susijusių su dozių dydžių parinkimu ir dozių dydžių skirtumų nustatymu, pateiktos rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7). Turėtų būti taikomi ne mažiau kaip trys dozių dydžiai ir vienalaikė kontrolė. Dozių dydžiai paprastai grindžiami trumpesnio laikotarpio kartotinių dozių arba ribų nustatymo tyrimų rezultatais ir turėtų būti nustatomi atsižvelgiant į visus turimus toksikologinius ir toksikokinetinius duomenis apie bandomąją medžiagą arba panašias chemines medžiagas.

22. Jeigu dozė neturėtų būti ribojama atsižvelgiant į bandomosios medžiagos fizines ir chemines savybes arba biologinį poveikį, didžiausioji dozė turėtų būti parenkama tokia, kad būtų galima nustatyti pagrindinius tikslinius organus ir toksinį poveikį, nesukeliant kančios, sunkaus toksiškumo, liguistumo arba žūties. Atsižvelgiant į toliau 23 skirsnyje išdėstytus veiksnius, didžiausioji dozė paprastai turėtų būti parenkama tokia, kad ją taikant būtų sukeliami pastebimi toksiškumo požymiai, pvz., pasireiškiantys kūno masės prieaugio sumažėjimu (apie 10 %). Tačiau, atsižvelgiant į tyrimo tikslus (žr. 6 skirsnį), didžiausioji dozė gali būti parinkta mažesnė už dozę, kurią taikant būtų pastebimi toksiškumo požymiai, pvz., jeigu taikant dozę sukeliamas dominantis neigiamas poveikis, turintis nedidelės įtakos gyvenimo trukmei arba kūno masei.

23. Dozių dydžiai ir dozių dydžių skirtumai gali būti parinkti tokie, kad būtų galima nustatyti dozės ir reakcijos tarpusavio priklausomybę ir – atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos veikimo būdą – NNPL arba gauti kitokį siekiamą tyrimo rezultatą, pvz., nustatyti orientacinę dozę (OD) (žr. 25 skirsnį) taikant mažiausiąją dozę. Nustatant mažesniąsias dozes, turėtų būti atsižvelgiama į tokius veiksnius, kaip numatomas dozės ir reakcijos tarpusavio priklausomybės kreivės nuolydis, dozės, kurias taikant atsiranda reikšmingų metabolizmo arba toksinio poveikio būdo pokyčių, kai tikimasi gauti ribinę vertę arba atskaitos tašką mažiausiosios dozės ekstrapoliavimui.

24. Dozių dydžių skirtumai parenkami atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos savybes ir aprašant šį metodą negali būti iš anksto numatyti, tačiau tinkamas bandymų veiksmingumas dažnai užtikrinamas tada, kai nustatant mažėjančius dozių dydžius taikomi koeficientai nuo 2 iki 4; be to, jeigu taikomi labai dideli dozių dydžių skirtumai (pvz., taikomi didesni koeficientai nei 6–10), dažnai patartina naudoti ketvirtąją bandomąją grupę. Apskritai reikėtų vengti taikyti didesnius koeficientus nei 10; jeigu tokie taikomi, jie turėtų būti pagrindžiami.

25. Kaip išsamiau aptarta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7), konkrečios dozės turėtų būti nustatomos atsižvelgiant į tokius veiksnius:

— žinomus arba numanomus netiesiškumus arba dozės ir reakcijos tarpusavio priklausomybės kreivės išlinkio taškus,

— toksikokinetines savybes ir dozių intervalus, kuriuose pasireiškia metabolizmo paskatinimo, įsotinimo efektai arba išorinės ir vidinės dozių tarpusavio netiesiškumas, arba kuriuose nurodytųjų dalykų nepasireiškia,

— pirminius pakitimus, poveikio rodiklius arba pagrindinių aiškiai nepastebimų biologinių procesų veikimo požymius,

— pagrindinius (arba numanomus) veikimo būdo aspektus, pvz., dozes, kurias taikant pradeda reikštis citotoksiškumas, sutrikdomi hormonų lygiai, nustelbiami homeostaziniai mechanizmai ir t. t.,

▼M4

— dozės ir reakcijos tarpusavio priklausomybės kreivės sritis, kuriose būtina atlikti ypač tikslius vertinimus, pvz., numanomos orientacinės dozės (OD) arba numanomos ribinės vertės sritis,

— numanomus poveikio žmonėms lygius.

26. Kontrolinė grupė – tai dozės negaunančių gyvūnų grupė arba nešiklio kontrolės grupė, jeigu bandomajai cheminei medžiagai duoti naudojamas nešiklis. Išskyrus poveikį bandomąja chemine medžiaga, su kontrolinės grupės gyvūnais turėtų būti elgiamasi lygiai taip pat, kaip su bandomųjų grupių gyvūnais. Naudojant nešiklį, kontrolinės grupės gyvūnams duodamas didžiausias nešiklio tūris, skiriamas dozę gaunančioms grupėms. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga duodama su pašaru ir dėl prastesnio skonio gyvūnai suvartoja mažiau pašaro, gali būti naudinga pasitelkti papildomą kartu šeriamą kontrolinę grupę, kad būtų užtikrinta geresnė kontrolė.

Bandomosios cheminės medžiagos dozių paruošimas ir davimas

27. Bandomoji cheminė medžiaga paprastai duodama per burną, su pašaru ar geriamuoju vandeniu arba leidžiama zondu. Daugiau informacijos apie dozės davimo būdus ir metodus pateikta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7). Dozės davimo būdas ir metodas parenkami atsižvelgiant į tyrimo tikslą, fizines ir chemines bandomosios cheminės medžiagos savybes, jos biologinį įsisavinimą ir vyraujantį poveikio žmonėms būdą ir metodą. Pasirinktas dozės davimo būdas ir metodas turi būti pagrįsti. Gyvūnų gerovės sumetimais dozės leidimas zondu paprastai turėtų būti pasirenkamas tik duodant tokias chemines medžiagas, kurių davimo būdas ir metodas iš esmės atitinka galimą poveikio žmogui būdą ir metodą (pvz., duodant vaistus). Maisto produktuose arba aplinkoje esančios cheminės medžiagos, įskaitant pesticidus, paprastai duodamos su pašaru arba vandeniu. Tačiau tam tikrais atvejais, pvz., tiriant poveikį darbe, gali būti tinkamesni kiti dozės davimo būdai.

28. Prireikus bandomoji cheminė medžiaga ištirpinama arba pagaminama jos suspensija tinkamame nešiklyje. Reikėtų atsižvelgti į šias nešiklio ir kitų priedų savybes, jeigu taikytina: poveikį sugerčiai, pasiskirstymui, metabolizmui arba bandomosios cheminės medžiagos sulaikymui; poveikį bandomosios cheminės medžiagos cheminėms savybėms, dėl kurių gali pasikeisti jos toksiškumo savybės; poveikį maisto ar vandens suvartojimui arba gyvūnų įmitimui. Rekomenduojama, jeigu įmanoma, pirmenybę teikti vandeniniam tirpalui arba suspensijai, tada svarstyti galimybę naudoti aliejaus (pvz., kukurūzų) tirpalą arba emulsija ir tik po to – galimybę naudoti tirpalus kituose nešikliuose. Jeigu kaip nešiklis naudojamas ne vanduo, turėtų būti žinomos to nešiklio toksinės savybės. Reikėtų turėti informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos stabilumą ir duodamų tirpalų ir pašarų homogeniškumą (jeigu taikytina) dozės davimo sąlygomis (pvz., su pašaru).

29. Jeigu cheminės medžiagos duodamos su pašaru arba geriamuoju vandeniu, svarbu užtikrinti, kad įmaišomi bandomosios cheminės medžiagos kiekiai netrikdytų įprasto mitybos režimo arba vandens balanso. Atliekant ilgalaikio toksiškumo tyrimus, kai dozė duodama su pašaru, bandomosios cheminės medžiagos koncentracija pašaro sudėtyje paprastai turėtų neviršyti 5 % viršutinės ribos visame pašarų kiekyje, kad būtų išvengta mitybos disbalanso. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga duodama su pašaru, gali būti taikoma pastovi koncentracija (mg/kg pašaro arba ppm) arba pastovus dozės dydis, nustatomas atsižvelgiant į gyvūno kūno masę (mg/kg kūno masės) ir apskaičiuojamas kas savaitę. Turėtų būti nurodytas pasirinktas variantas.

▼M4

30. Jeigu dozė duodama per burną, bandomoji cheminė medžiaga gyvūnams duodama kasdien (septynias dienas per savaitę), paprastai (jeigu naudojami graužikai) – 24 mėnesių laikotarpiu (taip pat žr. 32 skirsnį). Pasirinkus bet kurią kitą dozės davimo tvarką, pvz., penkių dienų per savaitę, ją būtina pagrįsti. Jeigu dozė duodama per odą, gyvūnai paprastai veikiami bandomąja chemine medžiaga ne trumpiau kaip šešias valandas per parą, septynias dienas per savaitę, kaip nurodyta šio priedo B.9 skyriuje (11), 24 mėnesių laikotarpiu. Dozės davimas per kvėpavimo takus vykdomas šešias valandas per parą, septynias paras per savaitę, bet gali būti taikomas ir penkių parų per savaitę poveikis, jeigu jis pagrindžiamas. Įprastas dozės davimo laikotarpis – 24 mėnesiai. Jeigu naudojant kitos rūšies graužikus nei žiurkės dozė duodama tik per nosį, ilgiausia poveikio trukmė gali būti pakoreguojama siekiant sumažinti tos rūšies gyvūnų patiriamą kančią. Jeigu dozė duodama trumpiau kaip šešias valandas per parą, būtina tai pagrįsti. Taip pat žr. šio priedo B.8 skirsnį (9).

31. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga leidžiama zondu, tai turėtų būti daroma kasdien panašiu metu, naudojant skrandžio zondą arba tinkamą intubacinį vamzdelį. Paprastai duodama viena dozė per parą, bet, jeigu, pvz., cheminė medžiaga turi vietinio dirginamojo poveikio, paros dozė gali būti duodama padalyta į kelias dalis (pvz., du kartus per parą). Didžiausias vienkartinis duodamo skysčio kiekis priklauso nuo bandomojo gyvūno dydžio. Tūris turėtų būti kaip įmanoma mažesnis ir, jeigu naudojami graužikai, paprastai neturėtų viršyti 1 ml/100 g kūno masės (31). Bandomojo tirpalo tūrio nepastovumas turi būti kiek įmanoma sumažintas, keičiant koncentraciją taip, kad visų dydžių dozių tūris būtų pastovus. Cheminėms medžiagoms, kurios gali turėti ėsdinamojo arba dirginamojo poveikio, taikoma išimtis; tokios medžiagos turi būti atskiestos siekiant išvengti sunkaus vietinio poveikio. Turėtų būti vengiama atlikti bandymus taikant koncentracijas, kurios galėtų turėti ėsdinamojo arba dirginamojo poveikio virškinimo traktui.

Tyrimo trukmė

32. Jeigu naudojami graužikai, įprasta tyrimo trukmė – 24 mėnesiai, t. y. didžioji naudojamų gyvūnų įprastos gyvenimo trukmės dalis. Atsižvelgiant į tiriamųjų gyvūnų rūšies padermę, gali būti taikoma trumpesnė arba ilgesnė trukmė, tačiau ji turėtų būti pagrįsta. Tam tikros pelių padermėms, pvz., AKR/J, C3H/J arba C57BL/6J, gali būti taikomas 18 mėnesių laikotarpis. Toliau pateikta rekomendacijų dėl tyrimo trukmės, jo nutraukimo ir dėl išgyvenimo; daugiau rekomendacijų, įskaitant patarimus dėl neigiamo kancerogeniškumo, susijusio su išgyvenimu per tyrimą, priimtinumo aspektų, pateikta OECD rekomendaciniame dokumente Nr. 116 dėl lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimų planavimo ir atlikimo (7).

— Turėtų būti svarstoma galimybė nutraukti tyrimą, jeigu mažesnes dozes gavusiose grupėse arba kontrolinėje grupėje išgyvenusių gyvūnų procentinė dalis nebesiekia 25 %.

— Jeigu dėl toksinio poveikio pirma laiko žūna tik didžiausiąją dozę gavusios grupės gyvūnai, tyrimo nereikėtų nutraukti.

— Į kiekvienos lyties gyvūnų išgyvenimą atsižvelgiama atskirai.

— Tyrimas neturėtų būti tęsiamas toliau, jeigu atliekant tyrimą gaunami duomenys nebesuteikia galimybės atlikti statistiniu požiūriu pagrįstą vertinimą.

▼M4

STEBĖJIMAI

33. Visi gyvūnai turėtų būti tikrinami, ar jie sveiki arba nenugaišę; paprastai tai turėtų būti daroma kiekvienos dienos pradžioje ir pabaigoje, įskaitant savaitgalius ir švenčių dienas. Be to, kartą per parą turėtų būti patikrinama, ar gyvūnams nepasireiškė specifinių toksikologinės reikšmės požymių, atsižvelgiant į stipriausią numatomą poveikį po dozės davimo, kai dozė leidžiama zondu. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas auglių vystymuisi; turėtų būti registruojamas kiekvieno akivaizdžiai matomo ir užčiuopiamo auglio atsiradimo laikas, vieta, dydis, išvaizda ir išsivystymas.

Kūno masė, pašarų ir (arba) vandens suvartojimas ir pašaro efektyvumas

34. Visi gyvūnai turėtų būti pasveriami prieš pradedant duoti dozę, kitas 13 savaičių – ne rečiau kaip kartą per savaitę, o vėliau – bent kartą per mėnesį. Pirmąsias 13 savaičių – ne rečiau kaip kartą per savaitę, o vėliau – bent kartą per mėnesį turėtų būti matuojamas pašaro suvartojimas ir pašaro efektyvumas. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu, pirmąsias 13 savaičių – ne rečiau kaip kartą per savaitę, o vėliau – bent kartą per mėnesį turėtų būti matuojamas vandens suvartojimas. Galimybė matuoti vandens suvartojimą turėtų būti svarstoma ir atliekant tyrimus, per kuriuos pasikeičia gėrimo įpročiai.

Hematologiniai ir klinikinės biochemijos tyrimai bei kiti matavimai

35. Siekiant per tyrimą gauti kuo daugiau informacijos, pirmiausia apie veikimo būdo aspektus, tyrimo vadovo nuožiūra gali būti paimti ėminiai, skirti hematologiniams ir klinikinės biochemijos tyrimams. Be to, gali būti naudinga atlikti šlapimo analizę. Daugiau informacijos apie tokių ėminių naudą atliekant kancerogeniškumo tyrimą pateikta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7). Jeigu priimtina, kraujo ėminių ėmimas hematologiniams ir klinikinės biochemijos tyrimams ir šlapimo analizė gali būti atliekami per gyvūnų marinimo procedūrą (20 skirsnis) ir baigus tyrimą, šiuo tikslu panaudojant ne mažiau kaip po 10 kiekvienos lyties gyvūnų kiekvienoje grupėje. Kraujo ėminiai turėtų būti imami iš nurodytos vietos, pvz., širdies punkcijos vietos arba iš užakiduobinio ančio, taikant nuskausminimą, ir, jeigu taikytina, laikomi tinkamomis sąlygomis. Be to, tyrimams gali būti paruošti kraujo tepinėliai, ypač jeigu nustatoma, kad tikslinis organas yra kaulų čiulpai; tačiau tokių tyrimų nauda siekiant įvertinti kancerogeniškumą ir (arba) onkogeniškumą yra abejotina (32).

PATOLOGIJA

Bendrasis skrodimas

36. Paprastai turėtų būti atliekamas išsamus visų tiriamųjų gyvūnų, išskyrus kontrolinius (žr. 20 skirsnį) ir kitus pagalbinius gyvūnus, bendrasis skrodimas, atidžiai ištiriant kūno paviršių ir visas jo angas, kaukolę, krūtinės ląstą, pilvo ertmes ir jų turinį. Kontrolinius ir kitus pagalbinius gyvūnus gali reikėti skrosti atsižvelgiant į konkretų atvejį ir vadovaujantis tyrimo vadovo nuožiūra. Atliekant kancerogeniškumo tyrimą organai paprastai nesveriami, nes dėl senėjimo pakitimų, o vėliau – dėl auglių išsivystymo organų svėrimo duomenys tampa nenaudingi. Tačiau jie gali būti svarbūs atliekant įrodomosios duomenų galios vertinimą, o ypač – svarstant veikimo būdo aspektus. Jeigu atliekant pagalbinį tyrimą sveriami organai, tai turėtų būti daroma nė vėliau kaip po metų nuo tyrimo pradžios.

▼M4

37. Atsižvelgiant į audinio tipą ir numatomą vėliau atlikti histopatologinį tyrimą, tinkamiausioje fiksavimo terpėje turėtų būti konservuojami šie audiniai (33) (laužtiniuose skliaustuose nurodytų audinių konservuoti nebūtina):

Visi labai pakitę audiniai	Širdis	Kasa	Skrandis (įskrandis, liaukinė skrandžio dalis)
Antinksčiai	Klubinė žarna	Prieskydinė liauka	[Dantys]
Aorta	Tuščioji žarna	Periferinis nervas	Sėklidės
Smegenys (įskaitant didžiųjų smegenų, smegenėlių ir pailgųjų smegenų (smegenų tilto) išpjovas)	Inkstai	Hipofizė	Užkrūčio liauka
Akloji žarna	Ašarų liauka (viršakiduobinė)	Prostata	Skydliaukė
Gimdos kaklelis	Kepenys	Tiesioji žarna	[Liežuvis]
Koaguliatorių liauka	Plaučiai	Seilių liauka	Trachėja
Gaubtinė žarna	Limfmazgiai (paviršiniai ir giluminiai)	Sėklinės pūslelės	Šlapimo pūslė
Dvylikapirštė žarna	Pieno liauka (patelėms – privaloma, patinams – jeigu galima ištirti akimi)	Skeleto raumuo	Gimda (su gimdos kakleliu)
Sėklidžių prielipai	[Viršutiniai kvėpavimo takai, įskaitant nosį, kriaukles ir šalutines nosies ertmes]	Oda	[Šlapimtakis]
Akys (su tinklaine)	Stemplė	Stuburo smegenys (trys lygiai: sprando, krūtinės ląstos ir juosmens)	[Šlaplė]
[Šlaunikaulis su kelio sąnariu]	[Uoslės receptoriai]	Blužnis	Makštis
Tulžies pūslė (jeigu tiriamos ne žiurkės)	Kiaušidės	[Krūtinkaulis]	Kaulų čiulpų išpjova ir (arba) šviežiai paruošta kaulų čiulpų punkcija
Harderio liauka			

Jeigu tai poriniai organai, pvz., inkstai, antinksčiai, turėtų būti konservuojami abu organai. Atsižvelgiant į gautas klinikines ir kitokias išvadas, gali reikėti ištirti papildomus audinius. Be to, atsižvelgiant į žinomas bandomosios cheminės medžiagos savybes, turėtų būti konservuojami visi numanomi tiksliniai organai. Atliekant tyrimus, per kuriuos dozė duodama per odą, turėtų būti konservuojami organai, nurodyti kaip konservuotini, kai dozė duodama per burną; be to, labai svarbu, kad būtų paimti ir užkonservuoti specifiniai odos ėminiai iš poveikio vietos. Atliekant inhaliacinius tyrimus, konservuotinų ir tirtinų kvėpavimo takų audinių sąrašas turėtų būti sudaromas remiantis šio priedo B.8 ir B.29 skyriuose pateiktomis rekomendacijomis. Tiriant kitus organus ir (arba) audinius (be specialiai konservuojamų kvėpavimo takų audinių), turėtų būti tiriami organai, nurodyti dėl poveikio per virškinamąjį traktą būdo pateiktame organų sąraše.

▼M4

Histopatologinis tyrimas

38. Yra parengtos toksikologinės patologijos tyrimų geriausiosios patirties gairės (33). Turėtų būti ištirti bent šie audiniai:

— visi didžiausiąją dozę gavusios grupės ir kontrolinės grupės gyvūnų audiniai,

— visi per tyrimą nugaišusių arba numarintų gyvūnų audiniai,

— visi audiniai su plika akimi matomais pakitimais,

— jeigu didžiausiąją dozę gavusioje grupėje pastebima su dozės davimu susijusių histopatologinių pakitimų, tiriami tie patys visų kitų dydžių dozės gavusių grupių gyvūnų audiniai,

— jeigu tai poriniai organai, pvz., inkstai, antinksčiai, turėtų būti tiriami abu organai.

DUOMENYS IR ATASKAITOS

Duomenys

39. Turėtų būti pateikti kiekvieno gyvūno duomenys pagal visus vertinamus parametrus. Be to, visi duomenys turėtų būti apibendrinti lentelėse, pagal kiekvieną bandomąją grupę nurodant pradedant bandymą turėtų gyvūnų skaičių, atliekant bandymą nugaišusių arba dėl humaniškų priežasčių numarintų gyvūnų skaičių ir kiekvienos žūties arba numarinimo dėl humaniškų priežasčių laiką, gyvūnų su toksiškumo požymiais skaičių, pastebėtų toksiškumo požymių aprašymą, įskaitant kiekvieno toksinio poveikio pasireiškimo laiką, trukmę ir sunkumą, gyvūnų su audinių pakitimais skaičių, pakitimų tipą ir gyvūnų su kiekvieno tipo pakitimais procentinę dalį. Gyvūnams, kuriems pasireiškė toksinis poveikis arba atsirado audinių pakitimų, be pakitimų lygmens įvertinimo, suvestinių duomenų lentelėse turėtų būti pateikti vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai (ištisinio bandymo duomenų).

40. Istoriniai kontroliniai duomenys gali būti vertingi aiškinant tyrimo rezultatus, pvz., kai yra požymių, kad taikant vienalaikę kontrolę gauti duomenys iš esmės skiriasi, palyginti su naujausiais duomenimis, gautais stebint kontrolinius gyvūnus, esančius toje pačioje bandymo patalpoje arba kolonijoje. Istoriniai kontroliniai duomenys, jeigu jie vertinami, turėtų būti pateikti tos pačios laboratorijos ir turėtų būti susiję su to paties amžiaus ir padermės, išvestos penkerių metų laikotarpiu iki svarstomo tyrimo, gyvūnais.

41. Jeigu taikytina, skaitiniai rezultatai turėtų būti įvertinti tinkamu, visuotinai priimtinu statistiniu metodu. Statistiniai metodai ir analizei skirti duomenys turi būti pasirinkti planuojant bandymą (9 skirsnis). Parenkant duomenis, turėtų būti numatytos pataisos atsižvelgiant į gyvūnų išgyvenimą.

Bandymo ataskaita

42. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikta toliau nurodyta informacija.

Bandomoji cheminė medžiaga:

— fizinė būsena, grynumas, fizinės ir cheminės savybės,

— identifikavimo duomenys,

▼M4

— cheminės medžiagos šaltinis,

— partijos numeris,

— cheminės analizės pažyma.

Nešiklis (jeigu naudojamas):

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas (jeigu tai ne vanduo).

Bandomieji gyvūnai:

— naudota rūšis ir (arba) padermė ir pasirinkimo pagrindimas,

— gyvūnų skaičius ir amžius pradedant bandymą, nurodant lytį,

— šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.,

— kiekvieno gyvūno masė pradedant bandymą.

Bandymo sąlygos:

— dozės davimo būdo ir dozės parinkimo pagrindimas,

— jeigu taikytina, taikyti statistiniai duomenų analizės metodai,

— išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos ir pašaro paruošimą,

— analitiniai duomenys apie pasiektą koncentraciją, preparato stabilumą ir homogeniškumą,

— dozės davimo būdas ir išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos davimą,

— jeigu tai inhaliaciniai tyrimai: ar dozė duodama tik per nosį, ar per visą kūną,

— faktinės dozės (mg/kg kūno masės per parą) ir bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos pašare ir (arba) geriamajame vandenyje (mg/kg arba ppm) perskaičiavimo į faktinę dozę koeficientas, jeigu taikytina,

— išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę.

Rezultatai (turėtų būti pateiktos suvestinių duomenų lentelės ir kiekvieno gyvūno duomenys)

Bendrieji duomenys:

— išgyvenimo duomenys,

— kūno masė ir (arba) kūno masės pokyčiai,

— pašaro suvartojimas, pašaro efektyvumo skaičiavimai, jeigu jie buvo atlikti, ir vandens suvartojimas, jeigu taikytina,

— toksikonetiniai duomenys, jeigu yra,

— oftalmoskopinių tyrimų duomenys (jeigu yra),

— hematologinių tyrimų duomenys (jeigu yra),

— klinikinės chemijos tyrimų duomenys (jeigu yra).

▼M4

Klinikinės išvados:

— toksiškumo požymiai,

— nukrypimų dažnumas (ir, jeigu įvertinta, dydis),

— klinikinių požymių pobūdis, sunkumas ir trukmė (laikinieji ar negrįžtamieji).

Skrodimo duomenys:

— galutinė kūno masė,

— organų masė ir masių santykiai, jeigu taikytina,

— skrodimo išvados, nukrypimų dažnumas ir dydis.

Histopatologinis tyrimas:

— histopatologinių tyrimų, išskyrus neoplastinius, rezultatai,

— neoplastinių tyrimų rezultatai,

— nustatytų didelių ir mikroskopinių pakitimų sąryšis,

— išsamus visų su dozės davimu susijusių histopatologinio tyrimo rezultatų aprašymas, pateikiant sunkumo lygio vertinimus,

— skaidrių tarpusavio peržiūros ataskaita.

Statistinis rezultatų apdorojimas, jeigu taikytina.

Rezultatų aptarimas, apimantis:

— modeliavimo metodų aptarimą,

— dozės ir reakcijos tarpusavio priklausomybes,

— istorinius kontrolinius duomenis,

— veikimo būdo informacijos svarstymą,

— OD, NNPL ir MPNPL nustatymą,

— reikšmę žmonėms.

Išvados.

LITERATŪRA

1. OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2. EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3. Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the SAFEty Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.

4. Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145–191.

5. Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.

▼M4

6. Šio priedo B.27 skyrius. 90 dienų kartotinės dozės toksiškumo per virškinamąjį traktą ne graužikams tyrimas.

7. OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

8. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9. Šio priedo B.8 skyrius. Poūmis toksiškumas įkvėpus. 28 dienų tyrimas.

10. Šio priedo B.29 skyrius. Pusiau lėtinis toksiškumas įkvėpus. 90 dienų tyrimas.

11. Šio priedo B.9 skyrius. Kartotinės dozės (28 dienų) toksiškumas (per odą).

12. Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793–801.

13. Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, and Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33: 581–589.

14. Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89: 51–56.

15. Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33: 591–653.

16. Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical SAFEty Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human SAFEty Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1–7.

17. Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical SAFEty Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.

18. Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical SAFEty Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37–68.

19. Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical SAFEty Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69–98.

20. OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

21. OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/-MONO(2000)7, OECD, Paris.

▼M4

22. Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West, W, Olin S(2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729–837.

23. ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

24. Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

25. Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279–284.

26. Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105: 1196–1203.

27. 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos, OL L 276, 2010 10 20, p. 33.

28. National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86–23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

29. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3–906255–04–2.

30. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31. Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15–23.

32. Weingand K, *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and SAFEty Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198–201.

33. Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

▼**M4**

1 priedėlis

APIBRĖŽTIS

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

▼M4

B.33. **JUNGTINIAI LĖTINIO TOKSIŠKUMO IR KANCEROGENIŠKUMO TYRIMAI**

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka OECD „Test Guideline“ (TG) 453 (OECD bandymo gairės Nr. 453) (2009). Originalios bandymo gairės TG 453 priimtos 1981 m. Šis atnaujintasis B.33 bandymo metodas parengtas atsižvelgiant į poreikį įvertinti naujausius pasiekimus gyvūnų gerovės srityje ir norminių reikalavimų pasikeitimus (1) (2) (3) (4) (5). B.33 bandymo metodas buvo atnaujinamas kartu su šio priedo B.32 skyriumi „Kancerogeniškumo tyrimai“ ir šio priedo B.30 skyriumi „Lėtinio toksiškumo tyrimai“, siekiant gauti papildomos informacijos remiantis per tyrimą naudotais gyvūnais ir pateikti išsamesnių rekomendacijų dėl dozės parinkimo. Šis bandymo metodas skirtas taikyti bandant labai įvairias chemines medžiagas, įskaitant pesticidus ir pramonines chemines medžiagas. Reikėtų atkreipti dėmesį, kad kai kurios vaistams taikytinos išsamios nuostatos ir reikalavimai gali skirtis [žr. Tarptautinės konferencijos dėl suderinimo (ICH) Vaistų kancerogeniškumo bandymų gaires S1B].

2. Daugelis lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimų atliekami naudojant graužikų rūšis, todėl šis metodas pirmiausia taikytinas tyrimams, atliekamiems naudojant šias rūšis. Jeigu tokius tyrimus reikėtų atlikti naudojant ne graužikų rūšis, jiems taip pat gali būti taikomi čia ir šio priedo B.27 skyriuje „90 dienų kartotinės dozės toksiškumo per viršKinamąjį traktą ne graužikams tyrimas“ (6) išdėstyti principai ir procedūros su atitinkamais pakeitimais, kaip aprašyta OECD rekomendaciniame dokumente Nr. 116 dėl lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimų planavimo ir atlikimo (7).

3. Atliekant lėtinio toksiškumo ir (arba) kancerogeniškumo tyrimus, dozė paprastai gali būti duodama trimis būdais – per burną, odą ir kvėpavimo takus. Dozės davimo būdas parenkamas atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos fizines ir chemines savybes ir labiausiai paplitusį poveikio žmonėms būdą. Daugiau informacijos apie poveikio būdo parinkimą pateikta OECD rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7).

4. Šis bandymo metodas iš esmės skirtas poveikio per viršKinamąjį traktą būdui, nes šis būdas dažniausiai taikomas atliekant lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimus. Norint įvertinti žmonių sveikatai gresiančią riziką ir (arba) laikantis tam tikros reglamentavimo tvarkos gali reikėti atlikti ilgalaikius tyrimus, per kuriuos dozė būtų duodama per odą ir kvėpavimo takus, tačiau techniniu požiūriu abu poveikio būdai yra gana sudėtingi. Šie tyrimai turės būti planuojami atsižvelgiant į konkretų atvejį, tačiau čia aprašytu bandymo metodu, skirtu įvertinti lėtinį toksiškumą ir kancerogeniškumą, kai dozė duodama per burną, gali būti remiamasi rengiant inhaliacinių ir (arba) odinių tyrimų protokolą, atsižvelgiant į rekomendacijas dėl poveikio laikotarpių, klinikinių ir patologinių parametrų ir t. t. Yra parengtos OECD rekomendacijos dėl bandomųjų cheminių medžiagų dozių davimo per kvėpavimo takus (7) (8) ir odą (7). Planuojant ilgesnius tyrimus, per kuriuos dozės duodamos per kvėpavimo takus, pirmiausia turėtų būti remiamasi šio priedo B.8 skyriumi (9) ir šio priedo B.29 skyriumi (10), taip pat OECD rekomendaciniu dokumentu dėl ūmaus poveikio įkvėpus bandymų (8). Jeigu bandymai atliekami taikant poveikio per odą būdą, turėtų būti remiamasi šio priedo B.9 skyriumi (11).

▼M4

5. Atliekant jungtinį lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimą gaunama informacijos apie galimus pavojus sveikatai, galinčius kilti dėl kartotinio poveikio laikotarpiu, kuris gali atitikti ir visą naudojamos rūšies gyvūnų gyvenimo trukmę. Tyrimas suteikia informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos toksinį poveikį, įskaitant galimą kancerogeniškumą, ir padeda nustatyti tikslinius organus bei kaupimosi galimybę. Be to, jis gali padėti apytiksliai nustatyti nepastebimo neigiamo poveikio lygį, susijusį su toksiniu negenotoksinių kancerogenų poveikiu ir auglių sukėlimu; šis įvertis gali būti naudojamas nustatant saugaus poveikio žmonėms kriterijus. Taip pat pabrėžiamas gyvūnų kruopščių klinikinių stebėjimų būtinumas, kad būtų gauta kuo daugiau informacijos.

6. Pagal šį bandymo metodą atliekamų lėtinio toksiškumo ir (arba) kancerogeniškumo tyrimų tikslai:

— nustatyti kancerogenines bandomosios cheminės medžiagos savybes, dėl kurių dažniau atsiranda neoplazmų, didėja piktybinių neoplazmų santykinė dalis arba trumpėja neoplazmų atsiradimo laikas, palyginti su vienalaikės kontrolės grupėmis,

— neoplazmų atsiradimo laiko nustatymas,

— bandomosios cheminės medžiagos lėtinio toksiškumo nustatymas,

— lėtinio toksiškumo ir (arba) kancerogeninio poveikio tikslinio (-ų) organo (-ų) nustatymas,

— dozės ir reakcijos tarpusavio priklausomybės apibūdinimas,

— nepastebimo neigiamo poveikio lygio (NNPL) arba orientacinės dozės (OD) nustatymo pagrindo nustatymas,

— kancerogeninio poveikio ekstrapoliavimas siekiant nustatyti mažiausiosios dozės poveikio žmonėms lygius,

— žmonėms taikomų poveikio lygių lėtinio toksiškumo prognozavimas,

— duomenų teikimas rengiant bandymų hipotezes dėl veikimo būdo (2) (7) (12) (13) (14) (15).

PIRMINIAI ASPEKTAI

7. Vertindama galimą bandomosios cheminės medžiagos kancerogeniškumą ir lėtinį toksiškumą, bandymų laboratorija, prieš atlikdama tyrimą, turėtų apsvarstyti visą turimą informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą, kad planuojant tyrimą pirmiausia būtų siekiama padidinti jos toksinių savybių tyrimo veiksmingumą ir sumažinti gyvūnų naudojimą. Labai svarbu turėti informacijos apie numanomo kancerogeno veikimo būdą ir atsižvelgti į šią informaciją (2) (7) (12) (13) (14) (15), nes tinkamiausio plano parinkimas gali priklausyti nuo, ar bandomoji cheminė medžiaga yra žinoma arba įtariama kaip kancerogeninė. Daugiau patarimų, susijusių su veikimo būdo aspektais, pateikta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7).

8. Parengti tyrimo planą padės informacija apie bandomosios cheminės medžiagos tapatumą, cheminę struktūrą, fizines ir chemines savybes, veikimo būdą, taip pat toksiškumo bandymų *in vitro* arba *in vivo*, įskaitant genotoksiškumo tyrimus, rezultatai, numatomas (-i) panaudojimo būdas (-ai) ir galimas poveikis žmogui, turimi (Q)SAR duomenys ir mutageniškumo ir (arba) genotoksiškumo, kancerogeniškumo ir kiti toksikologiniai duomenys apie panašios struktūros chemines medžiagas, turimi toksikokinetiniai duomenys (vienos dozės ir, jeigu yra, kartotinės dozės kinetinės savybės)

▼M4

ir duomenys, gauti atlikus kitus kartotinio poveikio tyrimus. Lėtinis toksiškumas ir (arba) kancerogeniškumas turėtų būti nustatomas (-i) tik gavus pirminės informacijos apie toksiškumą, pagrįstos 28 dienų ir (arba) 90 dienų kartotinės dozės toksiškumo bandymais. Be to, naudingos informacijos gali suteikti trumpalaikiai piktybinių auglių sukėlimo ir paskatinimo bandymai. Atliekant bendrąjį konkrečios bandomosios cheminės medžiagos galimo neigiamo poveikio sveikatai vertinimą, turėtų būti apsvarstyta galimybė taikyti etapinį kancerogeniškumo bandymo metodą (16) (17) (18) (19).

9. Prieš pradedant tyrimą, atsižvelgiant į bandymo planą ir tikslus, turėtų būti nustatyti tinkamiausi statistiniai rezultatų analizės metodai. Turėtų būti apsvarstyta, ar rengiant statistinius duomenis turėtų būti atlikta pataisa atsižvelgiant į išgyvenimo rodiklius, kaupiamosios auglių rizikos ir jos ryšio su išgyvenimo trukme analizė ir analizė pirmalaikio vienos arba daugiau grupių pašalinimo atveju. Rekomendacijų dėl tinkamos statistinės analizės ir pagrindinės informacijos apie tarptautiniu mastu pripažintus statistinius metodus pateikta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7), taip pat rekomendaciniame dokumente Nr. 35 dėl lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimų analizės ir vertinimo (20).

10. Atliekant kancerogeniškumo tyrimą, visada turėtų būti atsižvelgiama į pagrindinius principus ir aspektus, išdėstytus OECD rekomendaciniame dokumente dėl klinikinių požymių, kaip pasekmių žmonėms, pasireiškimo vertinant saugumą naudojamiems bandomiesiems gyvūnams pripažinimo, vertinimo ir taikymo (21), pirmiausia jo 62 skirsnyje. Tame skirsnyje teigiama: *„Jeigu per kartotinės dozės tyrimus gyvūnams pasireiškia klinikinių požymių, kurie progresuoja ir dėl kurių toliau prastėja sveikatos būklė, turėtų būti priimtas informacija pagrįstas sprendimas, ar nereikėtų humaniškai numarinti gyvūno. Priimant sprendimą turėtų būti atsižvelgiama į informacijos, kuri būtų gauta tęsiant tyrimą su šiuo gyvūnu, vertės ir šio gyvūno bendrosios būklės santykį. jeigu nusprendžiama tęsti bandymą su šiuo gyvūnu, atsižvelgiant į poreikį, turėtų būti padidintas stebėjimų dažnumas. Be to, galbūt būtų įmanoma labai nepakenkiant bandymo tikslui laikinai nutraukti dozės davimą, jeigu dėl to sumažėtų skausmas ar kančia, arba sumažinti bandomąją dozę.“*

11. Išsamių rekomendacijų dėl dozės parinkimo lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimams principų ir jų svarstymų pateikta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7), taip pat Tarptautinio gamtos mokslų instituto leidiniuose (22) (23). Pagrindinė dozės parinkimo strategija priklauso nuo tyrimo pagrindinio tikslo arba tikslų (6 skirsnis). Parenkant tinkamus dozių dydžius, pavojų atranka turėtų būti vykdoma atsižvelgiant į mažų dozių sukeliamas reakcijas ir į tų pavojų reikšmę. Tai ypač svarbu parenkant dozes čia aprašomam bendram lėtinio toksiškumo ir (arba) kancerogeniškumo tyrimui.

12. Turėtų būti apsvarstyta galimybė atlikti čia aprašomą jungtinį lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimą, o ne atskirai atlikti lėtinio toksiškumo tyrimą (šio priedo B.30 skyrius) ir kancerogeniškumo tyrimą (šio priedo B.32 skyrius). Palyginti su dviem atskirais tyrimais, atliekant jungtinį bandymą užtikrinamas didesnis veiksmingumas laiko ir išlaidų požiūriu, taip pat šiek tiek mažesnis gyvūnų naudojimas, neprarandant duomenų kokybės nei lėtinio poveikio, nei kancerogeniškumo bandymo etapu. Tačiau, atliekant jungtinį lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimą, turėtų būti kruopščiai apsvarstyti dozės parinkimo principai (11 ir 22–26 skirsniai); be to, pripažinta, kad pagal tam tikras reglamentavimo sistemas gali reikėti atlikti atskirus tyrimus. Daugiau patarimų dėl bendro lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimo planavimo siekiant užtikrinti kuo didesnį tyrimo veiksmingumą mažinant naudojamų gyvūnų skaičių ir paprastinant įvairias bandymų procedūras pateikta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7).

▼M4

13. Aprašant šį bandymo metodą vartojamos apibrėžtys pateiktos šio skyriaus pabaigoje ir rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7).

BANDYMO PRINCIPAS

14. Tyrimo planas sudaromas iš dviejų vienalaikių etapų – lėtinio toksiškumo bandymo etapo ir kancerogeniškumo bandymo etapo (informacijos apie šių etapų trukmę atitinkamai pateikta 34 ir 35 skirsniuose). Bandomoji cheminė medžiaga paprastai duodama per burną, tačiau gali būti tinkamas ir dozės davimas per kvėpavimo takus arba per odą. Lėtinio toksiškumo bandymo etapu bandomoji cheminė medžiaga kasdien skirtingo dydžio dozėmis duodama kelioms bandomųjų gyvūnų grupėms, kiekvienai grupei duodant vieno dydžio dozę; įprastas dozės davimo laikotarpis – 12 mėnesių, tačiau, atsižvelgiant į norminius reikalavimus, gali būti taikomos ilgesnės arba trumpesnės trukmės (žr. 34 skirsnį). Ši trukmė parenkama taip, kad būtų pakankamai ilga, jog aiškiai pasireikštų kaupiamasis toksiškumas, tačiau jis nebūtų painiojamas su senėjimo pakitimais. Pagal tyrimo planą taip pat gali būti numatyta vienas arba daugiau kartu marinti gyvūnus nebaigus bandymo, pvz., po trijų ir šešių mėnesių; šiuo tikslu gali būti įtraukiamos papildomos gyvūnų grupės (žr. 20 skirsnį). Kancerogeniškumo bandymo etapu bandomoji cheminė medžiaga kasdien, paprastai per burną, duodama kelioms bandomųjų gyvūnų grupėms didžiąją jų gyvenimo trukmės dalį. Abiem etapais atidžiai stebima, ar gyvūnams nepasireiškė toksiškumo požymių ir ar neatsirado neoplastinių pakitimų. Bandymo metu nugaišę arba numarinti gyvūnai skrodžiami, o baigus bandymą numarinami ir skrodžiami išgyvenę gyvūnai.

METODO APRAŠYMAS

Gyvūnų rūšies parinkimas

15. Šis bandymo metodas pirmiausia taikomas vertinant lėtinį toksiškumą ir kancerogeniškumą graužikams (2 skirsnis). Galimybė naudoti ne graužikų rūšis gali būti svarstoma, jeigu turimi duomenys rodo, kad jie tinkamesni prognozuoti poveikį žmonių sveikatai. Gyvūnų rūšies pasirinkimas turėtų būti pagrįstas. Tinkamiausia graužikų rūšis yra žiurkės, bet galima naudoti ir kitų rūšių graužikus, pvz., peles. Nors pelių naudojimas atliekant kancerogeniškumo bandymus gali būti nelabai naudingas (24) (25) (26), pagal kai kurias dabartines reglamentavimo programas kancerogeniškumo bandymai naudojant peles vis dar yra būtini, jeigu nenustatoma, kad toks tyrimas moksliniu požiūriu nėra būtinas. Žiurkės ir pelės yra tinkamiausi bandomieji gyvūnai, nes jų gyvenimo trukmė palyginti trumpa, jos plačiai naudojamos atliekant farmakologinius ir toksikologinius tyrimus, jos jautrios auglių sukėlimui, yra pakankami gerai aprašytų padermių. Atsižvelgiant į šias savybes, yra daug informacijos apie jų fiziologiją ir patologiją. Ne graužikų rūšims pasireiškiančio lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimų planas ir atlikimas prireikus turėtų būti grindžiami aprašant šį bandymą ir šio priedo B.27 skyriuje „90 dienų kartotinės dozės toksiškumo per virškinamąjį traktą ne graužikams tyrimas“ (6) išdėstytais principais. Daugiau informacijos apie gyvūnų rūšies ir padermės pasirinkimą pateikta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7).

16. Turėtų būti naudojami sveiki, jauni, bet suaugę plačiai naudojamų laboratorinių padermių gyvūnai. Jungtinis lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo tyrimas turėtų būti atliekamas naudojant tos pačios padermės ir iš to paties šaltinio gautus gyvūnus, kokie buvo naudojami per trumpesnį (-ius) išankstinį (-ius) toksiškumo tyrimą (-us), tačiau, jeigu žinoma, kad naudojant šios veislės ir šio šaltinio gyvūnus sunku įgyvendinti per ilgesnės trukmės tyrimus paprastai taikomus išgyvenimo kriterijus [žr. rekomendacinį dokumentą Nr. 116 (7)], turėtų būti svarstoma galimybė naudoti tokią gyvūnų padermę, kurios išgyvenimo per ilgesnės trukmės tyrimą rodiklis būtų priimtinas. Patelės turėtų būti dar be vados ir neapvaisintos.

▼M4

Laikymo ir šėrimo sąlygos

17. Gyvūnai gali būti laikomi po vieną arba mažomis tos pačios lyties grupėmis; galimybė laikyti gyvūnus po vieną turėtų būti svarstoma tik tuo atveju, jeigu tai moksliškai pagrįsta (27) (28) (29). Narveliai turėtų būti išdėstyti taip, kad galimas narvelių išdėstymo poveikis tyrimo rezultatams turėtų būtų kuo mažesnis. Bandomųjų gyvūnų laikymo patalpos temperatūra turėtų būti 22 °C (± 3 °C). Nors santykinis drėgnis turėtų būti ne mažesnis kaip 30 % ir, pageidautina, ne didesnis kaip 70 % (išskyrus patalpų valymo metą), turėtų būti siekiama palaikyti 50–60 % santykinį drėgnį. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, taikant 12 h šviesos ir 12 h tamsos seką. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijose naudojamas pašaras, neribojant geriamojo vandens kiekio. Šėrimo režimas turėtų atitikti visus bandomųjų gyvūnų rūšies mitybos reikalavimus; pašaro sudėtyje turėtų būti kuo mažiau teršalų, įskaitant (be kitų teršalų) pesticidų likučius, patvariuosius organinius teršalus, fitoestrogenus, sunkiuosius metalus ir mikotoksinus. Turėtų būti periodiškai – bent pradedant tyrimą ir pasikeitus naudojamai partijai – rengiama analitinė informacija apie pašarines medžiagas ir pašaro sudėtyje esančių teršalų lygius; ši informacija turėtų būti pateikta galutinėje ataskaitoje. Turėtų būti rengiama atitinkama analitinė informacija apie tyrimo metu naudojamą geriamąjį vandenį. Pašaro parinkimui gali turėti įtakos poreikis tinkamai įmaišyti bandomąją cheminę medžiagą ir laikytis gyvūnų mitybos reikalavimų, kai bandomoji cheminė medžiaga duodama su pašaru.

Gyvūnų paruošimas

18. Turėtų būti naudojami sveiki gyvūnai, ne trumpiau kaip septynias paras pratinti prie laboratorinių sąlygų ir anksčiau nenaudoti kitiems bandymams. Jeigu naudojami graužikai, dozė gyvūnams turėtų būti pradedama duoti kaip galima anksčiau po atjunkymo ir pripratinimo, pageidautina, ne vėliau nei gyvūnams sueina aštuonios savaitės. Gyvūnai turėtų būti apibūdinti nurodant rūšį, padermę, šaltinį, lytį, masę ir amžių. Pradedant tyrimą kiekvienos lyties gyvūnų kūno masės skirtumai turi būti kuo mažesni ir pagal kiekvieną lytį nenukrypti nuo visų tyrime dalyvaujančių gyvūnų kūno masės vidurkio daugiau kaip ± 20 %. Gyvūnai turėtų būti atsitiktine tvarka suskirstyti į kontrolines ir bandomąsias grupes. Gyvūnus suskirsčius atsitiktine tvarka, grupių vidutinės kūno masės pagal lytį neturėtų smarkiai skirtis. Jeigu yra statistiniu požiūriu didelių skirtumų, atsitiktinis suskirstymo etapas turėtų būti pakartotas (jeigu tai įmanoma). Kiekvienam gyvūnui turėtų būti suteiktas unikalus identifikavimo numeris, kuriuo gyvūnas visam laikui pažymimas jį ištatuiruojant, implantuojant mikroschemą arba kitu tinkamu būdu.

PROCEDŪRA

Gyvūnų skaičius ir lytis

19. Turėtų būti naudojami abiejų lyčių gyvūnai. Turėtų būti naudojama pakankamai gyvūnų, kad būtų galima atlikti išsamią biologinę ir statistinę analizę. Todėl, jeigu naudojami graužikai, kiekvienoje dozę gaunančioje (kaip aprašyta 22 skirsnyje) ir vienalaikės kontrolės grupėje, skirtoje tyrimo kancerogeniškumo bandymo etapui, turėtų būti ne mažiau kaip po 50 kiekvienos lyties gyvūnų. Atsižvelgiant į tyrimo tikslą, gali būti įmanoma padidinti statistinį pagrindinių įverčių patikimumą nevienodai suskirstant gyvūnus į įvairaus dydžio dozėms skirtas grupes, mažiausiajai dozei skirtas grupes sudarant iš daugiau kaip 50 gyvūnų, pvz., kad būtų galima apytikriai įvertinti kancerogeniškumą duodant mažiausiąsias dozes. Tačiau reikėtų pripažinti, kad nedaug padidinus grupės dydį tyrimo statistinis patikimumas padidės gana nežymiai. Jeigu naudojami graužikai, kiekvienoje dozę gaunančioje

▼M4

(kaip aprašyta 22 skirsnyje) ir vienalaikės kontrolės grupėje, skirtoje tyrimo lėtinio toksiškumo bandymo etapui, turėtų būti ne mažiau kaip po 10 kiekvienos lyties gyvūnų. Reikėtų atkreipti dėmesį, kad šis skaičius yra mažesnis nei per lėtinio toksiškumo tyrimą (šio priedo B.30 skyrius). Tačiau aiškinti duomenis, šio bendro tyrimo lėtinio toksiškumo bandymo etapu gautus naudojant mažesnes gyvūnų grupes, padės duomenys, gauti naudojant daugiau gyvūnų tyrimo kancerogeniškumo bandymo etapu. Jeigu tyrimams naudojamos pelės, į lėtinio toksiškumo bandymo etapo kiekvieno dydžio dozei skirtą grupę gali reikėti įtraukti daugiau gyvūnų, kad būtų galima atlikti visus reikiamus hematologinius tyrimus. Daugiau informacijos apie statistinį tyrimo planavimą ir dozių dydžių parinkimą siekiant kuo labiau padidinti statistinį patikimumą pateikta OECD rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7).

Rezervo sudarymas atsižvelgiant į gyvūnų marinimą nebaigus bandymo, pagalbinės grupės sudarymas ir kontrolinių gyvūnų parūpinimas

20. Jeigu tai moksliškai pagrįsta, rengiantis tyrimui gali būti sudarytas rezervas atsižvelgiant į gyvūnų marinimą nebaigus bandymo, pvz., lėtinio toksiškumo bandymo etapu – po 6 mėnesių, kad būtų galima gauti informacijos apie neoplastinių pakitimų vystymąsi ir mechanistinės informacijos. Jeigu tokios informacijos apie bandomąją cheminę medžiagą jau turima remiantis anksčiau atliktais kartotinės dozės toksiškumo tyrimais, gyvūnų marinimo nebaigus bandymo moksliškai pagrįsti negalima. Tyrimo lėtinio toksiškumo etapu, kuris paprastai trunka 12 mėnesių (34 skirsnis), nebaigus bandymo numarintų gyvūnų duomenimis bus galima pasinaudoti tyrimo kancerogeniškumo bandymo etapu ir taip sumažinti bendrą naudojamų gyvūnų skaičių. Tyrimo lėtinio toksiškumo bandymo etapu taip pat gali būti naudojamos pagalbinės grupės, skirtos stebėti tiriamos bandomosios cheminės medžiagos sukeltų toksikologinių pakitimų grįžtamumą. Sudarant šias pagalbines grupes gali būti apsiribojama tik didžiausiosios dozės grupe ir kontroline grupe. Gali būti numatyta papildoma kontrolinių gyvūnų grupė (paprastai – po penkis kiekvienos lyties gyvūnus), skirta prireikus stebėti ligos būklę tyrimo metu (30). Daugiau patarimų dėl nebaigus bandymo numatytų marinti, pagalbinių ir kontrolinių gyvūnų įtraukimo į tyrimo planą, kartu kaip galima labiau sumažinant bendrą naudojamų gyvūnų skaičių, pateikta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7).

21. Jeigu į tyrimo planą įtraukiami pagalbiniai gyvūnai ir (arba) jeigu pagal tyrimo planą numatomas gyvūnų marinimas nebaigus bandymo, šiuo tikslu įtraukiamoje kiekvieno dydžio dozei skirtoje grupėje paprastai turėtų būti po 10 kiekvienos lyties gyvūnų, o bendras pagal tyrimo planą numatytas gyvūnų skaičius turėtų būti padidintas numatomu iki tyrimo pabaigos numarinti gyvūnų skaičiumi. Gyvūnai, kuriuos numatyta marinti nebaigus bandymo, ir pagalbiniai gyvūnai turėtų stebimi taip pat, kaip pagrindinio tyrimo lėtinio toksiškumo etapo gyvūnai, įskaitant kūno masės stebėjimą, pašarų ir vandens suvartojimo stebėjimą, hematologinius ir klinikinės biochemijos matavimus ir patologinius tyrimus, tačiau taip pat gali būti numatyta (grupėse, kuriose gyvūnai bus marinami nebaigus bandymo) atlikti tik tokius matavimus, kurie yra susiję su specifiniais, pagrindiniais matais, pvz., neurotoksiškumu arba imunotoksiškumu.

Dozių dydžių grupės ir dozuotė

22. Rekomendacijos dėl visų aspektų, susijusių su dozių dydžių parinkimu ir dozių dydžių skirtumų nustatymu, pateiktos rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7). Lėtinio toksiškumo ir kancerogeniškumo bandymų etapais turėtų būti taikomi ne mažiau kaip trys dozių dydžiai ir vienalaikė kontrolė. Dozių dydžiai paprastai grindžiami trumpesnio laikotarpio kartotinių dozių arba ribų nustatymo tyrimų rezultatais ir turėtų būti nustatomi atsižvelgiant į visus turimus toksikologinius ir toksikokinetinius duomenis apie bandomąją medžiagą arba panašias chemines medžiagas.

▼M4

23. Jeigu galima numatyti, kad vieno dydžio dozės, atitinkančios bent 1 000 mg/kg kūno masės per parą, bandymas nesukels neigiamo poveikio, visas trijų dydžių dozės tyrimas lėtinio toksiškumo bandymo etapu gali būti laikomas nebūtinu. Šiuo tikslu turėtų būti remiamasi išankstinių tyrimų informacija ir panašios struktūros cheminių medžiagų duomenimis pagrįsta nuomone, kad toksinio poveikio nebus. 1 000 mg/kg kūno masės per parą ribinė vertė gali būti taikoma tada, kai nereikia skirti didesnės dozės atsižvelgiant į poveikį žmogui.

24. Jeigu dozė neturėtų būti ribojama atsižvelgiant į bandomosios medžiagos fizines ir chemines savybes arba biologinį poveikį, didžiausioji dozė turėtų būti parenkama tokia, kad būtų galima nustatyti pagrindinius tikslinius organus ir toksinį poveikį, nesukeliant kančios, sunkaus toksiškumo, liguistumo arba žūties. Didžiausioji dozė paprastai turėtų būti parenkama tokia, kad ją taikant būtų sukeliami pastebimi toksiškumo požymiai, pvz., pasireiškiantys kūno masės prieaugio sumažėjimu (apie 10 %). Tačiau, atsižvelgiant į tyrimo tikslus (žr. 6 skirsnį), didžiausioji dozė gali būti parinkta mažesnė už dozę, kurią taikant būtų pastebimi toksiškumo požymiai, pvz., jeigu taikant dozę sukeliamas rūpimas neigiamas poveikis, turintis nedidelės įtakos gyvenimo trukmei arba kūno masei.

25. Dozių dydžiai ir dozių dydžių skirtumai gali būti parinkti tokie, kad būtų galima nustatyti dozės ir reakcijos tarpusavio priklausomybę ir – atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos veikimo būdą – NNPL arba gauti kitokį siekiamą tyrimo rezultatą, pvz., nustatyti orientacinę dozę (OD) (žr. 27 skirsnį). Nustatant mažesniąsias dozes, turėtų būti atsižvelgiama į tokius veiksnius, kaip numatomas dozės ir reakcijos tarpusavio priklausomybės kreivės nuolydis, dozės, kurias taikant atsiranda reikšmingų metabolizmo arba toksinio poveikio būdo pokyčių, kai tikimasi gauti ribinę vertę arba atskaitos tašką mažiausiosios dozės ekstrapoliavimui. Atliekant bendrą kancerogeniškumo ir (arba) lėtinio toksiškumo tyrimą, pirmiausia turėtų būti siekiama gauti informacijos kancerogeniškumo rizikos vertinimo tikslais, o informacijos apie lėtinį toksiškumą gavimas paprastai yra papildomas tikslas. Į tai būtina atsižvelgti parenkant per tyrimą taikytinus dozių dydžius ir dozių dydžių skirtumus.

26. Dozių dydžių skirtumai parenkami atsižvelgiant į tyrimo tikslus ir bandomosios cheminės medžiagos savybes ir aprašant šį metodą negali būti iš anksto tiksliai numatyti, tačiau tinkamas bandymų veiksmingumas dažnai užtikrinamas tada, kai nustatant mažėjančius dozių dydžius taikomi koeficientai nuo 2 iki 4; be to, jeigu taikomi labai dideli dozių dydžių skirtumai (pvz., taikomi didesni koeficientai nei 6–10), dažnai patartina naudoti ketvirtąją bandomąją grupę. Apskritai reikėtų vengti taikyti didesnius koeficientus nei 10; jeigu tokie taikomi, jie turėtų būti pagrindžiami.

27. Kaip aprašyta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7), konkrečios dozės turėtų būti nustatomos atsižvelgiant į tokius veiksnius:

— žinomus arba numanomus netiesiškumus arba dozės ir reakcijos tarpusavio priklausomybės kreivės išlinkio taškus,

— toksikokinetines savybes ir dozių intervalus, kuriuose pasireiškia metabolizmo paskatinimo, įsotinimo efektai arba išorinės ir vidinės dozių tarpusavio netiesiškumas, arba kuriuose nurodytųjų dalykų nepasireiškia,

— pirminius pakitimus, poveikio rodiklius arba pagrindinių aiškiai nepastebimų biologinių procesų veikimo požymius,

▼M4

— pagrindinius (arba numanomus) veikimo būdo aspektus, pvz., dozes, kurias taikant pradeda reikštis citotoksiškumas, sutrikdomi hormonų lygiai, nustelbiami homeostaziniai mechanizmai ir t. t.,

— dozės ir reakcijos tarpusavio priklausomybės kreivės sritis, kuriose būtina atlikti ypač tikslius vertinimus, pvz., numanomos orientacinės dozės (OD) arba numanomos ribinės vertės sritis,

— numanomus poveikio žmonėms lygius, ypač parenkant vidutines ir mažiausiąsias dozes.

28. Kontrolinė grupė – tai dozės negaunančių gyvūnų grupė arba nešiklio kontrolės grupė, jeigu bandomajai cheminei medžiagai duoti naudojamas nešiklis. Išskyrus poveikį bandomąja chemine medžiaga, su kontrolinės grupės gyvūnais turėtų būti elgiamasi lygiai taip pat, kaip su bandomųjų grupių gyvūnais. Naudojant nešiklį, kontrolinės grupės gyvūnams duodamas didžiausias nešiklio tūris, skiriamas dozę gaunančioms grupėms. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga duodama su pašaru ir dėl prastesnio skonio gyvūnai suvartoja mažiau pašaro, gali būti naudinga pasitelkti papildomą kartu šeriamą kontrolinę grupę, kad būtų užtikrinta geresnė kontrolė.

Bandomosios cheminės medžiagos dozių paruošimas ir davimas

29. Bandomoji cheminė medžiaga paprastai duodama per burną, su pašaru ar geriamuoju vandeniu arba leidžiama zondu. Daugiau informacijos apie dozės davimo būdus ir metodus pateikta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7). Dozės davimo būdas ir metodas parenkami atsižvelgiant į tyrimo tikslą, fizines ir chemines bandomosios cheminės medžiagos savybes, jos biologinį įsisavinimą ir vyraujantį poveikio žmonėms būdą ir metodą. Pasirinktas dozės davimo būdas ir metodas turi būti pagrįsti. Gyvūnų gerovės sumetimais dozės leidimas zondu paprastai turėtų būti pasirenkamas tik duodant tokias chemines medžiagas, kurių davimo būdas ir metodas iš esmės atitinka galimą poveikio žmogui būdą ir metodą (pvz., duodant vaistus). Maisto produktuose arba aplinkoje esančios cheminės medžiagos, įskaitant pesticidus, paprastai duodamos su pašaru arba vandeniu. Tačiau tam tikrais atvejais, pvz., tiriant poveikį darbe, gali būti tinkamesni kiti dozės davimo būdai.

30. Prireikus bandomoji cheminė medžiaga ištirpinama arba pagaminama jos suspensija tinkamame nešiklyje. Reikėtų atsižvelgti į šias nešiklio ir kitų priedų savybes, jeigu taikytina: poveikį sugerčiai, pasiskirstymui, metabolizmui arba bandomosios cheminės medžiagos sulaikymui; poveikį bandomosios cheminės medžiagos cheminėms savybėms, dėl kurių gali pasikeisti jos toksiškumo savybės; poveikį maisto ar vandens suvartojimui arba gyvūnų įmitimui. Rekomenduojama, jeigu įmanoma, pirmenybę teikti vandeniniam tirpalui arba suspensijai, tada svarstyti galimybę naudoti aliejaus (pvz., kukurūzų) tirpalą arba suspensiją ir tik po to – galimybę naudoti tirpalus kituose nešikliuose. Jeigu kaip nešiklis naudojamas ne vanduo, turėtų būti žinomos to nešiklio toksinės savybės. Reikėtų turėti informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos stabilumą ir duodamų tirpalų ir pašarų homogeniškumą (jeigu taikytina) dozės davimo sąlygomis (pvz., su pašaru).

31. Jeigu cheminės medžiagos duodamos su pašaru arba geriamuoju vandeniu, svarbu užtikrinti, kad įmaišomi bandomosios cheminės medžiagos kiekiai netrikdytų įprasto mitybos režimo arba vandens balanso. Atliekant ilgalaikio toksiškumo tyrimus, kai dozė duodama su pašaru, bandomosios cheminės medžiagos koncentracija pašaro sudėtyje paprastai turėtų neviršyti 5 % viršutinės ribos visame pašarų kiekyje, kad būtų išvengta mitybos disbalanso. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga duodama su pašaru, gali būti taikoma pastovi koncentracija (mg/kg pašaro arba ppm) arba pastovus dozės dydis, nustatomas atsižvelgiant į gyvūno kūno masę (mg/kg kūno masės) ir apskaičiuojamas kas savaitę. Turėtų būti nurodytas pasirinktas variantas.

▼M4

32. Jeigu dozė duodama per burną, bandomoji cheminė medžiaga gyvūnams duodama kasdien (septynias dienas per savaitę), paprastai – 12 mėnesių laikotarpiu (lėtinio toksiškumo bandymo etapas) arba 24 mėnesių laikotarpiu (kancerogeniškumo bandymo etapas); taip pat žr. 33 ir 34 skirsnius. Pasirinkus bet kurią kitą dozės davimo tvarką, pvz., penkių dienų per savaitę, ją būtina pagrįsti. Jeigu dozė duodama per odą, gyvūnai paprastai veikiami bandomąja chemine medžiaga ne trumpiau kaip šešias valandas per parą, septynias dienas per savaitę, kaip nurodyta šio priedo B.9 skyriuje (11), 12 mėnesių laikotarpiu (lėtinio toksiškumo bandymo etapas) arba 24 mėnesių laikotarpiu (kancerogeniškumo bandymo etapas). Dozės davimas per kvėpavimo takus vykdomas šešias valandas per parą, septynias paras per savaitę, bet gali būti taikomas ir penkių parų per savaitę poveikis, jeigu jis pagrindžiamas. Įprastas dozės davimo laikotarpis – 12 mėnesių (lėtinio toksiškumo bandymo etapas) arba 24 mėnesiai (kancerogeniškumo bandymo etapas). Jeigu naudojant kitos rūšies graužikus nei žiurkės dozė duodama tik per nosį, ilgiausia poveikio trukmė gali būti pakoreguojama siekiant sumažinti tos rūšies gyvūnų patiriamą kančią. Jeigu dozė duodama trumpiau kaip šešias valandas per parą, būtina tai pagrįsti. Taip pat žr. šio priedo B.8 skirsnį (9).

33. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga leidžiama zondu, tai turėtų būti daroma kasdien panašiu metu, naudojant skrandžio zondą arba tinkamą intubacinį vamzdelį. Paprastai duodama viena dozė per parą, bet, jeigu, pvz., cheminė medžiaga turi vietinio dirginamojo poveikio, paros dozė gali būti duodama padalyta į kelias dalis (pvz., du kartus per parą). Didžiausias vienkartinis duodamo skysčio kiekis priklauso nuo bandomojo gyvūno dydžio. Tūris turėtų būti kaip įmanoma mažesnis ir, jeigu naudojami graužikai, paprastai neturėtų viršyti 1 ml/100 g kūno masės (31). Bandomojo tirpalo tūrio nepastovumas turi būti kiek įmanoma sumažintas, keičiant koncentraciją taip, kad visų dydžių dozių tūris būtų pastovus. Cheminėms medžiagoms, kurios gali turėti ėsdinamojo arba dirginamojo poveikio, taikoma išimtis; tokios medžiagos turi būti atskiestos siekiant išvengti sunkaus vietinio poveikio. Turėtų būti vengiama atlikti bandymus taikant koncentracijas, kurios galėtų turėti ėsdinamojo arba dirginamojo poveikio virškinimo traktui.

Tyrimo trukmė

34. Įprastas dozės davimo laikotarpis ir įprasta šio tyrimo lėtinio toksiškumo bandymo etapo trukmė – 12 mėnesių, tačiau, atsižvelgiant į tam tikrus reglamentavimo tvarkų reikalavimus arba siekiant specifinių mechanistinių tikslų, tyrimo planas gali būti taikomas ir trumpesnės (pvz., šešių arba devynių mėnesių) arba ilgesnės (pvz., 18 arba 24 mėnesių) trukmės tyrimams. Jeigu pasirenkama ne 12 mėnesių trukmė, ji turėtų būti pagrįsta, ypač jeigu ta trukmė trumpesnė nei 12 mėnesių. Visi šiam etapui skirtų dozių dydžių grupių gyvūnai nustatytu laiku numarinami, kad būtų galima įvertinti lėtinį toksiškumą ir neoplastinę patologiją. Pagalbinės grupės, įtrauktos tiriamos bandomosios cheminės medžiagos sukeliamų toksikologinių pakitimų grįžtamumo stebėjimo tikslais, turėtų negauti dozės ne mažiau kaip keturias savaites, bet ne ilgiau kaip trečdalį visos tyrimo trukmės nutraukus dozės davimą.

35. Jeigu naudojami graužikai, įprasta šio tyrimo kancerogeniškumo etapo trukmė – 24 mėnesiai, t. y. didžioji naudojamų gyvūnų įprastos gyvenimo trukmės dalis. Atsižvelgiant į tiriamųjų gyvūnų rūšies padermę, gali būti taikoma trumpesnė arba ilgesnė trukmė, tačiau ji turėtų būti pagrįsta. Tam tikros pelių padermėms, pvz., AKR/J, C3H/J arba C57BL/6J, gali būti taikomas 18 mėnesių laikotarpis. Toliau pateikta rekomendacijų dėl tyrimo trukmės, jo nutraukimo ir dėl išgyvenimo; daugiau rekomendacijų, įskaitant patarimus dėl neigiamo kancerogeniškumo, susijusio su išgyvenimu per tyrimą, priimtinumo aspektų, pateikta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7).

▼M4

— Turėtų būti svarstoma galimybė nutraukti tyrimą, jeigu mažesnes dozes gavusiose grupėse arba kontrolinėje grupėje išgyvenusių gyvūnų procentinė dalis nebesiekia 25 %.

— Jeigu dėl toksinio poveikio pirma laiko žūna tik didžiausiąją dozę gavusios grupės gyvūnai, tyrimo nereikėtų nutraukti.

— Į kiekvienos lyties gyvūnų išgyvenimą atsižvelgiama atskirai.

— Tyrimas neturėtų būti tęsiamas toliau, jeigu atliekant tyrimą gaunami duomenys nebesuteikia galimybės atlikti statistiniu požiūriu pagrįstą vertinimą.

STEBĖJIMAI (LĖTINIO TOKSIŠKUMO BANDYMO ETAPAS)

36. Visi gyvūnai turėtų būti tikrinami, ar jie sveiki arba nenugaišę; paprastai tai turėtų būti daroma kiekvienos dienos pradžioje ir pabaigoje, įskaitant savaitgalius ir švenčių dienas. Bendrieji klinikiniai stebėjimai turėtų būti atliekami bent kartą per parą, pageidautina, tuo pačiu paros metu, atsižvelgiant į stipriausią numatomą poveikį po dozės davimo, kai dozė leidžiama zondu.

37. Kartą prieš pirmąjį dozės davimą (kad būtų galima palyginti atskirus gyvūnus), po to – pasibaigus pirmajai tyrimo savaitei, o vėliau – kas mėnesį turėtų būti atliekami išsamūs visų gyvūnų klinikiniai stebėjimai. Stebėjimų protokolas turėtų būti sudarytas taip, kad stebėtojų kaita būtų kuo mažesnė ir kad stebėtojai būtų paskiriami neatsižvelgiant į bandomąją grupę. Kiekvieną kartą šie stebėjimai turėtų būti atliekami tuo pačiu metu, perkėlus gyvūną iš jo narvelio į tam skirtą vietą. Stebėjimai turėtų būti kruopščiai registruojami, pageidautina, pagal toje laboratorijoje aiškiai apibrėžtą vertinimo sistemą. Turėtų būti stengiamasi užtikrinti, kad stebėjimo sąlygų kaita būtų kuo mažesnė. Be kitų dalykų, turėtų būti registruojami odos, kailio, akių, gleivinės pakitimai, išskyrų atsiradimas ir autonominis aktyvumas (pvz., ašarojimas, plaukų pašiaušimas, vyzdžio dydis, neįprasti kvėpavimo pakitimai). Taip pat turėtų būti registruojami eisenos, pozos, reakcijos į paėmimą rankomis pakitimai, traukulių arba toninių judesių atsiradimas, stereotipinis (pvz., besaikis valymasis, pasikartojantis sukimasis ratu) arba keistas elgesys (pvz., savęs luošinimas, vaikščiojimas atbulomis) (32).

38. Naudojant oftalmoskopą arba kitą tinkamą įrangą, prieš pirmąjį bandomosios cheminės medžiagos davimą turėtų būti atlikti visų gyvūnų oftalmologiniai tyrimai. Baigus tyrimą, turėtų būti atlikti visų gyvūnų arba bent didžiausiąją dozę gavusios grupės ir kontrolinės grupės gyvūnų oftalmologiniai tyrimai. Jeigu nustatoma akių pakitimų, susijusių su dozės davimu, turėtų būti ištirti visi gyvūnai. Jeigu struktūrinė analizė arba kita informacija rodo toksinį poveikį akims, akių tyrimų dažnumas turėtų būti didesnis.

39. Jeigu anksčiau atlikus cheminės medžiagos 28 dienų ir (arba) 90 dienų kartotinės dozės toksiškumo bandymus nustatyta, kad cheminė medžiaga gali sukelti neurotoksinį poveikį, prieš pradedant tyrimą ir kas tris mėnesius nuo tyrimo pradžios, bet ne ilgiau kaip 12 mėnesių laikotarpiu, o taip pat baigus tyrimą (jeigu jis trunka ilgiau nei 12 mėnesių) galima (bet neprivaloma) įvertinti jutimines reakcijas į įvairaus pobūdžio dirgiklius (32) (pvz., klausos, regos ir proprioreceptorinius) (33) (34) (35), spaudimo (jėgos) stiprumą (36) ir judėjimo aktyvumą (37). Išsamesnės informacijos apie procedūras, kurios galėtų būti taikomos, pateikta atitinkamuose literatūros šaltiniuose. Tačiau galima taikyti ir čia nurodytiems metodams alternatyvius metodus.

▼M4

40. Jeigu anksčiau atlikus cheminės medžiagos 28 dienų ir (arba) 90 dienų kartotinės dozės toksiškumo bandymus nustatyta, kad cheminė medžiaga gali sukelti imunotoksinį poveikį, baigus tyrimą galima (bet neprivaloma) atlikti išsamesnius šios pasekmės tyrimus.

Kūno masė, pašarų ir (arba) vandens suvartojimas ir pašaro efektyvumas

41. Visi gyvūnai turėtų būti pasveriami prieš pradedant duoti dozę, kitas 13 savaičių – ne rečiau kaip kartą per savaitę, o vėliau – bent kartą per mėnesį. Pirmąsias 13 savaičių – ne rečiau kaip kartą per savaitę, o vėliau – bent kartą per mėnesį turėtų būti matuojamas pašaro suvartojimas ir pašaro efektyvumas. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu, pirmąsias 13 savaičių – ne rečiau kaip kartą per savaitę, o vėliau – bent kartą per mėnesį turėtų būti matuojamas vandens suvartojimas. Galimybė matuoti vandens suvartojimą turėtų būti svarstoma ir atliekant tyrimus, per kuriuos pasikeičia gėrimo įpročiai.

Hematologiniai ir klinikinės biochemijos tyrimai

42. Atliekant tyrimus, per kuriuos naudojami graužikai, po trijų, šešių ir dvylikos mėnesių, taip pat baigus tyrimą (jeigu jis trunka ilgiau nei 12 mėnesių), turėtų būti atlikti visų tyrime dalyvaujančių gyvūnų (po 10 patinų ir 10 patelių kiekvienoje grupėje) hematologiniai tyrimai. Jeigu atliekant tyrimus naudojamos pelės, norint atlikti visus reikiamus hematologinius tyrimus gali reikėti pagalbinių gyvūnų (žr. 19 skirsnį). Jeigu atliekant tyrimus naudojami ne graužikai, ėminiai dar nebaigus tyrimo ir jį baigus, kaip aprašyta graužikų atveju, imami iš mažesnio gyvūnų skaičiaus (pvz., jeigu tiriami šunys – iš keturių kiekvienos lyties gyvūnų kiekvienoje grupėje). Nepaisant to, ar naudojami graužikai, ar ne graužikai, matavimų po trijų mėnesių galima neatlikti, jeigu per anksčiau atliktą 90 dienų tyrimą, per kurį buvo duodamos panašaus dydžio dozės, nebuvo pastebėta poveikio hematologiniams parametrams. Kraujo ėminiai turėtų būti imami iš nurodytos vietos, pvz., širdies punkcijos vietos arba iš užakiduobinio ančio, taikant nuskausminimą.

43. Turėtų būti ištirti šie parametrai (38): bendras leukocitų kiekis ir įvairių leukocitų kiekiai, eritrocitų kiekis, trombocitų kiekis, hemoglobino koncentracija, hematokritas (procentinė kraujo ląstelių tūrio dalis), vidutinis eritrocito tūris (VET), vidutinis hemoglobino kiekis eritrocituose (VHKE), vidutinė eritrocitų hemoglobino koncentracija (VEHK), protrombino laikas ir dalinis aktyvintas tromboplastino laikas. Atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą, prireikus gali būti matuojami ir kiti hematologiniai parametrai, pvz., Heinco kūneliai arba kita netipinė eritrocitų morfologija, arba methemoglobinas. Apskritai turėtų būti laikomasi lankstaus požiūrio, kuriuo būtų atsižvelgiama į pastebėtą ir (arba) numatomą atitinkamos bandomosios cheminės medžiagos poveikį. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga turi poveikio kraujodaros sistemai, gali reikėti nustatyti retikulocitų kiekį ir atlikti kaulų čiulpų citologijos tyrimus, tačiau to nebūtina daryti nuolat.

44. Siekiant ištirti svarbiausius toksinius poveikius audiniams, ypač inkstams ir kepenims, reikėtų atlikti kraujo ėminių, paimtų iš visų tyrime dalyvaujančių gyvūnų (po 10 patinų ir 10 patelių kiekvienoje grupėje) tokiais pat laiko intervalais, kaip nurodyta dėl hematologinių tyrimų, klinikinius biocheminius tyrimus. Jeigu atliekant tyrimus naudojamos pelės, norint atlikti visus reikiamus klinikinės biochemijos tyrimus, gali reikėti pagalbinių gyvūnų. Jeigu atliekant tyrimus naudojami ne graužikai, ėminiai dar nebaigus tyrimo ir jį baigus, kaip aprašyta graužikų atveju, imami iš mažesnio gyvūnų skaičiaus (pvz., jeigu tiriami šunys – iš keturių kiekvienos lyties gyvūnų kiekvienoje grupėje). Nepaisant to, ar naudojami graužikai, ar ne graužikai, matavimų po trijų mėnesių galima neatlikti, jeigu per anksčiau atliktą 90 dienų tyrimą, per kurį buvo duodamos panašaus dydžio dozės, nebuvo pastebėta poveikio klinikinės biochemijos parametrams. Rekomenduojama, kad

▼M4

prieš kraujo ėminių ėmimą gyvūnai (išskyrus peles) būtų nešeriami per naktį. ([1]). Turėtų būti ištirti šie parametrai (38): gliukozė, šlapalas (šlapalo azotas), kreatininas, bendras baltymų kiekis, albuminas, kalcis, natris, kalis, bendras cholesterolio kiekis, ne mažiau kaip du atitinkami kepenų ląstelių tyrimai (alaninaminotransferazė, aspartataminotransferazė, glutamato dehidrogenazė ir bendras tulžies rūgščių kiekis) (39) ir ne mažiau kaip du atitinkami kepenų ir tulžies sistemos tyrimai (šarminė fosfatazė, gamaglutamiltransferazė, 5'-nukleotidazė, bendras bilirubino kiekis, bendras tulžies rūgščių kiekis) (39). Be to, atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą, gali būti naudinga išmatuoti kitus klinikinės chemijos parametrus, pvz., trigliceridų koncentraciją nešėrus, specifinius hormonus ir cholinesterazę. Apskritai turėtų būti laikomasi lankstaus požiūrio, kuriuo būtų atsižvelgiama į pastebėtą arba numatomą atitinkamos bandomosios cheminės medžiagos poveikį.

45. Turėtų būti atlikti visų tyrime dalyvaujančių gyvūnų (po 10 patinų ir 10 patelių kiekvienoje grupėje) šlapimo tyrimai, ėminius imant tokiais pat intervalais, kokie taikomi hematologinės ir klinikinės chemijos tyrimų tikslais. Matavimų po trijų mėnesių galima neatlikti, jeigu per anksčiau atliktą 90 dienų tyrimą, per kurį buvo duodamos panašaus dydžio dozės, nebuvo pastebėta poveikio šlapimo analizės rezultatams. Ekspertų rekomendacijoje dėl klinikinės patologijos tyrimų pateiktas toks parametrų sąrašas (38): išvaizda, tūris, osmosinis slėgis arba savitasis svoris, pH, bendras baltymų kiekis ir gliukozė. Taip pat gali būti tiriamas ketonas, urobilinogenas, bilirubinas ir paslėptasis kraujas. Prireikus išplėsti pastebėto (-ų) poveikio (-ų) tyrimą, gali būti naudojami papildomi parametrai.

46. Paprastai laikoma, kad pradiniai hematologiniai ir klinikinės biochemijos kintamieji prieš pradedant duoti dozę turėtų būti nustatomi atliekant šunų tyrimus, bet jų nebūtina nustatyti atliekant graužikų tyrimus (38). Visgi, jeigu istoriniai pradiniai duomenys (žr. 58 skirsnį) yra netinkami, turėtų būti svarstoma galimybė parengti minėtus duomenis.

PATOLOGIJA

Bendrasis skrodimas

47. Paprastai atliekamas išsamus visų bandomųjų gyvūnų bendrasis skrodimas, atidžiai ištiriant kūno paviršių ir visas jo angas, kaukolę, krūtinės ląstą, pilvo ertmes ir jų turinį. Tačiau taip pat gali būti numatyta (grupėse, kuriose numatytas gyvūnų marinimas nebaigus bandymo, arba pagalbinėse grupėse) atlikti tik tokius matavimus, kurie yra susiję su specifiniais, pagrindiniais matais, pvz., neurotoksiškumu arba imunotoksiškumu (žr. 21 skirsnį). Šių gyvūnų nebūtina skrosti ar su jais atlikti tolesnių procedūrų, aprašytų kituose skirsniuose. Kontrolinius gyvūnus gali reikėti skrosti atsižvelgiant į konkretų atvejį ir vadovaujantis tyrimo vadovo nuožiūra.

([1]) Atliekant kai kuriuos serumo ir plazmos matavimus, ypač gliukozės, pageidautina, kad gyvūnai per naktį negautų pašaro. Pagrindinė tokio poreikio priežastis yra ta, kad dėl padidėjusių nuokrypių, kurių neišvengiamai atsirastų, jeigu gyvūnai būtų šeriami, būtų paslėpti sunkiau pastebimi padariniai ir būtų sunku aiškinti rezultatus. Tačiau reikėtų atkreipti dėmesį, kad per naktį gyvūnams neduodant maisto gali būti padaryta neigiamos įtakos bendrajai gyvūnų medžiagų apykaitai ir, ypač atliekant šėrimo tyrimus, gali būti iškraipytas kasdienis bandomosios cheminės medžiagos poveikis. Visi gyvūnai turėtų būti tiriami tokios pat fiziologinės būklės, todėl pageidautina, kad išsamūs arba neurologiniai tyrimai turėtų būti numatyti kitai dienai nei klinikinės biochemijos tyrimams skirtų ėminių ėmimas.

▼M4

48. Turėtų būti pasveriami visų gyvūnų, išskyrus nurodytuosius 47 skirsnio paskutinėje dalyje, organai. Visų gyvūnų (išskyrus gaištančius ir (arba) numarintus nebaigus bandymo) antinksčiai, sėklidžių prielipai, širdis, inkstai, kepenys, kiaušidės, blužnis, sėklidės, skydliaukė (sveriama po fiksavimo, kartu su prieskydinėmis liaukomis) ir gimda turėtų būti nuvalyti, jeigu reikia, pašalinant prigludusius audinius, ir po skrodimo kuo greičiau pasverti, kol neišdžiuvo.

49. Atsižvelgiant į audinio tipą ir numatomą vėliau atlikti histopatologinį tyrimą, tinkamiausioje fiksavimo terpėje turėtų būti konservuojami šie audiniai (40) (laužtiniuose skliaustuose nurodytų audinių konservuoti nebūtina):

Visi labai pakitę audiniai	Širdis	Kasa	Skrandis (įskrandis, liaukinė skrandžio dalis)
Antinksčiai	Klubinė žarna	Prieskydinė liauka	[Dantys]
Aorta	Tuščioji žarna	Periferinis nervas	Sėklidės
Smegenys (įskaitant didžiųjų smegenų, smegenėlių ir pailgųjų smegenų (smegenų tilto) išpjovas)	Inkstai	Hipofizė	Užkrūčio liauka
Akloji žarna	Ašarų liauka (viršakiduobinė)	Prostata	Skydliaukė
Gimdos kaklelis	Kepenys	Tiesioji žarna	[Liežuvis]
Koaguliatorių liauka	Plaučiai	Seilių liauka	Trachėja
Gaubtinė žarna	Limfmazgiai (paviršiniai ir giluminiai)	Sėklinės pūslelės	Šlapimo pūslė
Dvylikapirštė žarna	Pieno liauka (patelėms – privaloma, patinams – jeigu galima ištirti akimi)	Skeleto raumuo	Gimda (su gimdos kakleliu)
Sėklidžių prielipai	[Viršutiniai kvėpavimo takai, įskaitant nosį, kriaukles ir šalutines nosies ertmes]	Oda	[Šlapimtakis]
Akys (su tinklaine)	Stemplė	Stuburo smegenys (trys lygiai: sprando, krūtinės ląstos ir juosmens)	[Šlaplė]
[Šlaunikaulis su kelio sąnariu]	[Uoslės receptoriai]	Blužnis	Makštis
Tulžies pūslė (jeigu tiriamos ne žiurkės)	Kiaušidės	[Krūtinkaulis]	Kaulų čiulpų išpjova ir (arba) šviežiai paruošta kaulų čiulpų punkcija
Harderio liauka			

▼M4

Jeigu tai poriniai organai, pvz., inkstai, antinksčiai, turėtų būti konservuojami abu organai. Atsižvelgiant į gautas klinikines ir kitokias išvadas, gali reikėti ištirti papildomus audinius. Be to, atsižvelgiant į žinomas bandomosios cheminės medžiagos savybes, turėtų būti konservuojami visi numanomi tiksliniai organai. Atliekant tyrimus, per kuriuos dozė duodama per odą, turėtų būti tiriami organai, nurodyti kaip tirtini, kai dozė duodama per burną; be to, būtina paimti ir užkonservuoti specifinius odos ėminius iš poveikio vietos. Atliekant inhaliacinius tyrimus, konservuotinų ir tirtinų kvėpavimo takų audinių sąrašas turėtų būti sudaromas remiantis šio priedo B.8 skyriuje (9) ir šio priedo B.29 skyriuje (10) pateiktomis rekomendacijomis. Tiriant kitus organus ir (arba) audinius (be specialiai konservuojamų kvėpavimo takų audinių), turėtų būti tiriami organai, nurodyti dėl poveikio per virškinamąjį traktą būdo pateiktame organų sąraše.

Histopatologinis tyrimas

50. Yra parengtos toksikologinės patologijos tyrimų geriausiosios patirties gairės (40). Turėtų būti atlikti bent šie histopatologiniai tyrimai:

— visų didžiausiąją dozę gavusios grupės ir kontrolinės grupės gyvūnų audinių,

— visų per tyrimą nugaišusių arba numarintų gyvūnų audinių,

— visų audinių su plika akimi matomais pakitimais,

— tikslinių audinių arba visų kitų dydžių dozes gavusių grupių gyvūnų audinių, dėl kurių didžiausiąją dozę gavusioje grupėje nustatyta su dozės davimu susijusių pakitimų,

— jeigu tai poriniai organai, pvz., inkstai, antinksčiai, turėtų būti tiriami abu organai.

STEBĖJIMAI (KANCEROGENIŠKUMO BANDYMO ETAPAS)

51. Visi gyvūnai turėtų būti tikrinami, ar jie sveiki arba nenugaišę; paprastai tai turėtų būti daroma kiekvienos dienos pradžioje ir pabaigoje, įskaitant savaitgalius ir švenčių dienas. Be to, kartą per parą turėtų būti patikrinama, ar gyvūnams nepasireiškė specifinių toksikologinės reikšmės požymių. Jeigu per tyrimą naudojamas zondas, gyvūnai turėtų būti tikrinami iš karto po dozės davimo. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas auglių vystymuisi; turėtų būti registruojamas kiekvieno akivaizdžiai matomo ir užčiuopiamo auglio atsiradimo laikas, vieta, dydis, išvaizda ir išsivystymas.

52. Visi gyvūnai turėtų būti pasveriami prieš pradedant duoti dozę, kitas 13 savaičių – ne rečiau kaip kartą per savaitę, o vėliau – bent kartą per mėnesį. Pirmąsias 13 savaičių – ne rečiau kaip kartą per savaitę, o vėliau – bent kartą per mėnesį turėtų būti matuojamas pašaro suvartojimas ir pašaro efektyvumas. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu, pirmąsias 13 savaičių – ne rečiau kaip kartą per savaitę, o vėliau – bent kartą per mėnesį turėtų būti matuojamas vandens suvartojimas. Galimybė matuoti vandens suvartojimą turėtų būti svarstoma ir atliekant tyrimus, per kuriuos pasikeičia gėrimo įpročiai.

▼M4

Hematologiniai ir klinikinės biochemijos tyrimai bei kiti matavimai

53. Siekiant per tyrimą gauti kuo daugiau informacijos, pirmiausia apie veikimo būdo aspektus, gali būti paimti ėminiai, skirti hematologiniams ir klinikinės biochemijos tyrimams, tačiau jie imami tyrimo vadovo nuožiūra. Be to, gali būti naudinga atlikti šlapimo analizę. Informacijos apie šiuos parametrus suteiks duomenys apie gyvūnus, naudotus tyrimo lėtinio toksiškumo bandymo etapu, paprastai trunkančiu 12 mėnesių (34 skirsnis). Daugiau informacijos apie tokių ėminių naudą atliekant kancerogeniškumo tyrimą pateikta rekomendaciniame dokumente Nr. 116 (7). Jeigu imami kraujo ėminiai, tai turėtų būti daroma baigiantis bandymo laikotarpiui – prieš pat gyvūnų numarinimą arba marinimo procedūros metu. Šie ėminiai turėtų būti imami iš nurodytos vietos, pvz., širdies punkcijos vietos arba iš užakiduobinio ančio, taikant nuskausminimą. Be to, tyrimams gali būti paruošti kraujo tepinėliai, ypač jeigu nustatoma, kad tikslinis organas yra kaulų čiulpai; tačiau kancerogeniškumo bandymo etapu atliekamų kraujo tepinėlių tyrimų nauda siekiant įvertinti kancerogeniškumą ir (arba) onkogeniškumą yra abejotina (38).

PATOLOGIJA

Bendrasis skrodimas

54. Paprastai atliekamas išsamus visų tiriamųjų gyvūnų, išskyrus kontrolinius ir kitus pagalbinius gyvūnus (žr. 20 skirsnį), bendrasis skrodimas, atidžiai ištiriant kūno paviršių ir visas jo angas, kaukolę, krūtinės ląstą, pilvo ertmes ir jų turinį. Kontrolinius ir kitus pagalbinius gyvūnus gali reikėti skrosti atsižvelgiant į konkretų atvejį ir vadovaujantis tyrimo vadovo nuožiūra. Atliekant kancerogeniškumo tyrimą organai paprastai nesveriami, nes dėl senėjimo pakitimų, o vėliau – dėl auglių išsivystymo organų svėrimo duomenys tampa nenaudingi. Tačiau jie gali būti svarbūs atliekant įrodomosios duomenų galios vertinimą, o ypač – svarstant veikimo būdo aspektus. Jeigu atliekant pagalbinį tyrimą sveriami organai, tai turėtų būti daroma nė vėliau kaip po metų nuo tyrimo pradžios.

55. Atsižvelgiant į audinio tipą ir numatomą vėliau atlikti histopatologinį tyrimą, tinkamiausioje fiksavimo terpėje turėtų būti konservuojami šie audiniai (40) (laužtiniuose skliaustuose nurodytų audinių konservuoti nebūtina):

Visi labai pakitę audiniai	Širdis	Kasa	Skrandis (įskrandis, liaukinė skrandžio dalis)
Antinksčiai	Klubinė žarna	Prieskydinė liauka	[Dantys]
Aorta	Tuščioji žarna	Periferinis nervas	Sėklidės
Smegenys (įskaitant didžiųjų smegenų, smegenėlių ir pailgųjų smegenų (smegenų tilto) išpjovas)	Inkstai	Hipofizė	Užkrūčio liauka
Akloji žarna	Ašarų liauka (viršakiduobinė)	Prostata	Skydliaukė
Gimdos kaklelis	Kepenys	Tiesioji žarna	[Liežuvis]
Koaguliatorių liauka	Plaučiai	Seilių liauka	Trachėja
Gaubtinė žarna	Limfmazgiai (paviršiniai ir giluminiai)	Sėklinės pūslelės	Šlapimo pūslė

▼M4

Dvylikapirštė žarna	Pieno liauka (patelėms – privaloma, patinams – jeigu galima ištirti akimi)	Skeleto raumuo	Gimda (su gimdos kakleliu)
Sėklidžių prielipai	[Viršutiniai kvėpavimo takai, įskaitant nosį, kriaukles ir šalutines nosies ertmes]	Oda	[Šlapimtakis]
Akys (su tinklaine)	Stemplė	Stuburo smegenys (trys lygiai: sprando, krūtinės ląstos ir juosmens)	[Šlaplė]
[Šlaunikaulis su kelio sąnariu]	[Uoslės receptoriai]	Blužnis	Makštis
Tulžies pūslė (jeigu tiriamos ne žiurkės)	Kiaušidės	[Krūtinkaulis]	Kaulų čiulpų išpjova ir (arba) šviežiai paruošta kaulų čiulpų punkcija
Harderio liauka			

Jeigu tai poriniai organai, pvz., inkstai, antinksčiai, turėtų būti konservuojami abu organai. Atsižvelgiant į gautas klinikines ir kitokias išvadas, gali reikėti ištirti papildomus audinius. Be to, atsižvelgiant į žinomas bandomosios cheminės medžiagos savybes, turėtų būti konservuojami visi numanomi tiksliniai organai. Atliekant tyrimus, per kuriuos dozė duodama per odą, turėtų būti tiriami organai, nurodyti kaip tirtini, kai dozė duodama per burną; be to, būtina paimti ir užkonservuoti specifinius odos ėminius iš poveikio vietos. Atliekant inhaliacinius tyrimus, konservuotinų ir tirtinų kvėpavimo takų audinių sąrašas turėtų būti sudaromas remiantis šio priedo B.8 skyriuje (8) ir šio priedo B.29 skyriuje (9) pateiktomis rekomendacijomis. Tiriant kitus organus ir (arba) audinius (be specialiai konservuojamų kvėpavimo takų audinių), turėtų būti tiriami organai, nurodyti dėl poveikio per virškinamąjį traktą būdo pateiktame organų sąraše.

Histopatologinis tyrimas

56. Yra parengtos toksikologinės patologijos tyrimų geriausiosios patirties gairės (40). Turėtų būti ištirti bent šie audiniai:

— visi didžiausiąją dozę gavusios grupės ir kontrolinės grupės gyvūnų audiniai,

— visi per tyrimą nugaišusių arba numarintų gyvūnų audiniai,

— visi audiniai su plika akimi matomais pakitimais,

— jeigu didžiausiąją dozę gavusioje grupėje pastebima su dozės davimu susijusių histopatologinių pakitimų, tiriami tie patys visų kitų dydžių dozes gavusių grupių gyvūnų audiniai,

— jeigu tai poriniai organai, pvz., inkstai, antinksčiai, turėtų būti tiriami abu organai.

▼M4

DUOMENYS IR ATASKAITOS (KANCEROGENIŠKUMAS IR LĖTINIS TOKSIŠKUMAS)

Duomenys

57. Turėtų būti pateikti kiekvieno gyvūno duomenys pagal visus vertinamus parametrus. Be to, visi duomenys turėtų būti apibendrinti lentelėse, pagal kiekvieną bandomąją grupę nurodant pradedant bandymą turėtų gyvūnų skaičių, atliekant bandymą nugaišusių arba dėl humaniškų priežasčių numarintų gyvūnų skaičių ir kiekvienos žūties arba numarinimo dėl humaniškų priežasčių laiką, gyvūnų su toksiškumo požymiais skaičių, pastebėtų toksiškumo požymių aprašymą, įskaitant kiekvieno toksinio poveikio pasireiškimo laiką, trukmę ir sunkumą, gyvūnų su audinių pakitimais skaičių, pakitimų tipą ir gyvūnų su kiekvieno tipo pakitimais procentinę dalį. Gyvūnams, kuriems pasireiškė toksinis poveikis arba atsirado audinių pakitimų, be pakitimų lygmens įvertinimo, suvestinių duomenų lentelėse turėtų būti pateikti vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai (ištisinio bandymo duomenų).

58. Istoriniai kontroliniai duomenys gali būti vertingi aiškinant tyrimo rezultatus, pvz., kai yra požymių, kad taikant vienalaikę kontrolę gauti duomenys iš esmės skiriasi, palyginti su naujausiais duomenimis, gautais stebint kontrolinius gyvūnus, esančius toje pačioje bandymo patalpoje arba kolonijoje. Istoriniai kontroliniai duomenys, jeigu jie vertinami, turėtų būti pateikti tos pačios laboratorijos ir turėtų būti susiję su to paties amžiaus ir padermės, išvestos penkerių metų laikotarpiu iki svarstomo tyrimo, gyvūnais.

59. Jeigu taikytina, skaitiniai rezultatai turėtų būti įvertinti tinkamu, visuotinai priimtinu statistiniu metodu. Statistiniai metodai ir analizei skirti duomenys turi būti pasirinkti planuojant bandymą (9 skirsnis). Parenkant duomenis, turėtų būti numatytos pataisos atsižvelgiant į gyvūnų išgyvenimą.

60. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikta toliau nurodyta informacija.

Bandomoji cheminė medžiaga:

— fizinė būsena, grynumas, fizinės ir cheminės savybės,

— identifikavimo duomenys,

— cheminės medžiagos šaltinis,

— partijos numeris,

— cheminės analizės pažyma.

Nešiklis (jeigu naudojamas):

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas (jeigu tai ne vanduo).

Bandomieji gyvūnai:

— naudota rūšis ir (arba) padermė ir pasirinkimo pagrindimas,

— gyvūnų skaičius ir amžius pradedant bandymą, nurodant lytį,

— šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.,

— kiekvieno gyvūno masė pradedant bandymą.

▼M4

Bandymo sąlygos:

— dozės davimo būdo ir dozės parinkimo pagrindimas,

— jeigu taikytina, taikyti statistiniai duomenų analizės metodai,

— išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos ir pašaro paruošimą,

— analitiniai duomenys apie pasiektą koncentraciją, preparato stabilumą ir homogeniškumą,

— dozės davimo būdas ir išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos davimą,

— jeigu tai inhaliaciniai tyrimai: ar dozė duodama tik per nosį, ar per visą kūną,

— faktinės dozės (mg/kg kūno masės per parą) ir bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos pašare ir (arba) geriamajame vandenyje (mg/kg arba ppm) perskaičiavimo į faktinę dozę koeficientas, jeigu taikytina,

— išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę.

Rezultatai (turėtų būti pateiktos suvestinių duomenų lentelės ir kiekvieno gyvūno duomenys):

Bendrieji duomenys:

— išgyvenimo duomenys,

— kūno masė ir (arba) kūno masės pokyčiai,

— pašaro suvartojimas, pašaro efektyvumo skaičiavimai, jeigu jie buvo atlikti, ir vandens suvartojimas, jeigu taikytina,

— toksikonetiniai duomenys, jeigu yra,

— oftalmoskopinių tyrimų duomenys (jeigu yra),

— hematologinių tyrimų duomenys (jeigu yra),

— klinikinės chemijos tyrimų duomenys (jeigu yra).

Klinikinės išvados:

— Toksiškumo požymiai,

— nukrypimų dažnumas (ir, jeigu įvertinta, dydis),

— klinikinių požymių pobūdis, sunkumas ir trukmė (laikinieji ar negrįžtamieji).

Skrodimo duomenys:

— galutinė kūno masė,

— organų masė ir masių santykiai, jeigu taikytina,

— skrodimo išvados, nukrypimų dažnumas ir dydis.

Histopatologinis tyrimas:

— histopatologinių tyrimų, išskyrus neoplastinius, rezultatai,

— neoplastinių tyrimų rezultatai,

▼M4

— nustatytų didelių ir mikroskopinių pakitimų sąryšis,

— išsamus visų su dozės davimu susijusių histopatologinio tyrimo rezultatų aprašymas, pateikiant sunkumo lygio vertinimus,

— skaidrių tarpusavio peržiūros ataskaita.

Statistinis rezultatų apdorojimas, jeigu taikytina.

Rezultatų aptarimas, apimantis:

— modeliavimo metodų aptarimą,

— dozės ir reakcijos tarpusavio priklausomybes,

— istorinius kontrolinius duomenis,

— veikimo būdo informacijos svarstymą,

— OD, NNPL ir MPNPL nustatymą,

— reikšmę žmonėms.

Išvados.

LITERATŪRA

1. OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2. EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3. Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the SAFEty Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208

4. Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145–191

5. Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445

6. Šio priedo B.27 skyrius. 90 dienų kartotinės dozės toksiškumo per virškinamąjį traktą ne graužikams tyrimas.

7. OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

8. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9. Šio priedo B.8 skyrius. Poūmis toksiškumas įkvėpus. 28 dienų tyrimas.

10. Šio priedo B.29 skyrius. Pusiau lėtinis toksiškumas įkvėpus. 90 dienų tyrimas.

11. Šio priedo B.9 skyrius. Kartotinės dozės (28 dienų) toksiškumas (per odą).

▼M4

12. Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793–801.

13. Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581–589.

14. Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51–56.

15. Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591–653.

16. Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical SAFEty Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human SAFEty Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1–7.

17. Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical SAFEty Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36: 9–35.

18. Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al*. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical SAFEty Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37–68.

19. Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical SAFEty Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69–98.

20. OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

21. OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/-MONO(2000)7, OECD, Paris.

22. Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729–837.

23. ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

24. Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

25. Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279–284.

26. Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect 105:1196–1203.

▼M4

27. 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos, OL L 276, 2010 10 20, p. 33.

28. National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86–23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

29. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3–906255–06–9.

30. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31. Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21:15–23.

32. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

33. Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.

34. Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691–704.

35. Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.

36. Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

37. Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599–609.

38. Weingand K, Brown G, Hall R *et al*. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and SAFEty Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198–201.

39. EMEA (draft) document „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity“ (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

40. Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

▼**M4**

1 priedėlis

APIBRĖŽTIS

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

▼C1

B.34. **TOKSIŠKUMO VIENOS KARTOS DAUGINIMUISI BANDYMAS**

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. APIBRĖŽTYS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandomoji medžiaga duodama laipsniškomis dozėmis kelioms eksperimentinių patinų ir patelių grupėms. Patinams dozės turėtų būti duodamos augimo metu bent vieną spermatogenezės ciklą (maždaug 56 dienas pelių patinams ir 70 dienų – žiurkių patinams) tam, kad būtų galima įvertinti visus neigiamus bandomosios medžiagos poveikius spermatogenezei.

Tėvinės (P) kartos patelėms dozė turi būti duodama bent dviejų rujų laikotarpį, kad būtų galima įvertinti visus neigiamus bandomosios medžiagos poveikius kiaušinėlių subrendimo atžvilgiu. Tada gyvūnai suporuojami. Bandomoji medžiaga duodama abejoms lytims poravimosi metu ir vėliau duodama tik patelėms, iš pradžių gestacijos, o vėliau laktacijos laikotarpiu. Jei medžiaga duodama per kvėpavimo takus, metodą reikia atitinkamai pakoreguoti.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. **Pasiruošimas**

Prieš pradedant bandymą sveiki jauni gyvūnai atsitiktinės atrankos būdu atrenkami ir suskirstomi į bandomąją bei kontrolinę grupes. Mažiausiai penkias dienas prieš bandymą gyvūnai yra pratinami prie laboratorinių sąlygų. Rekomenduojama bandomąją medžiagą duoti kartu su pašaru ar geriamuoju vandeniu. Galimi ir kiti davimo būdai. Visiems gyvūnams bandomosios medžiagos dozė turėtų būti duodama tuo pačiu būdu visą atitinkamo eksperimento laikotarpį. Jei dozavimui palengvinti naudojamas nešiklis ar kiti priedai, jie turėtų nedaryti jokio toksinio poveikio. Dozė turėtų būti duodama septynis kartus per savaitę.

▼C1

1.6.2. **Eksperimentiniai gyvūnai**

Rūšių parinkimas

Tinkamiausios gyvūnų rūšys yra pelės arba žiurkės. Reikėtų naudoti sveikus dar bandymams nenaudotus gyvūnus. Mažo vaisingumo veislės nenaudotinos. Apibūdinama bandomųjų gyvūnų rūšis, veislė, lytis, svoris ir (arba) amžius.

Norint tinkamai įvertinti vaisingumą, reikėtų tirti tiek patinus, tiek ir pateles. Prieš pradedant duoti dozę, visi bandomieji bei kontroliniai gyvūnai turėtų būti atjunkyti.

Skaičius ir lytis

Kiekvienoje bandomojoje ir kontrolinėje grupėje turėtų būti pakankamas gyvūnų skaičius, kad būtų gaunama apie 20 vaikingų patelių, kurioms artėja arba atėjo atsivedimo laikas.

Taip siekiant užtikrinti pakankamą vaikingų patelių ir prieauglio skaičių, kad būtų galima prasmingai įvertinti galimą bandomosios medžiagos poveikį vaisingumui, gestacijai ir tėvinės kartos P patelių elgesiui, taip pat pirmosios kartos F_1 palikuonių laktacijai, augimui bei vystymuisi nuo apvaisinimo iki subrendimo.

1.6.3. **Bandymo sąlygos**

Pašaras ir vanduo turėtų būti duodami *ad libitum*. Artėjant atsivedimo laikui, vaikingos patelės turėtų būti atskiriamos, perkeliant jas į atsivedimo ar atsivedusių patelių narvelius, kuriuose gali būti būtiniausių medžiagų gūžtai įsirengti.

1.6.3.1. *Dozė*

Turėtų būti naudojamos mažiausiai trys bandomosios bei viena kontrolinė grupės. Jei bandomoji medžiaga duodama naudojant nešiklį, kontrolinei grupei turi būti duodamas didžiausias nešiklio tūris. Jei bandomoji medžiaga mažina pašaro pasisavinimą ar sunaudojimą, gali reikėti gretutinės maitinamos kontrolinės grupės. Jei nėra apribojimų dėl bandomosios medžiagos fizikinių ir cheminių savybių ar biologinio poveikio, geriausia, kad didžiausia dozė tėvinės kartos (P) gyvūnams sukeltų toksinį poveikį, bet ne gaištamumą. Tarpinė(s) bandomosios medžiagos dozė(s) turėtų sukelti minimalų bandomajai medžiagai priskiriamą toksinį poveikį, o mažiausia dozė neturėtų sukelti jokio pastebimo neigiamo poveikio tėvams ar palikuonims. Jei medžiagos dozė duodama per zondą arba su kapsule, ji apskaičiuojama pagal kiekvieno gyvūno kūno masę ir patikslinama kiekvieną savaitę priklausomai nuo kūno masės pokyčių. Norint galima vaikingoms patelėms skirtas dozes apskaičiuoti pagal kūno masės duomenis 0 arba 6 gestacijos dieną.

1.6.3.2. *Ribinis bandymas*

Mažai toksiškų medžiagų atveju, jei davus 1 000 mg/kilogramui dozę negaunama įrodymų, kad bandomoji medžiaga slopina dauginimąsi, bandymų su kitomis dozėmis galima nebedaryti. Jei atlikus išankstinį bandymą, kurio metu naudota didelė medžiagos dozė, sukelianti aiškų toksinį poveikį atsivedusiai patelei, nenustatomas joks neigiamas poveikis vaisingumui, bandymų su kitomis dozėmis galima nebedaryti.

▼C1

1.6.3.3. *Bandymo atlikimas*

Eksperimentų tvarkaraščiai

Kasdieninis dozės davimas tėvinės (P) kartos patinams turėtų prasidėti tada, kai jie sulaukia 5–9 savaičių amžiaus, buvo atjunkyti ir mažiausiai penkias dienas aklimatizavosi. Žiurkėms dozė duodama 10 savaičių prieš jas suporuojant (pelėms aštuonias savaites). Patinus galima numarinti ir ištirti pasibaigus poravimosi laikotarpiui arba palikti ir toliau šerti pašaru su bandomąja medžiaga, kad jie galbūt antrą kartą apvaisintų pateles, ir juos numarinti po to prieš bandymo pabaigą. Tėvinės (P) kartos patelėms dozė turėtų būti pradėta duoti iškart po penkias dienas trukusios aklimatizacijos ir tęstis mažiausiai dvi savaites iki poravimosi periodo pradžios. Šioms patelėms dozė turėtų būti duodama kasdien maždaug tris savaites trunkančio poravimosi laikotarpio metu ir gestacijos laikotarpio metu iki F_1 kartos palikuonių atjunkymo. Jei yra kitų duomenų apie bandomąją medžiagą (pvz., bandomosios medžiagos sukeliamas metabolizmas arba bioakumuliacija), reikėtų apsvarstyti, ar nevertėtų pakeisti dozės davimo tvarkaraštį.

Poravimosi procedūra

Tiriant toksiškumą dauginimuisi, poruojama arba santykiu 1:1 (vienas patinas su viena patele) arba santykiu 1:2 (vienas patinas su dviem patelėmis).

Poruojant santykiu 1:1, viena patelė laikoma kartu su vienu patinu tol, kol prasideda gestacija arba praeina trys savaitės. Kiekvieną rytą patelės turėtų būti apžiūrimos siekiant nustatyti, ar yra spermos arba ar susidarė makšties kamštis. Nulinė gestacijos diena yra ta, kai randama sperma arba susidaręs makšties kamštis.

Tos poros, kurioms nepasiseka susiporuoti, turėtų būti ištiriamos siekiant nustatyti nevaisingumo priežastį.

Todėl galima imtis tokių papildomų procedūrų kaip poravimo su kitais tikrai vaisingais patinais ar vaisingomis patelėmis, mikroskopiškai analizuojant dauginimosi organus ir tiriant kiaušinėlio ir spermatozoidų susiformavimo ciklą.

Vados dydžiai

Gyvūnams, kuriems vaisingumo bandymo metu duodama dozė, leidžiama normaliai atsivesti palikuonių ir auginti juos iki atjunkymo, nestandartizuojant vados dydžio.

Kai atliekamas vados dydžio standartizavimas, siūloma atlikti tokią procedūrą. Praėjus 1–4 dienoms po atsivedimo, kiekvienos vados dydis gali būti reguliuojamas pašalinant perteklinį prieauglį atrankos būdu taip, kad kiekvienoje vadoje liktų keturi patinėliai ir keturios patelės.

Jei neįmanoma vienoje vadoje turėti po keturis kiekvienos lyties palikuonis, tai priimtinas dalinis palikuonių skaičiaus reguliavimas (pvz., penki patinėliai ir trys patelės). Tų vadų, kuriose yra mažiau nei aštuoni palikuonys, skaičius nėra reguliuojamas.

▼C1

1.6.4. **Stebėjimai**

Bandymo metu kiekvienas gyvūnas turėtų būti stebimas kasdien. Reikėtų registruoti atitinkamus elgesio pokyčius, komplikuoto arba užsitęsusio gestacijos požymius ir visus toksiškumo požymius, įskaitant gaištamumą. Prieš poravimosi periodą ir jo metu galima kasdien įvertinti pašaro sunaudojimą. Po atsivedimo ir laktacijos laikotarpiu pašaro sunaudojimą (ir geriamo vandens sunaudojimą, jei bandomoji medžiaga duodama su vandeniu) reikėtų įvertinti tą pačią dieną, kurią sveriama vada. Pirmąją dozės davimo dieną ir vėliau kas savaitę reikėtų sverti tėvinės (P) kartos patinus ir pateles. Šie kiekvieno gyvūno duomenys registruojami atskirai.

Gestacijos trukmė turėtų būti pradedama skaičiuoti nuo nulinės dienos. Kiekviena vada turi būti apžiūrėta kaip galima greičiau po atsivedimo siekiant nustatyti jauniklių lytį, gimusių negyvų ir gimusių gyvų jauniklių skaičių ir dideles anomalijas.

Negyvi ir ketvirtą dieną po gimimo numarinti jaunikliai turėtų būti išsaugoti ir ištirti siekiant nustatyti galimus sutrikimus. Gimę gyvi jaunikliai turėtų būti suskaičiuojami ir vados pasvertos atsivedimo rytą, po to ketvirtą bei septintą dieną ir toliau kas savaitę iki baigsis bandymas, kuomet kiekvienas gyvūnas bus pasvertas atskirai.

Reikėtų registruoti patelių ar jų palikuonių fizinius ar elgesio sutrikimus.

1.6.5. **Patologija**

1.6.5.1. *Nekroskopija*

Tėvinės kartos (P) gyvūnams nugaišus bandymo metu ar juos numarinus, juos reikėtų makroskopiškai ištirti siekiant nustatyti visas struktūrines anomalijas ar patologinius pakitimus, kreipiant ypatingą dėmesį į dauginimosi organus. Nugaišę ar gaištantys jaunikliai turėtų būti ištirti siekiant nustatyti defektus.

1.6.5.2. *Histopatologinis tyrimas*

Mikroskopiniam tyrimui reikėtų išsaugoti tėvinės kartos (P) gyvūnų kiaušides, gimdą, gimdos kaklelį, makštį, sėklides, antsėklidį, spermą gaminančius maišelius, prostatą, koaguliacijos liauką, hipofizę bei bandomąja medžiaga paveiktus organus. Jei šie organai nebuvo tirti atliekant kitus bandymus su daug skirtingų dozių, juos reikėtų mikroskopiškai ištirti didelę dozę gavusiems gyvūnams, kontrolinės grupės gyvūnams bei bandymo metu nugaišusiems gyvūnams, jei tai praktiškai įmanoma.

Tie šių gyvūnų organai, kuriuose nustatytos anomalijos, turėtų būti ištirti visiems likusiems tėvinės kartos (P) gyvūnams. Tokiu atveju reikėtų mikroskopiškai tirti visus audinius, kuriuose pastebėti pagrindiniai patologiniai pokyčiai. Kaip buvo pasiūlyta aprašant suporavimo procedūrą, tų gyvūnų, kurie, kaip įtariama, gali būti nevaisingi, dauginimosi organai gali būti mikroskopiškai tiriami.

▼C1

2. **DUOMENYS**

Duomenys gali būti apibendrinami lentelėse, kuriose nurodomas kiekvienos bandomosios grupės gyvūnų skaičius bandymo pradžioje, vaisingų patinų skaičius, vaikingų patelių skaičius, pokyčių tipai ir gyvūnų, kuriuose pasireiškė kiekvieno tipo pokyčiai, skaičius, išreikštas procentais.

Jei įmanoma, skaičiais išreikšti rezultatai turėtų būti apdorojami tinkamu statistiniu metodu. Galima taikyti bet kurį visuotinai pripažintą statistinį metodą.

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Jei įmanoma, bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

— panaudota rūšis/veislė,

— duomenys apie toksinį atsaką pagal lytį ir duotą dozę, įskaitant vaisingumą, gestaciją ir gyvybingumą,

— nugaišimo laikas bandymo metu arba informacija, kad gyvūnai išgyveno iki bandymo pabaigos,

— lentelė, kurioje pateikiama kiekvienos vados masė, vidutinis jauniklių svoris ir kiekvieno jauniklio kūno masė bandymo pabaigoje,

— toksinis ir kitoks poveikis dauginimuisi, palikuonims bei jų vystymuisi,

— kiekvienos anomalijos pastebėjimo laikas ir tolesnė eiga,

— tėvinės kartos (P) gyvūnų svoris,

— nekroskopijos metu gauti duomenys,

— mikroskopinių tyrimų duomenų išsamus apibūdinimas,

— rezultatų statistinė analizė, jei įmanoma tai padaryti,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų aiškinimas.

3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼C1

B.35. **TOKSIŠKUMO DVIEJŲ KARTŲ DAUGINIMUISI BANDYMAS**

1. **METODAS**

Šis metodas atitinka OECD TG 416 (2001).

1.1. ĮVADAS

Šis dviejų kartų dauginimosi bandymo metodas skirtas suteikti bendros informacijos apie bandomosios medžiagos poveikį patinų ir patelių dauginimosi sistemų vientisumui ir veiksmingumui, įskaitant lytinių liaukų funkciją, rujos ciklą, poravimosi elgesį, apvaisinimą, gestaciją, atsivedimą, laktaciją, atjunkymą ir palikuonių augimą bei vystymąsi. Be to, atliekant bandymą galima gauti informacijos apie bandomosios medžiagos poveikį ką tik atsivestų jauniklių liguistumui, gaištamumui, preliminarių duomenų apie toksinį poveikį prenataliniam ir postnataliniam vystymuisi, taigi juo galima remtis atliekant vėlesnius bandymus. Taikant šį metodą tiriamas ne tik F1 kartos augimas ir vystymasis, jis taip pat skirtas patinų ir patelių dauginimosi sistemų vientisumui bei veiksmingumui ir F2 kartos augimui bei vystymuisi įvertinti. Norint gauti papildomos informacijos apie toksinį poveikį vystymuisi ir funkcinius trūkumus, šį protokolą galima papildyti kitų bandymų segmentais, atsižvelgiant į atitinkamus toksiškumo vystymuisi ir (arba) neurotoksiškumo vystymuisi metodus, arba šie parametrai galėtų būti tiriami atliekant atskirus bandymus taikant atitinkamus bandymų metodus.

1.2. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Kelioms patinų ir patelių grupėms duodamos skirtingos bandomosios medžiagos dozės. P kartos patinai turėtų gauti dozę augdami ir mažiausiai vieną visą spermatogenezės ciklą (maždaug 56 paras pelėms ir 70 parų žiurkėms), kad būtų galima gauti informacijos apie neigiamą poveikį spermatogenezei. Poveikis spermai nustatomas pagal kelis spermos parametrus (pvz., spermos morfologiją ir spermatozoidų judrumą), audinių preparatuose ir darant išsamų histopatologinį tyrimą. Jei duomenų apie spermatogenezę gauta ankstesniame pakankamos trukmės kartotinės dozės bandyme, pvz., 90 parų bandyme, P kartos patinų nebūtina įtraukti į vertinimą. Tačiau rekomenduojama išsaugoti P kartos spermos ėminius arba skaitmeninius užrašus, kad juos vėliau galima būtų įvertinti. P kartos patelės turi gauti dozę augdamos ir kelis visus rujos ciklus, kad būtų galima nustatyti bet kokį neigiamą bandomosios medžiagos poveikį normaliam rujos ciklui. Bandomoji medžiaga duodama tėvų kartos (P) gyvūnams poruojantis, gestacijos metu ir iki jų F1 palikuonių atjunkymo. Po atjunkymo medžiaga toliau duodama F1 palikuonims iki jų subrendimo, poravimosi ir, atsiradus F2 kartai, iki šios kartos palikuonių atjunkymo.

Visi gyvūnai stebimi kliniškai ir atliekami patologiniai tyrimai toksiškumo požymiams nustatyti, kreipiant ypač didelį dėmesį į poveikį patinų ir patelių dauginimosi sistemų vientisumui ir veiksmingumui bei palikuonių augimui ir vystymuisi.

▼C1

1.3. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.3.1. **Gyvūnų rūšies pasirinkimas**

Tinkamiausia bandomųjų gyvūnų rūšis yra žiurkės. Jei naudojama kita rūšis, pasirinkimas turi būti pagrįstas ir padaromi atitinkami reikalingi pakeitimai. Neturi būti naudojamos mažo vaisingumo veislės arba veislės, kurioms dažnai pasireiškia vystymosi trūkumai. Bandymo pradžioje naudojamų gyvūnų masės skirtumai turi būti kiek įmanoma mažesni ir nukrypti ne daugiau kaip 20 % nuo kiekvienos lyties atitinkamos vidutinės masės.

1.3.2. **Laikymo ir šėrimo sąlygos**

Bandomųjų gyvūnų patalpos temperatūra turi būti 22 °C (± 3 °C). Nors santykinė oro drėgmė turėtų būti mažiausiai 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikėtų siekti, kad būtų 50–60 % drėgmė. Apšvietimas turi būti dirbtinis, jo seka: 12 h šviesos ir 12 h tamsos. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, neribojant geriamo vandens kiekio. Pašaro pasirinkimui gali turėti įtakos būtinybė tinkamai įmaišyti bandomąją medžiagą, duodant ją šiuo būdu.

Gyvūnai gali būti laikomi narveliuose atskirai arba mažomis tos pačios lyties gyvūnų grupėmis. Poruojama turi būti šiam tikslui pritaikytuose narveliuose. Pasitvirtinus susiporavimui, suporuotos patelės turi būti laikomos po vieną atsivedimo arba veisimo narveliuose. Suporuotos žiurkės taip pat gali būti laikomos mažomis grupėmis ir atskiriamos likus vienai arba dviem paroms iki atsivedimo. Artėjant atsivedimui, suporuotos patelės turi būti aprūpinamos tinkamomis ir nustatytomis gūžtos sukimo medžiagomis.

1.3.3. **Gyvūnų ruošimas**

Naudojami jauni ir sveiki, ankstesniuose bandymuose nedalyvavę gyvūnai, kurie mažiausiai 5 paras yra pratinami prie laboratorijos sąlygų. Apibūdinama bandomojo gyvūno rūšis, veislė, šaltinis, lytis, masė ir (arba) amžius. Turi būti žinoma visų gyvūnų tarpusavio giminystė, kad būtų išvengta vienų tėvų gyvūnų poravimosi. Gyvūnai atsitiktinai suskirstomi į kontrolinę ir bandymo grupę (rekomenduojama grupuoti pagal kūno masę). Narveliai išdėstomi taip, kad būtų kiek įmanoma sumažintas bet koks galimas poveikis dėl narvelio buvimo vietos. Kiekvienam gyvūnui turėtų būti priskirtas savitas identifikavimo numeris. P kartos gyvūnams tai daroma prieš pradedant duoti bandomąją medžiagą. F1 kartos gyvūnams tai daroma atjunkant poravimui pasirinktus gyvūnus. Duomenys apie visų pasirinktų F1 gyvūnų kilmės vadą turi būti registruojami. Be to, rekomenduojama kiek manoma anksčiau atskirai identifikuoti žiurkiukus, kai numatoma atskirai juos sverti arba daryti kokius nors funkcinius bandymus.

Pradėjus duoti dozes tėvų kartos (P) gyvūnams jie turi būti maždaug 5–9 savaičių. Visų bandomųjų grupių gyvūnai turi būti kiek įmanoma vienodos masės ir amžiaus.

▼C1

1.4. BANDYMO EIGA

1.4.1. **Gyvūnų skaičius ir lytis**

Kiekvienoje bandymo ir kontrolinėje grupėje turi būti pakankamas patelių skaičius, kad atsivedimo momentu arba jam artėjant būtų ne mažiau kaip 20 vaikingų patelių. Tai gali būti neįmanoma bandant medžiagas, sukeliančias nepageidaujamą su bandomąja medžiaga siejamą poveikį (pvz., nevaisingumą, per didelį toksiškumą esant didelei dozei). Tikslas – gauti pakankamą atsivedančių patelių skaičių, kad būtų galima prasmingai įvertinti, kokia yra bandomosios medžiagos geba paveikti vaisingumą, gestaciją, motinos elgesį, laktaciją, F1 palikuonio augimą ir vystymąsi nuo apvaisinimo iki subrendimo ir jo palikuonių (F2) vystymąsi iki atjunkymo. Todėl nepavykus gauti norimą vaikingų patelių skaičių (t. y. 20), bandymas nebūtinai bus netinkamas ir turi būti vertinamas atsižvelgiant į kiekvieną atskirą atvejį.

1.4.2. **Dozių ruošimas**

Rekomenduojama bandomąją medžiagą duoti per virškinamąjį traktą (su pašaru, geriamuoju vandeniu arba per zondą), išskyrus kai manoma, kad tinkamesnis būtų kitas davimo būdas (pvz., per odą arba per kvėpavimo takus).

Prireikus bandomoji medžiaga ištirpinama arba suspenduojama tinkamame nešiklyje. Rekomenduojama visais įmanomais atvejais iš pradžių tirti galimybę naudoti vandeninį tirpalą ar suspensiją, vėliau tirpalą ar emulsiją aliejuje (pvz., kukurūzų aliejuje) ir tik tuomet galimybę tirpinti kitame nešiklyje. Turi būti žinomos nešiklio, išskyrus vandenį, toksinės savybės. Turėtų būti nustatytas bandomosios medžiagos stabilumas nešiklyje.

1.4.3. **Dozavimas**

Turi būti naudojamos mažiausiai trijų dozių grupės ir lygiagrečiai viena kontrolinė grupė. Jei nėra apribojimų dėl fizikinių ir cheminių arba biologinių bandomosios medžiagos savybių, didžiausia dozė pasirenkama siekiant sukelti tam tikrą toksinį poveikį, bet ne žūtį arba sunkias kančias. Nenumatyto gaištamumo atveju bandymai, kuriuose tėvų kartos (P) gyvūnų gaištamumas yra mažesnis kaip maždaug 10 %, paprastai yra dar priimtini. Turi būti pasirinkta mažėjanti dozės koncentracijos seka, siekiant gauti kiekvieną su dozės dydžiu susietą reakciją ir nepastebėto neigiamo poveikio ribą (NOAEL). Mažėjančioms dozės koncentracijos vertėms nustatyti dažnai pakanka dvigubo arba keturgubo koncentracijos skirtumo ir dažnai geriau būtų papildomai naudoti ketvirtą bandymo grupę, užuot naudojus labai didelius intervalus tarp dozių (pvz., daugiklis didesnis kaip 10). Bandomąją medžiagą dedant į pašarus dozės neturėtų skirtis daugiau kaip 3 kartus. Dozės dydis turėtų būti pasirenkamas atsižvelgiant į visus turimus toksiškumo duomenis, ypač kartotinių dozių bandymo rezultatus. Be to, reikėtų nagrinėti visą papildomą informaciją apie bandomojo junginio arba giminingų medžiagų apykaitą ir kinetiką. Kartu ši informacija padėtų sužinoti, ar dozavimo režimo yra tinkamas.

▼C1

Kontrolinė grupė turėtų būti medžiagos negaunanti grupė arba nešiklį gaunanti kontrolinė grupė, jei bandomajai medžiagai duoti naudojamas nešiklis. Išskyrus tai, kad kontrolinės grupės gyvūnai neveikiami bandomąja medžiaga, jie prižiūrimi tokiu pat būdu, kaip ir bandymo grupės gyvūnai. Jei naudojamas nešiklis, kontrolinės grupės turėtų gauti nešiklio kiekį, atitinkanti didžiausią naudojamą nešiklio tūrį. Jei bandomoji medžiaga duodama su pašaru ir dėl to sumažėja pašaro suvartojimas arba įsisavinimas, gali tekti naudoti lygiagrečiai šeriamą kontrolinę grupę. Vietoj lygiagrečiai šeriamos kontrolinės grupės galima naudoti duomenis, gautus kontroliuojamuose bandymuose, skirtuose įvertinti sumažėjusio pašaro suvartojimo įtaką dauginimosi parametrams.

Reikėtų atsižvelgti į šias nešiklio ir kitų priedų savybes: poveikį absorbcijai, pasiskirstymui, medžiagų apykaitai ir bandomosios medžiagos sulaikymui; poveikį bandomosios medžiagos cheminėms savybėms, dėl kurių gali pasikeisti jos toksiškumas; poveikį maisto ar vandens suvartojimui arba gyvūnų įmitimui.

1.4.4. **Ribinis bandymas**

Jei darant bandymą pagal šiame bandyme aprašytas metodikas su viena mažiausiai 1 000 mg/kg kūno masės per parą doze, kuri yra duodama per virškinamąjį traktą, arba su atitinkamos procentinės dalies doze, dedama į pašarą arba į geriamą vandenį, toksinis poveikis tėvų grupių gyvūnams arba jų palikuonims nepastebimas ir jei toks poveikis nenumatomas atsižvelgiant į turimus duomenis apie giminingos struktūros ir (arba) apykaitos junginius, nebūtina daryti visą bandymą, naudojant kelias dozių koncentracijas. Toks ribinis bandymas netaikomas tais atvejais, kai atsižvelgiant į žmonių sąlytį su medžiaga reikia naudoti didesnio dydžio per virškinamąjį traktą duodamas dozes. Kalbant apie kitus davimo būdus, pvz., per kvėpavimo takus arba per odą, bandomosios medžiagos fizikinės ir cheminės savybės dažnai gali lemti ir riboti didžiausią pasiekiamą veikimo lygį.

1.4.5. **Dozių davimas**

Gyvūnai gauna bandomosios medžiagos dozę septynias dienas per savaitę. Geriau duoti per virškinamąjį traktą (su pašaru, geriamuoju vandeniu arba naudojant zondą). Jei duodama kitu būdu, jis turi būti pagrįstas, be to, gali tekti daryti atitinkamus pakeitimus. Atitinkamu bandymo laikotarpiu visi gyvūnai turi gauti dozę vienodu būdu. Kai bandomoji medžiaga duodama per zondą, reikia naudoti skrandžio vamzdelį. Vienu metu duodamo skysčio tūris neturi būti didesnis kaip 1 ml/100 g kūno masės (0,4 ml/100 g kūno masės yra didžiausias kiekis naudojant kukurūzų aliejų), išskyrus vandeninius tirpalus, kurių galima duoti po 2 ml/100 g kūno masės. Išskyrus dirginančias arba ėsdinančias medžiagas, kurios esant didesnei koncentracijai turi sunkesnį poveikį, bandomojo tirpalo tūrio nepastovumas turi būti kiek įmanoma sumažintas, keičiant koncentraciją taip, kad visų dozių tūris būtų pastovus. Darant bandymus su zondu, jaunikliai dažniausiai gauna bandomosios medžiagos netiesiogiai su pienu tol, kol atjunkyti patys pradeda gauti dozes. Jei bandymai daromi medžiagą dedant į pašarą arba geriamąjį vandenį, jaunikliai papildomai gauna bandomosios medžiagos tiesiogiai, kai paskutinę laktacijos laikotarpio savaitę jie pradeda ėsti patys.

▼C1

Jei medžiagos duodamos su pašaru arba geriamuoju vandeniu, svarbu užtikrinti, kad naudojami bandomosios medžiagos kiekiai netrukdytų įprastai mitybai arba vandens pusiausvyrai. Kai bandomoji medžiaga duodama su pašaru, galima naudoti nuolatinę koncentraciją (ppm) arba nuolatinę dozę pagal gyvūno kūno masę; naudotas variantas turi būti nurodytas. Jei medžiaga duodama per zondą, dozė turėtų būti duodama kiekvieną dieną panašiu laiku ir reguliuojama mažiausiai kartą per savaitę, kad būtų užtikrintas stabilus dozės ir gyvūno kūno masės santykis. Reikėtų atsižvelgti į informaciją dėl placentinio pasiskirstymo, reguliuojant per zondą duodamą dozę, nustatomą pagal gyvūno masę.

1.4.6. **Eksperimento tvarkaraštis**

Kasdieninės dozės tėvų kartos (P) patinams ir patelėms pradedamos duoti, kai jie sulaukia 5–9 savaičių. Kasdieninės F1 patinų ir patelių dozės pradedamos duoti po atjunkymo; reikėtų turėti omenyje, kad tais atvejais, kai bandomoji medžiaga duodama su pašaru arba geriamuoju vandeniu, tiesioginis F1 kartos jauniklių veikimas bandomąja medžiaga gali vykti laktacijos laikotarpiu. Abiem lytims (P ir F1) dozės turi būti toliau duodamos mažiausiai 10 savaičių prieš poravimosi laikotarpį. Dozės toliau duodamos abiem lytims 2 savaites poravimosi laikotarpiu. Kai patinai nebereikalingi medžiagos poveikio dauginimuisi įvertinimo aspektu, jie turi būti humaniškai numarinami ir ištiriami. Tėvų kartos (P) patelėms dozės duodamos toliau visą gestacijos laiką ir iki F1 palikuonių atjunkymo. Reikėtų atsižvelgti į dozavimo programos pakeitimus, pagrįstus turima informacija apie bandomąją medžiagą, įskaitant turimus toksiškumo, medžiagų apykaitos indukcijos arba biologinio kaupimosi duomenis. Kiekvieno gyvūno dozė paprastai turėtų būti pagrįsta pačiu paskutiniu atskiro gyvūno masės nustatymu. Tačiau reikia imtis atsargumo priemonių reguliuojant dozės dydį paskutinį gestacijos trimestrą.

P ir F1 kartų patinų ir patelių veikimas medžiaga tęsiamas iki jų numarinimo. Visi P ir F1 suaugę patinai ir patelės turi būti humaniškai numarinami, kai jų nebereikia poveikiui dauginimuisi įvertinti. Visi poravimui nepasirinkti F1 palikuonys ir visi F2 palikuonys po atjunkymo turi būti humaniškai numarinami.

1.4.7. **Poravimo eiga**

1.4.7.1. *Tėvų kartos (P) poravimas*

Kiekvienam suporavimui patelė atskirai uždaroma į narvelį su vienu tą pačią dozę gaunančiu patinu (1:1 poravimas) tol, kol jie susiporuoja, arba 2 savaitėms. Kiekvieną dieną patelės apžiūrimos, ar yra spermos arba ar susidarė makšties kamštis. 0 gestacijos diena laikoma ta diena, kai randama spermos arba makšties kamštis. Jei poravimasis nesėkmingas, galima apsvarstyti galimybę pakartotinai suporuoti patelę su patikrintais tos pačios grupės reproduktoriais. Susiporavę gyvūnai aiškiai nurodomi bandymo duomenyse. Reikėtų vengti vienų tėvų palikuonių poravimo.

▼C1

1.4.7.2. *F 1 kartos poravimas*

Norint poruoti F1 kartos palikuonis F2 kartai gauti, atjunkymo metu iš kiekvienos vados pasirenkamas mažiausiai vienas patinas ir viena patelė poravimui su kitais tą pačią dozę gavusiais kitos vados jaunikliais. Kiekvienos vados jauniklių pasirinkimas turi būti atsitiktinis, jei vienoje vadoje nėra reikšmingų kūno masės arba išvaizdos skirtumų. Tais atvejais, kai skirtumų yra, pasirenkami geriausi kiekvienos vados atstovai. Praktiškai tai geriausiai būtų daryti pagal kūno masę, bet gali labiau tikti atranka pagal išvaizdą. F1 palikuonys poruojami tik pasiekę lytinę brandą.

Turėtų būti įvertintos poros be palikuonių, siekiant nustatyti aiškią nevaisingumo priežastį. Galima imtis papildomo poravimo su kitais patikrintais patinais arba patelėmis, atlikti dauginimosi organų mikroskopinį tyrimą ir rujos ciklų arba spermatogenezės tyrimą.

1.4.7.3. *Antrasis poravimas*

Tam tikrais atvejais, pvz., kai dėl veikimo medžiaga pakinta vados dydis arba pastebimas neaiškus poveikis per pirmąjį poravimą, rekomenduojama P arba F1 kartų suaugusius gyvūnus dar kartą poruoti naujai vadai gauti. Rekomenduojama dar kartą poruoti vados neturėjusias pateles arba patinus su patikrintais priešingos lyties reproduktoriais. Jei laikoma, kad yra būtina bet kurios kartos antroji vada, gyvūnai turėtų būti poruojami praėjus savaitei nuo paskutinės vados atjunkymo.

1.4.7.4. *Vados dydis*

Gyvūnams leidžiama normaliai atsivesti vadą ir auginti palikuonis iki atjunkymo. Standartizuoti vados dydį neprivaloma. Standartizavus vados dydį, išsamiai aprašomas taikytas metodas.

1.5. STEBĖJIMAI

1.5.1. **Klinikiniai stebėjimai**

Bendrasis klinikinis stebėjimas atliekamas kas dieną, ir jei medžiaga duodama per zondą, stebėjimo laiką reikėtų nustatyti atsižvelgiant į didžiausio laukiamo poveikio po medžiagos davimo laiką. Turi būti užrašomi visi elgesio pokyčiai, sunkaus arba ilgesnio atsivedimo požymiai ir visi toksiškumo požymiai. Mažiausiai kas savaitę turėtų būti atliekamas papildomas išsamesnis kiekvieno gyvūno tyrimas, kurį patogu daryti gyvūną sveriant. Du kartus per dieną ir prireikus kartą per dieną savaitgaliais visi gyvūnai turi būti stebimi siekiant nustatyti liguistumo požymius ir nugaišusius gyvūnus.

▼C1

1.5.2. **Tėvų kartos gyvūnų kūno masė ir pašaro ar vandens suvartojimas**

Tėvų kartų (P ir F1) gyvūnai sveriami pirmąją dozės davimo dieną ir vėliau mažiausiai kartą per savaitę. Tėvų kartos (P ir F1) patelės sveriamos ne mažiau kaip 0, 7, 14, ir 20 arba 21 gestacijos dieną, laktacijos metu sveriamos tomis pačiomis dienomis, kaip ir vada, ir gyvūnų numarinimo dieną. Šie rezultatai turi būti pateikiami atskirai apie kiekvieną suaugusį gyvūną. Poravimo ir gestacijos laikotarpiu pašaro suvartojimas turi būti matuojamas mažiausiai kas savaitę. Vandens suvartojimas matuojamas mažiausiai kas savaitę, jei bandomoji medžiaga duodama su vandeniu.

1.5.3. **Rujos ciklas**

P ir F1 kartų patelių rujos ciklo trukmė ir normalumas įvertinamas prieš suporavimą ir, nebūtinai, poravimo metu darant makšties tepinėlius tol, kol bus gautas suporavimo įrodymas. Makšties ar gimdos kaklelio ląstelės turi būti imamos atsargiai, kad nebūtų pažeista gleivinė ir tokiu būdu nebūtų sukeltas netikras veisimas (1).

1.5.4. **Spermos parametrai**

Numarinus P ir F1 patinus užrašoma jų sėklidžių ir antsėklidžių masė ir bent vienas kiekvieno organo pavyzdys paliekamas histopatologiniam tyrimui (žr. 1.5.7, 1.5.8.1 skirsnius). Iš kiekvienos P ir F1 patinų grupės bent 10 gyvūnų pogrupio sėklidės ir antsėklidžiai naudojami homogenizavimui atsparioms spermatidėms ir antsėklidžių uodegoje sukauptiems spermatozoidams suskaičiuoti. Turi būti surinkta to paties pogrupio patinų sperma iš antsėklidžių uodegos arba iš sėklinio latako spermos judrumui ir morfologijai įvertinti. Jei pastebimas su bandomąja medžiaga susijęs poveikis arba jei yra per kitus bandymus gautų duomenų apie galimą poveikį spermatogenezei, turėtų būti tiriama visų kiekvienos dozės grupės patinų sperma; priešingu atveju galima apsiriboti kontrolinės grupės ir didžiausios dozės grupės P ir F1 patinų spermatozoidų skaičiavimu.

Skaičiuojamas bendras homogenizavimui atsparių sėklidžių spermatidžių ir antsėklidžių uodegos spermatozoidų skaičius (2) (3). Spermos atsargas uodegoje galima apskaičiuoti pagal suspensijos, naudojamos kokybiniam įvertinimui, spermatozoidų koncentraciją ir tūrį, ir spermatozoidų, išgautų vėliau sumalant ir (arba) homogenizuojant likusį uodegos audinį, skaičių. Visų dozių patinų grupių pasirinktų pogrupių gyvūnų spermatozoidai skaičiuojami iškart po gyvūnų numarinimo, išskyrus kai filmuojama analoginiu arba skaitmeniniu būdu arba kai bandiniai yra užšaldomi ir analizuojami vėliau. Šiais atvejais kontrolinės ir didelės dozės grupės gali būti analizuojamos pirmos. Jei su bandomąja medžiaga susijusio poveikio (pvz., poveikio spermatozoidų skaičiui, judrumui arba morfologijai) nėra, kitų grupių analizuoti nebūtina. Jei didelę dozę gavusioje grupėje pastebimas su bandomąja medžiaga susijęs poveikis, reikia įvertinti ir mažesnių dozių grupes.

▼C1

Antsėklidžio (arba sėklinio latako) spermatozoidų judrumas įvertinimas arba filmuojamas iš karto po numarinimo. Sperma turi būti išgauta, kiek įmanoma mažinant galimybę jai pakenkti ir skiedžiama judrumui analizuoti, taikant tinkamus metodus (4). Subjektyviai arba objektyviai įvertinama vis labiau judresnių spermatozoidų procentinė dalis. Kai daroma kompiuterinė judėjimo analizė (5) (6) (7) (8) (9) (10), didėjantis judrumas nustatomas pagal vartotojo nustatytas ribines vertes vidutiniam greičiui išilgai trajektorijos ir tiesiškumui arba tiesiškumo indeksui. Jei ėminiai filmuojami (11) arba nekroskopija įrašinėjama kitu būdu, vėliau galima analizuoti tik kontrolinę ir didelę dozę gavusių P ir F1 patinų grupes, išskyrus kai pastebimas su bandomąja medžiaga susijęs poveikis; šiuo atveju dar reikia įvertinti mažesnių dozių grupes. Neturint analoginio arba skaitmeninio vaizdo įrašo, visi visų apdorotų grupių ėminiai analizuojami darant skrodimą.

Daromas antsėklidžio (arba sėklinio latako) spermos ėminio morfologinis įvertinimas. Spermatozoidai (bent 200 vienam ėminiui) ištiriami kaip fiksuoti preparatai bei skystoje terpėje (12) ir klasifikuojami kaip normalūs arba nenormalūs. Morfologinės spermatozoidų anomalijos būtų spermatozoidų sulipimas, izoliuotos galvutės ir deformuotos galvutės ir (arba) uodegėlės. Daromas visų dozių grupių pasirinktų pogrupių patinų įvertinimas iš karto po gyvūnų numarinimo arba vėliau pagal analoginius arba skaitmeninius vaizdo įrašus. Fiksuotus tepinėlius galima analizuoti ir vėliau. Šiais atvejais kontrolinių ir didžiausios dozės grupės gali būti analizuojamos pirmos. Jei su bandomąja medžiaga susijusio poveikio (pvz., poveikio spermatozoidų morfologijai) nėra, kitų grupių analizuoti nebūtina. Jei didelę dozę gavusioje grupėje pastebimas su bandomąja medžiaga susijęs poveikis, reikia įvertinti ir mažesnių dozių grupes.

Jei kuris nors iš pirmiau išvardytų spermos įvertinimo parametrų jau buvo tiriamas darant bent 90 parų toksiškumo sistemai bandymą, šio įvertinimo nebūtina kartoti darant dviejų kartų bandymą. Tačiau rekomenduojama pasilikti P kartos spermos ėminius arba skaitmeninius vaizdo įrašus, kad prireikus būtų galima įvertinti vėliau.

1.5.5. **Palikuonys**

Kiekviena vada tiriama kiek įmanoma greičiau po atsivedimo (0 laktacijos para) norint nustatyti jauniklių skaičių ir lytį, negyvagimius, gyvus palikuonis ir tai, ar yra stambių anomalijų. Nulinę parą rasti negyvi žiurkiukai, jei jie nemaceruoti, tiriami galimiems defektams ir žūties priežasčiai nustatyti, vėliau užkonservuojami. Gyvi žiurkiukai suskaičiuojami ir atskirai pasveriami atsivedimo metu (0 laktacijos para) arba pirmą parą, o vėliau – reguliariai, pvz., 4, 7, 14, ir 21 laktacijos parą. Užrašomos pastebėtos patelių arba palikuonių fizinės ir elgesio anomalijos.

▼C1

Palikuonių fizinis vystymasis daugiausia registruojamas pagal kūno masės padidėjimą. Kiti fiziniai parametrai (pvz., ausų ir akių atsivėrimas, dantų prasikalimas, kailio augimas) gali suteikti papildomos informacijos, tačiau šiuos duomenis būtų geriau vertinti atsižvelgiant į lytinio brendimo duomenis (pvz., amžius ir kūno masė makšties atsidarymo arba apyvarpės atsiskyrimo metu) (13). Rekomenduojama daryti F1 palikuonių funkcinius tyrimus (pvz., motorinio aktyvumo, sensorinės funkcijos, refleksų ontogenezės) prieš ir po atjunkimo, visų pirma, susietus su lytiniu brendimu, jei tokia analizė neįtraukta į atskirus tyrimus. Nustatomas poravimui pasirinktų F1 atjunkytų gyvūnų makšties atsidarymo ir apyvarpės atsiskyrimo laikas. Išmatuojamas F2 žiurkiukų anogenitalinis atstumas nulinę parą po gimimo, jei buvo nustatytas F1 lyčių santykio arba lytinio subrendimo laiko pakitimas.

Funkcinių stebėjimų galima nedaryti tose grupėse, kuriose yra aiškių neigiamo poveikio požymių (pvz., reikšmingas masės didėjimo sumažėjimas ir t. t.). Jei daromi funkciniai tyrimai, jie nedaromi poravimui atrinktiems žiurkiukams.

1.5.6. **Bendroji nekroskopija**

Numarinti arba darant bandymą nugaišę visi tėvų kartos (P ir F1) gyvūnai, visi jaunikliai su išorinėmis anomalijomis arba klinikiniais požymiais, be to, atsitiktinai pasirinktas iš kiekvienos F1 ir F2 kartos kiekvienos vados kiekvienos lyties jauniklis tiriami makroskopiškai struktūros anomalijoms arba patologiniams pakitimams nustatyti. Ypatingas dėmesys kreipiamas į dauginimosi sistemos organus. Humaniškai numarinti leisgyviai jaunikliai ir negyvi jaunikliai, jei nemaceruoti, tiriami galimiems defektams ir žūties priežasčiai nustatyti, vėliau užkonservuojami.

Tiriama visų pirmą kartą atsivedusių patelių gimda implantavimo vietų buvimui ir skaičiui nustatyti, stengiantis nepakenkti histopatologiniam įvertinimui.

1.5.7. **Organų masė**

Numarinus nustatoma visų P ir F1 kartų tėvų kūno ir šių organų masė (poriniai organai sveriami atskirai):

— gimdos, kiaušidžių,

— sėklidės, antsėklidžio (viso ir uodegos),

— prostatos,

— sėklinių pūslelių su koaguliatorių liaukomis ir jų skysčiais ir prostatos (kaip vieno vieneto),

— smegenų, kepenų, inkstų, blužnies, hipofizės, skydliaukės, antinksčių liaukų ir žinomų veikiamų organų.

Po numarinimo nustatoma skrodimui pasirinktų F1 ir F2 jauniklių masė. Sveriami šie vieno atsitiktinai pasirinkto kiekvienos vados kiekvienos lyties jauniklio (žr. 1.5.6 skirsnį) organai: smegenys, blužnis ir užkrūčio liauka.

▼C1

Bendrojo nekroskopijos ir organų masės rezultatai įvertinami atsižvelgiant į stebėjimus kitų kartotinės dozės bandymų metu, jei įmanoma.

1.5.8. **Histopatologiniai tyrimai**

1.5.8.1. *Tėvai*

Histopatologiniam tyrimui fiksuojami ir atitinkamoje terpėje konservuojami šie tėvų (P ir F1) kartos gyvūnų organai ir audiniai arba jų tipiniai ėminiai:

— makštis, gimda ir kaklelis, kiaušidės (konservuojamos atitinkamoje fiksavimo priemonėje),

— viena sėklidė (konservuojama Bouin arba panašioje fiksavimo priemonėje), vienas antsėklidis, sėklinės pūslelės, prostata ir koagulianto liaukos,

— visų poravimui pasirinktų P ir F1 gyvūnų organas (-ai), ankstesniuose bandymuose identifikuotas (-i) kaip veikiamas (-i) organai.

Daromi išsamūs histopatologiniai visų poravimui pasirinktų P ir F1 gyvūnų, priklausančių kontrolinėms ir didelės dozės grupėms, užkonservuotų organų ir audinių tyrimai. P kartos gyvūnų kiaušidžių tyrimas neprivalomas. Dar tiriami mažos bei vidutinės dozės grupių organai, kuriems pasireiškia su bandomąja medžiaga siejami pakitimai, kad būtų lengviau nustatyti NOAEL. Be to, daromas histopatologinis mažos ir vidutinės dozės grupių gyvūnų, kuriems įtariamas sumažėjęs vaisingumas, pvz., kurie negalėjo susiporuoti, pastoti, būti reproduktoriumi arba atsivesti sveikus palikuonis, arba kurių rujos ciklas arba spermatozoidų skaičius, judrumas arba morfologija buvo paveikti, dauginimosi organų įvertinimas. Turi būti ištirti visi dideli pažeidimai, pvz., atrofija arba augliai.

Daromas išsamus sėklidžių histopatologinius tyrimas (pvz., naudojant Bouin fiksavimo skystį, į parafiną įlietus ėminius ir 4–5 μm storio skersinius pjūvius), siekiant nustatyti su bandomąja medžiaga susietą poveikį, pvz., spermatidžių sulaikymą, gemalų ląstelių sluoksnių arba tipų trūkumą, daugiabranduoles dideles ląsteles arba spermatogeninių ląstelių atitrūkimą į prošvaisą (14). Nepažeisto antsėklidžio tyrimas, tiriant galvutę, kūną ir uodegą, gali būti daromas įvertinant išilginį pjūvį. Antsėklidis įvertinamas leukocitų infiltracijai, ląstelių vyraujančių tipų pokyčiui, netipiškoms ląstelėms ir spermatozoidų fagocitozei nustatyti. Patinų dauginimosi organų tyrimui gali būti naudojamas dažymas PAS (jodo perrūgšties ir Šifo reagentu) arba hematoksilinu.

Po laktacijos kiaušidėje turi būti pirminiai ir augantys folikulai ir dideli laktacijos geltonkūniai. Darant histopatologinį tyrimą turėtų būti nustatytas kokybinis pirminių folikulių populiacijos sumažėjimas. F1 patelėms daromas kiekybinis pirminių folikulų įvertinimas; gyvūnų skaičius, kiaušidės skerspjūvio pasirinkimas ir pjūvių ėminių dydis turi statistiškai atitikti taikomą įvertinimo metodiką. Tyrimą sudaro pirminių folikulų, kurie gali būti sujungti su mažais augančiais folikulais, skaičiaus nustatymas, siekiant palyginti paveiktas ir kontrolines kiaušides (15) (16) (17) (18) (19).

▼C1

1.5.8.2. *Atjunkyti jaunikliai*

Histopatologiniam tyrimui fiksuojami ir tinkamoje terpėje laikomi visų jauniklių audiniai, kuriuose pastebima didelių anomalijų, ir paveikti organai, be to, fiksuojami ir laikomi histopatologiniam tyrimui po vieną atsitiktinai pasirinktą F1 ir F2 kartų kiekvienos vados kiekvienos lyties jauniklį, kuris nepasirinktas poravimui. Daromas išsamus histopatologinis konservuoto audinio apibūdinimas, ypatingą dėmesį kreipiant dauginimosi sistemai.

2. **DUOMENYS**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Duomenys pateikiami atskirai ir apibendrinami lentelėse, kuriose nurodomas kiekvienos bandymo grupės ir kiekvienos kartos gyvūnų skaičius bandymo pradžioje, darant bandymą nugaišusių arba dėl gyvūnų gerovės priežasčių numarintų gyvūnų skaičius, visų gyvūnų nugaišimo arba numarinimo laikas, vaisingų gyvūnų skaičius, vaikingų patelių skaičius, toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičius, pastebėtų toksiškumo požymių aprašymas, įskaitant jų pradžios laiką, trukmę ir bet kokio toksinio poveikio sunkumą, pastebėtų klinikinių požymių tėvams ir palikuonims tipai, histopatologinių pakitimų tipai ir atitinkami vados duomenys.

Skaitmeniniai rezultatai turi būti įvertinti taikant atitinkamą visuotinai priimtą statistinį metodą; statistiniai metodai pasirenkami kaip bandymo schemos dalis ir turi būti pagrįsti. Duomenims analizuoti gali padėti dozės ar reakcijos statistiniai modeliai. Ataskaitoje turi būti pakankamas kiekis informacijos apie analizės metodą ir taikytą kompiuterio programą, kad nepriklausomas ekspertas ar statistikos specialistas galėtų iš naujo įvertinti bei atkurti analizės eigą.

2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS

Šio toksiškumo dviejų kartų dauginimuisi bandymo duomenys įvertinami atsižvelgiant į pastebimą poveikį, įskaitant nekroskopiją ir mikroskopinio tyrimo rezultatus. Įvertinamas ryšis tarp bandomosios medžiagos ir anomalijų buvimo, nebuvimo, dažnumo ir sunkumo, įskaitant makroskopinius pakitimus, nustatytus paveiktus organus, paveiktą vaisingumą klinikines anomalijas, paveiktą reprodukavimo gebą ir vados charakteristikas, kūno masės pokyčius, poveikį gaištamumui ir bet kokį kitą toksinį poveikį arba tokio ryšio nebuvimas. Įvertinant rezultatus reikia atsižvelgti į bandomosios medžiagos fizikines ir chemines savybes ir toksikokinetinius duomenis, jei jų yra.

Tinkamai darant toksiškumo dauginimuisi bandymą turi būti gautas patenkinamas poveikio nesukeliančios dozės įvertis ir neigiamo poveikio dauginimuisi, atsivedimui, laktacijai, postnataliniam vystymuisi, įskaitant augimą ir lytinį brendimą supratimas.

▼C1

2.3. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Toksiškumo dviejų kartų dauginimuisi bandymas suteiks informacijos apie kartotinio medžiagos naudojimo poveikį visais dauginimosi ciklo tarpsniais. Pirmiausia bandymas suteikia informacijos apie dauginimosi parametrus ir palikuonių vystymąsi, augimą, brendimą ir išlikimą. Bandymo rezultatai turėtų būti aiškinami atsižvelgiant į pusiau lėtinio toksiškumo, toksiškumo prenataliniam vystymuisi ir į toksikokinetinių bei kitų atliktų bandymų rezultatus. Šio bandymo rezultatai gali būti naudojami įvertinant papildomų cheminės medžiagos bandymų būtinumą. Bandymo rezultatų ekstrapoliavimas žmonėms gali tikti tik tam tikru mastu. Jie labiausiai tinka, kai reikia gauti informacijos apie poveikio nesukeliančias dozes ir leistiną žmonių sąlytį su medžiaga (20) (21) (22) (23).

3. **ATASKAITOS RENGIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitą turi sudaryti ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

— fizinė būsena ir, jei reikia, fizikinės ir cheminės savybės,

— tapatumo duomenys,

— grynumas.

Nešiklis (jei naudojamas):

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei tai ne vanduo.

Bandomieji gyvūnai:

— naudota rūšis ir veislė,

— gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,

— šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras, kraiko medžiagos ir t. t.,

— atskirai kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje.

Bandymo sąlygos:

— dozės koncentracijos pasirinkimo pagrindimas,

— išsami informacija apie bandomosios medžiagos preparato ruošimą arba jos dėjimą į pašarą, gautos koncentracijos vertės,

— preparato stabilumas ir vienalytiškumas,

— išsami informacija apie bandomosios medžiagos davimą,

— bandomosios medžiagos koncentracijos pašare ar geriamajame vandenyje (ppm) perskaičiavimas į tikrąją dozę (mg/kg kūno masės per parą), jei tinka,

— išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę.

▼C1

Rezultatai:

— pašaro suvartojimas ir, jei matuojamas, vandens suvartojimas, pašaro efektyvumas (kūno masės padidėjimas vienam suvartoto pašaro gramui), P ir F1 gyvūnų atveju nurodomas suvartotos bandomosios medžiagos kiekis, išskyrus bendrojo buvimo laikotarpį ir mažiausiai paskutinį laktacijos laikotarpio trečdalį,

— absorbcijos duomenys (jei yra),

— P ir F1 gyvūnų, pasirinktų poravimui, kūno masės duomenys,

— vados ir jauniklių masės duomenys,

— tėvų kartų kūno masė numarinant ir absoliučios bei santykinės organų masės duomenys,

— klinikinių požymių tipas, sunkumas ir trukmė (grįžtami ar negrįžtami),

— nugaišimo darant bandymą laikas arba informacija, kad gyvūnai išgyveno iki numarinimo,

— duomenys apie toksinį atsaką pagal lytį ir dozę, įskaitant poravimosi, vaisingumo, gestacijos, atsivedimo, gyvybingumo ir laktacijos rodiklius; ataskaitoje nurodomi skaičiai, naudojami rodikliams apskaičiuoti,

— toksinis arba kito tipo poveikis dauginimuisi, palikuonims, postnataliniam augimui ir t. t.,

— nekroskopijos rezultatai,

— išsamus visų histopatologinių rezultatų aprašymas,

— P ir F1 patelių, turinčių normalų ciklą, skaičius ir ciklo trukmė,

— suminis spermatozoidų antsėklidžio uodegoje skaičius, vis labiau judresnių spermatozoidų procentinė dalis, morfologiškai normalių spermatozoidų procentinė dalis ir spermatozoidų, su kiekviena identifikuota anomalija, procentinė dalis,

— poravimosi laikas, įskaitant parų iki poravimosi skaičių,

— gestacijos trukmė,

— implantacijų, geltonkūnių skaičius, vados dydis,

— gimusių gyvų jauniklių skaičius ir poimplantaciniai nuostoliai,

— jauniklių su aiškiai matomais išsigimimais skaičius; pateikiamas silpniausių jauniklių skaičius, jei buvo nustatomas,

— jauniklių fiziniai duomenys ir kiti postnatalinio vystymosi duomenys; įvertinti fiziniai parametrai turi būti pagrįsti,

— jauniklių ir suaugusių gyvūnų funkcinių stebėjimų duomenys, kai tinka,

— statistinis duomenų apdorojimas, jei reikia.

▼C1

Rezultatų aptarimas.

Išvados, įskaitant patelėms ir palikuonims gautas NOAEL vertes.

4. **NUORODOS**

1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals*: I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12:92–108.

3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103–107.

4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5:39–44

5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3):237–244.

6) Chapin, R.E. et al., (1992) Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267–273

7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409–421.

8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449–458.

9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology*, Part A., Academic, Orlando, Florida. pp. 319–333.

10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10: 401–415.

11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8:330–337.

12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6:491–505.

13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17:298303.

14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, p. 421–426.

▼C1

17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

18) Smith, B.J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5:379–383.

19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston, and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

20) Thomas, J.A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and CD. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

21) Zenick, h. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

22) Palmer, A.K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

23) Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼M4

B.36. **TOKSIKOKINETIKA**

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 417 (OECD bandymo gaires Nr. 417) (2010). Tyrimai, per kuriuos nagrinėjamos bandomosios cheminės medžiagos toksikokinetinės savybės, atliekami siekiant gauti tinkamos informacijos apie tos cheminės medžiagos sugertį, pasiskirstymą, biologinę transformaciją (t. y. metabolizmą) ir šalinimą, padėti susieti koncentraciją arba dozę su nustatytuoju toksiškumu ir padėti suprasti tos cheminės medžiagos toksinio poveikio mechanizmą. Toksikokinetinė informacija, kuria nurodoma, kad bandomieji gyvūnai sistemingai veikiami bandomąja chemine medžiaga, ir atskleidžiama, kurios dalys yra cirkuliacinės (pradinė cheminė medžiaga ir (arba) metabolitai), gali padėti suprasti toksikologinius tyrimus Pagrindiniai remiantis šiais tyrimais nustatyti toksikokinetiniai parametrai taip pat suteiks informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos galimybę kauptis audiniuose ir (arba) organuose ir galimybę sužadinti biologinę transformaciją, kaip bandomosios cheminės medžiagos poveikio rezultatą.

2. Toksikokinetiniai duomenys gali padėti įvertinti toksiškumo gyvūnams duomenų tinkamumą ekstrapoliuoti, siekiant nustatyti žmogui gresiančius pavojus ir (arba) įvertinti riziką. Be to, toksikokinetiniai tyrimai gali suteikti naudingos informacijos siekiant nustatyti per toksiškumo tyrimus taikytinus dozių dydžius (tiesinė ir netiesinė kinetika), taikant tam tikrą dozės davimo būdą sukeliamą poveikį, biologinį įsisavinimą ir su tyrimo planu susijusius aspektus. Tam tikri toksikokinetiniai duomenys gali būti naudojami kuriant fiziologija pagrįstus toksikokinetinius (FPTK) modelius.

3. Duomenis apie metabolitus ir (arba) toksikokinetines savybes galima panaudoti svarbiais tikslais, pvz., siekiant pagrįsti galimą toksinį poveikį, veikimo būdus ir jų sąsają su dozės dydžiu ir poveikio būdu. Be to, duomenys apie metabolizmą gali suteikti informacijos, kuri būti naudinga vertinant bandomosios cheminės medžiagos išorinių metabolitų poveikio toksikologinę svarbą.

4. Tinkami toksikokinetiniai duomenys padės pagrįsti tolesnį kiekybinių struktūros ir savybių ryšių, analogijos arba grupavimo metodų priimtinumą ir taikomumą vertinant cheminių medžiagų saugumą. Be to, kinetiniai duomenys gali būti naudojami vertinant toksikologinę kitų tyrimų (pvz., *in vivo* ir (arba) *in vitro*) reikšmę.

5. Jeigu nenurodoma kitokio dozės davimo būdo (pirmiausia žr. 74–78 skirsnius), Šis bandymo metodas taikomas bandomąją cheminę medžiagą duodant per burną.

PIRMINIAI ASPEKTAI

6. Reglamentavimo sistemomis siekiama patenkinti skirtingas reikmes ir keliami skirtingi reikalavimai dėl pasekmių ir parametrų, susijusių su įvairių klasių cheminių medžiagų (pvz., pesticidų, biocidų, pramoninių cheminių medžiagų) toksikokinetinėmis savybėmis, vertinimo. Kitaip nei daugelio metodų atveju, šiuo bandymo metodu aprašomi toksikokinetinių savybių bandymai, apimantys įvairius matavimus ir pasekmes. Ateityje gali būti parengta keletas naujų bandymų metodų ir (arba) rekomendacinių dokumentų, skirtų atskirai išsamiau apibūdinti kiekvieną pasekmę. Tai, kokie bandymai arba vertinimai atliekami pagal šį bandymo metodą, nustatyta kiekvienos reglamentavimo sistemos reikalavimais.

▼M4

7. Yra daug tyrimų, kurie galėtų būti atliekami siekiant reglamentavimo tikslais įvertinti bandomosios cheminės medžiagos toksikokinetines savybes. Tačiau, atsižvelgiant į konkrečias reglamentavimo reikmes arba aplinkybes, norint įvertinti bandomąją cheminę medžiagą gali reikėti atlikti ne visus šiuos galimus tyrimus. Planuojant toksikokinetinius tyrimus reikėtų laikytis lankstaus požiūrio, kuriuo būtų atsižvelgiama į tiriamos bandomosios cheminės medžiagos savybes. Kartais, siekiant ištirti bandomosios cheminės medžiagos keliamus pavojus ir riziką, gali reikėti išnagrinėti tik tam tikrą klausimų rinkinį. Tam tikrais atvejais toksikokinetiniai duomenys gali būti renkami atliekant vertinimus per kitus toksikologinius tyrimus. Dar kitais atvejais, atsižvelgiant į reglamentavimo reikmes ir (arba) vertinant bandomąją cheminę medžiagą kilus naujų klausimų, gali reikėti atlikti papildomus ir (arba) išsamesnius toksikokinetinius tyrimus.

8. Siekdama užtikrinti aukštesnę tyrimo kokybę ir išvengti nebūtino gyvūnų naudojimo, bandymų laboratorija, prieš atlikdama tyrimą, turėtų įvertinti visą turimą informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą ir susijusius metabolitus bei analogus. Šiuo tikslu galėtų būti naudojami duomenys, gauti taikant kitus susijusius bandymo metodus (tyrimus *in vivo* ir *in vitro* ir (arba) vertinimus *in silico*). Planuojant tyrimą ir aiškinant rezultatus, gali būti naudinga žinoti cheminės medžiagos fizines ir chemines savybes, pvz., oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientą (išreikštą log P_{OW}), pKa, tirpumą vandenyje, garų slėgį ir molekulinę masę). Šie dydžiai gali būti nustatomi taikant atitinkamus metodus, kaip aprašyta dėstant susijusius bandymus metodus.

APRIBOJIMAI

9. Šis bandymo metodas nėra skirtas taikyti ypatingomis aplinkybėmis, pvz., kai naudojamos apvaisintos arba maitinančios patelės ir jaunikliai arba kai siekiama įvertinti galimus cheminių medžiagų likučius maistinių gyvūnų organizme. Tačiau atlikus B.36 tyrimą gauti duomenys gali būti naudojami kaip pagalbinė informacija planuojant specialius tyrimus, per kuriuos siekiama ištirti minėtus dalykus. Šis bandymo metodas nėra skirtas nanomedžiagų bandymams. OECD bandymų gairių taikymo nanomedžiagoms galimybės išankstinio vertinimo ataskaitoje nurodoma, kad TG 417 (B.36 bandymo metodo atitikmuo) negali būti taikomos nanomedžiagoms (1).

APIBRĖŽTYS

10. Aprašant šį metodą vartojamos apibrėžtys pateiktos priedėlyje.

GYVŪNŲ GEROVĖS ASPEKTAI

11. Humaniško elgesio su gyvūnais gairės pateiktos OECD rekomendaciniame dokumente (RD) Nr. 19 (2). OECD rekomendaciniu dokumentu Nr. 19 rekomenduojama remtis atliekant visus aprašant šį bandymo metodą nurodytus tyrimus *in vivo* ir *in vitro*.

METODŲ APRAŠYMAS

Bandomieji tyrimai

12. Rekomenduojama ir raginama atlikti bandomuosius tyrimus, skirtus parinkti toksikokinetiniams tyrimams (pvz., metabolizmo, masių balanso, analizės procedūrų, dozių nustatymo, CO_2 iškvėpimo ir t. t.) taikytinus bandymų parametrus. Siekiant apibūdinti kuriuos nors iš šių parametrų gali ir nereikėti naudoti radioaktyviu izotopu žymėtąsias chemines medžiagas.

▼M4

Gyvūnų parinkimas

Rūšis

13. Pageidautina, kad per toksikokinetinius bandymus naudojamų gyvūnų rūšis (ir padermė) būtų tokia pat, kokia naudojama per kitus dominančios bandomosios cheminės medžiagos toksikologinius tyrimus. Paprastai turėtų būti naudojamos žiurkės, nes jos plačiai naudojamos atliekant toksikologinius tyrimus. Gali būti pagrįstas ir kitų arba papildomų rūšių naudojimas, jeigu svarbūs toksikologiniai tyrimai rodo didelį toksiškumą šioms rūšims arba jeigu įrodoma, kad su jomis susijęs toksiškumas ir (arba) toksikokinetika yra artimesni žmonėms. Gyvūnų rūšies ir jų padermės pasirinkimas turi būti pagrįstas.

14. Jeigu nurodyta kitaip, taikant šį bandymo metodą bandymai atliekami su žiurkėmis. Norint naudoti kitas gyvūnų rūšis, gali reikėti pakoreguoti kai kuriuos šio metodo aspektus.

Amžius ir padermė

15. Turėtų būti naudojami jauni, sveiki, suaugę gyvūnai (paprastai tokie, kuriems dozės davimo metu yra suėję 6–12 savaičių) (taip pat žr. 13 ir 14 skirsnius). Jeigu naudojami ne jauni suaugę gyvūnai, tai turėtų būti pagrįsta. Pradedant tyrimą, visi gyvūnai turėtų būti panašaus amžiaus. Atskirų gyvūnų kūno masės skirtumai turėtų nenukrypti nuo bandomosios grupės masės vidurkio daugiau kaip ± 20 %. Geriausia, kad būtų naudojama tokia pat padermė, kokia buvo naudojama sudarant tos bandomosios cheminės medžiagos toksikologinę duomenų bazę.

Gyvūnų skaičius ir lytis

16. Kiekvienai bandomai dozei turėtų būti naudojama ne mažiau kaip po keturis vienos lyties gyvūnus. Naudojamų gyvūnų lyties pasirinkimas turėtų būti pagrįstas. Jeigu yra įrodymų, kad toksiškumas skirtingų lyčių gyvūnams gerokai skiriasi, turėtų būti svarstoma galimybė naudoti abiejų lyčių gyvūnus (po keturis patinus ir keturias pateles).

Laikymo ir šėrimo sąlygos

17. Bandymų laikotarpiu gyvūnai paprastai turėtų būti laikomi po vieną. Ypatingomis aplinkybėmis gali būti pateisinamas gyvūnų laikymas grupėmis. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, taikant 12 h šviesos ir 12 h tamsos seką. Bandomųjų gyvūnų laikymo patalpos temperatūra turėtų būti 22 °C (± 3 °C), santykinis drėgnis – 30–70 %. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijose naudojamas pašaras, neribojant geriamojo vandens kiekio.

Bandomoji cheminė medžiaga

18. Tiriant visus masių balanso ir metabolitų nustatymo aspektus, turėtų būti naudojama bandomoji cheminė medžiaga, žymėta radioaktyviu izotopu ^{14}C; tačiau, jeigu galima įrodyti, kad:

— masių balansas ir metabolitai gali būti tinkamai įvertinti naudojant nežymėtą bandomąją cheminę medžiagą,

— nenaudojant radioaktyviu izotopu nežymėtą bandomąją cheminę medžiagą taikomo metodo analizinis tikslumas ir jautrumas yra toks pat arba didesnis nei būtų galima užtikrinti naudojant radioaktyviu izotopu žymėtą bandomąją cheminę medžiagą,

▼M4

radioaktyviu izotopu žymėtosios bandomosios cheminės medžiagos naudoti nebūtina. Be to, gali būti naudojami kiti radioaktyvus ir stabilūs izotopai, ypač jeigu nuo elemento bent iš dalies priklauso tos bandomosios cheminės medžiagos toksiškumas. Jeigu įmanoma, radioaktyvus izotopas turėtų būti molekulės branduolyje, kuris būtų metaboliškai stabilus (nepakeičiamas, nepašalinamas dėl metabolizmo kaip CO_2 ir organizme netampantis vieno anglies atomo junginių dalimi). Norint atsekti bandomosios cheminės medžiagos metabolinį išliekamumą, gali reikėti pažymėti keletą molekulės vietų arba tam tikras jos sritis.

19. Radioaktyviais izotopais žymėtos ir nežymėtos bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti analizuojamos taikant atitinkamus metodus, siekiant nustatyti jų grynumą ir tapatumą. Radioaktyvios bandomosios cheminės medžiagos radiologinis grynumas turėtų būti didžiausias tos cheminės medžiagos atveju pasiekiamas grynumas (geriausia, kad jis būtų didesnis kaip 95 %); turėtų būti imamasi pagrįstų priemonių, kad būtų nustatytos priemaišos, kurių koncentracija 2 % arba didesnė. Grynumas ir nustatytų priemaišų tapatumas bei dalis turėtų būti nurodyti ataskaitoje. Pagal konkrečias reglamentavimo programas gali būti nuspręsta parengti daugiau rekomendacijų, padėsiančių apibrėžti ir apibūdinti iš mišinių sudarytas bandomąsias chemines medžiagas ir priemaišų nustatymo metodus.

Dozių parinkimas

Bandomasis tyrimas

20. Paprastai bandomajam tyrimui pakanka vienos dozės per burną. Dozė turėtų būti netoksiška, tačiau pakankamai didelė, kad būtų galima nustatyti išskyrose (ir, jeigu reikia, plazmoje) esančius metabolitus, taip pat pasiekti nustatytą bandomojo tyrimo tikslą, kaip nurodyta šio bandymo metodo 12 skirsnyje.

Pagrindiniai tyrimai

21. Per pagrindinius tyrimus rekomenduojama duoti dvi dozes, nes bent iš dviejų dozę gaunančių grupių surinkta informacija gali padėti nustatyti dozes kitiems toksiškumo tyrimams ir įvertinti dozės ir reakcijos sąryšį, pasireiškusį per jau atliktus toksiškumo bandymus.

22. Jeigu duodamos dvi dozės, jos abi turėtų būti pakankamai didelės, kad būtų galima nustatyti išskyrose (ir, jeigu reikia, plazmoje) esančius metabolitus. Parenkant dozes turėtų būti atsižvelgiama į informaciją, pagrįstą turimais toksiškumo duomenimis. Jeigu informacijos nėra (pvz., pagrįstos ūmaus toksiškumo per virškinamąjį traktą tyrimais, per kuriuos buvo registruojami klinikiniai toksiškumo požymiai, arba kartotinės dozės toksiškumo tyrimais), nustatant didesniąją dozę gali būti svarstoma galimybė taikyti vertę, kuri būtų mažesnė už LD_{50} (poveikio per burną arba odą būdai) arba LC_{50} (poveikio per kvėpavimo takus būdas) įvertį arba mažesnė už apatinę ūmaus toksiškumo intervalo įverčio vertę. Apskritai mažesnioji dozė turėtų būti trupmeninė didesniosios dozės dalis.

23. Kai tiriama tik vieno dydžio dozė, būtų geriausia, jeigu dozė būtų pakankamai didelė, kad būtų galima nustatyti išskyrose (ir, jeigu reikia, plazmoje) esančius metabolitus, nesukeliant akivaizdaus toksiškumo. Turėtų būti pagrįsta, kodėl neduodama antrojo dydžio dozės.

24. Kai reikia nustatyti dozės poveikį kinetiniams procesams, dviejų dozių gali nepakakti, o viena dozė turi būti pakankamai didelė, kad būtų įsotinti šie procesai. Jeigu po plazmos koncentracijos ir laiko tarpusavio priklausomybės kreive susidarančio ploto kitimas remiantis dviem per pagrindinį tyrimą taikytais dozių dydžiais nėra tiesinis, tai aiškiai rodo, kad kažkur tarp dviejų dozių dydžių įsotinamas vienas arba daugiau kinetinių procesų.

▼M4

25. Jeigu cheminės medžiagos toksiškumas yra mažas, turėtų būti taikoma ne didesnė kaip 1 000 mg/kg kūno masės dozė (dozę duodant per burną ir per odą; rekomendacijos dėl dozės dydžio, kai dozė duodama per kvėpavimo takus, pateiktos šio priedo B.2 skyriuje; paprastai ši dozė turėtų neviršyti 2 mg/l). Atsižvelgiant į konkrečią cheminę medžiagą ir reglamentavimo reikmes, gali reikėti naudoti didesnę dozę. Dozės parinkimas turėtų būti pagrįstas.

26. Norint nustatyti kaupimosi galimybes ir (arba) tvarumą, gali pakakti vienos dozės toksikokinetinių ir pasiskirstymo audiniuose duomenų. Tačiau tam tikromis aplinkybėmis gali reikėti duoti kartotinę dozę: i) kai norima išsamiai išnagrinėti kaupimosi galimybes ir (arba) tvarumą arba toksikokinetinių savybių pakitimus (pvz., fermentų sužadinimo ir slopinimo) arba ii) kai to reikalaujama pagal reglamentavimo sistemą. Nors, atliekant kartotinės dozės tyrimus, paprastai pakanka duoti mažiausiąją kartotinę dozę, tam tikromis aplinkybėmis gali reikėti duoti ir didžiausiąją kartotinę dozę (taip pat žr. 57 skirsnį).

Bandomosios cheminės medžiagos davimas

27. Bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti ištirpinta tokiame pačiame nešiklyje, koks buvo naudojamas atliekant kitus bandomosios cheminės medžiagos toksiškumo tyrimus, per kuriuos bandomoji cheminė medžiaga buvo duodama zondu per burną, arba turėtų būti pagaminta homogeniška bandomosios cheminės medžiagos suspensija tokiame nešiklyje, jeigu apskritai yra informacijos apie nešiklį. Turėtų būti pateiktas nešiklio parinkimo pagrindimas. Nešiklio ir dozės dydžio parinkimas turėtų būti apsvarstyti planuojant tyrimą. Įprastas dozės davimo būdas – zondu, tačiau tam tikrais atvejais gali būti naudinga dozę duoti naudojant želatinos kapsulę arba paruošiant maistinį mišinį (abiem atvejais būtina pateikti pagrindimą). Turėtų būti pateiktas kiekvienam gyvūnui faktiškai duotos dozės patvirtinimas.

28. Didžiausias skysčio, kuris vienu kartu bus duodamas per burną zondu, tūris priklauso nuo bandomųjų gyvūnų dydžio, dozės nešiklio pobūdžio ir to, ar prieš duodant bandomosios cheminės medžiagos dozę gyvūnas kurį laiką nešeriamas. Turėtų būti pateiktas pašaro davimo arba ribojimo prieš dozės davimą pagrindimas. Paprastai, naudojant vandeninius ar nevandeninius nešiklius, tūris turėtų būti kiek įmanoma mažesnis. Dozės tūris paprastai turėtų neviršyti 10 ml/kg graužiko kūno masės. Geriau tirpstančioms riebaluose bandomosioms cheminėms medžiagoms naudojamų nešiklių tūris turėtų būti ne mažesnis kaip 4 ml/kg kūno masės. Duodant kartotinę dozę, kai visą parą nešerti negalima, turėtų būti apsvarstyta galimybė duoti mažesnę dozę (pvz., 2–4 ml/kg kūno masės). Jeigu įmanoma, gali būti apsvarstyta galimybė naudoti tokį dozės tūrį, kuris atitiktų duodamą per kitus bandomosios cheminės medžiagos tyrimus, per kuriuos dozė duodama per burną zondu.

29. Siekiant nustatyti biologinį įsisavinimą arba santykinę oralinę sugertį, gali būti taikomas intraveninis bandomosios cheminės medžiagos davimas ir atliekamas bandomosios cheminės medžiagos matavimas kraujyje ir (arba) išskyrose. Atliekant intraveninį tyrimą, naudojant tinkamą nešiklį duodama viena bandomosios cheminės medžiagos dozė (paprastai tokio pat dydžio kaip mažiausioji oralinė dozė, bet ne didesnė; žr. apie dozės parinkimą). Tinkamas šios medžiagos tūris (pvz., 1 ml/kg kūno masės) pasirinktoje davimo vietoje turėtų būti duodamas ne mažiau kaip keturiems reikiamos lyties gyvūnams (jeigu tai pagrįsta, gali būti naudojamos abi lytys; žr. 16 skirsnį). Cheminę medžiagą duodant intraveniniu būdu, būtina paruošti visiškai ištirpintą dozę arba jos suspensiją. Intraveniniam dozės davimo būdui naudojamas nešiklis neturėtų gadinti kraujo arba jo apytakos. Jeigu

▼M4

bandomoji cheminė medžiaga duodama infuzijos būdu, turėtų būti nurodytas infuzijos greitis, kuris, jeigu naudojamas infuzijos siurblys, turėtų būti suvienodintas visiems gyvūnams. Jeigu taikomas kaniuliavimas per jungo veną (duodant cheminės medžiagos dozę ir (arba) imant kraują) arba jeigu dozė duodama per šlaunies arteriją, turėtų būti taikoma anestezija. Turėtų būti deramai parinktas anestezijos tipas, nes jis gali turėti įtakos toksikokinetikai. Prieš duodant bandomosios cheminės medžiagos dozę su nešikliu, gyvūnams turėtų būti duodama pakankamai laiko atsigauti.

30. Tiriant tam tikras bandomąsias chemines medžiagas, atsižvelgiant į jų fizines ir chemines savybes ir numatomą naudojimo arba poveikio žmonėms būdą, gali būti taikomi kitokie dozės davimo būdai, pvz., per odą arba kvėpavimo takus (žr. 74–78 skirsnius).

Matavimai

Masių balansas

31. Masių balansas nustatomas sudedant su šlapimu, išmatomis ir iškvėptu oru pašalintą duotos (radioaktyvios) dozės procentinę dalį ir procentinę dalį audiniuose, likusioje skerdenoje ir narvelio paplavose (žr.46 skirsnį). Paprastai laikoma, kad bendras duotos bandomosios cheminės medžiagos (radioaktyvių izotopų) regeneravimas yra tinkamas, jeigu jis ne mažesnis kaip 90 %.

Sugertis

32. Pradinį sugerties įvertį galima gauti iš masių balanso įverčio atimant dozės procentinę dalį virškinimo trakte ir (arba) išmatose. Kaip apskaičiuoti procentinę sugertį nurodyta 33 skirsnyje. Išskyrų tyrimai aprašyti 44–49 skirsniuose. Jeigu tikslaus sugerties, pasireiškusios davus dozę per burną, laipsnio nustatyti remiantis masių balanso tyrimais negalima (pvz., jeigu išmatose yra daugiau kaip 20 % duotos dozės), gali reikėti atlikti papildomus tyrimus. Šie tyrimai gali būti tokie: 1) bandomosios cheminės medžiagos davimas per burną ir bandomosios cheminės medžiagos kiekio tulžyje matavimas arba 2) bandomosios cheminės medžiagos davimas per burną ir intraveniniu būdu ir grynojo bandomosios cheminės medžiagos kiekio šlapime, taip pat iškvėptame ore ir skerdenoje matavimas pagal abu minėtuosius dozės davimo būdus. Pagal kiekvieną tyrimo planą atliekamas radioaktyvumo matavimas, taikomas kaip pakaitinis cheminei medžiagai pritaikytas bandomosios cheminės medžiagos ir metabolitų analizės metodas.

33. Jeigu atliekamas šalinimo su tulžimi tyrimas, paprastai dozė duodama per burną. Atliekant šį tyrimą, į ne mažiau kaip keturių reikiamos lyties (arba, jeigu tai pagrįsta, į abiejų lyčių) gyvūnų tulžies latakus turėtų būti įvedami vamzdeliai ir suleidžiama viena bandomosios cheminės medžiagos dozė. Suleidus bandomąją cheminę medžiagą, turėtų būti stebimas radioaktyvių izotopų ir (arba) bandomosios cheminės medžiagos šalinimas su tulžimi, stebint tiek laiko, kad būtų galima įvertinti šiuo būdu duodamos dozės procentinę dalį; šis įvertis gali būti naudojamas tiesiogiai apskaičiuoti oralinės sugerties laipsnį, kaip nurodyta toliau:

$$\text{Procentinė sugertis} = \frac{(\text{Kiekis tulžyje} + \text{Kiekis šlapime} + \text{Kiekis iškvėptame ore} + \text{Kiekis skerdenoje} - \text{Kiekis virškinimo trakte})}{\text{Duota dozė}} \times 100$$

34. Kai kurių klasių bandomųjų cheminių medžiagų atveju tiesioginis absorbuotos dozės išskyrimas gali vykti per žarnų sieneles. Tokiais atvejais dozės procentinės dalies išmatose matavimas po dozės davimo, naudojant žiurkes, kurioms į tulžies latakus įvesti vamzdeliai, nelaikomas tinkamu neabsorbuotos dozės matavimu. Jeigu manoma, kad vyks šalinimas per žarnyną, rekomenduojama sugertą procentinę dozės dalį nustatyti remiantis sugertimi, apskaičiuojama lyginant šalinimą po dozės davimo per burną ir šalinimą po intraveninio dozės davimo (sveikoms žiurkėms arba žiurkėms, kurioms į tulžies latakus įvesti vamzdeliai) (žr. 35 skirsnį). Be to, jeigu manoma, kad būtina kiekybiškai įvertinti žarnyno sekreciją, rekomenduojama atlikti šalinimo matavimus naudojant žiurkes, kurioms į tulžies latakus įvesti vamzdeliai ir kurioms duota intraveninė dozė.

▼M4

Biologinis įsisavinimas

35. Biologinis įsisavinimas gali būti nustatomas remiantis plazmos ir (arba) kraujo kinetika grupėse, kurioms dozės duotos per burną arba intraveniniu būdu, kaip aprašyta 50–52 skirsniuose, atliekant specialią bandomosios cheminės medžiagos ir (arba) susijusių metabolitų cheminę analizę, taip apsieinant be radioaktyviu izotopu žymėtųjų cheminių medžiagų. Bandomosios cheminės medžiagos arba susijusių metabolitų biologinis įsisavinimas (F) gali būti apskaičiuojamas taip:

$$F = (PPK_{band.}/PPK_{IV}) \times (Dozė_{IV}/Dozė_{band.}),$$

čia: PPK – plotas po koncentracijos plazmoje ir laiko tarpusavio priklausomybės kreive, band. – bandymo būdas (per burną, per odą arba per kvėpavimo takus).

36. Siekiant įvertinti sisteminio poveikio riziką, kai per gyvūnų tyrimus nustatyta sisteminė koncentracija lyginama su analogiškais biologinių stebėjimų duomenimis, gautais atlikus poveikio darbuotojams tyrimus, toksiškos sudedamosios dalies biologiniam įsisavinimui paprastai teikiama pirmenybė prieš procentinę sugertį. Padėtis gali tapti sudėtingesnė, jeigu dozių intervalas yra netiesinis, taigi svarbu, kad atliekant toksikokinetinius vertinimus dozės būtų nustatomos taikant tiesinį intervalą.

Pasiskirstymas audiniuose

37. Norint nustatyti tikslinius audinius, suprasti pagrindinius toksinio poveikio mechanizmus ir gauti informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos ir metabolitų kaupimąsi ir tvarumą, svarbu turėti žinių apie bandomosios cheminės medžiagos ir (arba) jos metabolitų pasiskirstymą audiniuose. Bendros (radioaktyvios) dozės procentinė dalis audiniuose ir likusioje skerdenoje turėtų būti matuojama bent jau baigus šalinimo bandymą (pvz., paprastai ne vėliau kaip per septynias dienas po dozės davimo arba anksčiau, atsižvelgiant į specifines bandomosios cheminės medžiagos savybes). Jeigu baigiant tyrimą bandomosios cheminės medžiagos audiniuose neaptinkama (pvz., bandomoji cheminė medžiaga buvo pašalinta iki tyrimo pabaigos dėl trumpo pusinės eliminacijos laiko), turėtų būti imamasi atsargumo priemonių, kad duomenys nebūti aiškinami neteisingai. Tokiu atveju pasiskirstymas audiniuose turėtų būti tiriamas esant didžiausiai bandomosios cheminės medžiagos (ir (arba) metabolitų) koncentracijai plazmoje ir (arba) kraujyje (T_{max}) arba esant didžiausiam šalinimo su šlapimu greičiui (jeigu taikytina) (žr. 38 skirsnį). Be to, norint nustatyti bandomosios cheminės medžiagos ir (arba) jos metabolitų pasiskirstymą audiniuose, įvertinti priklausomybę nuo laiko (jeigu taikytina) ir padėti nustatyti masių balansą, ir (arba) paprašius kompetentingai institucijai, gali reikėti paimti audinius ir kitais laiko momentais. Audiniai, kurie turėtų būti imami: kepenys, riebalai, virškinimo traktas, inkstai, blužnis, visas kraujas, likusi skerdena, tikslinių organų audiniai ir kiti audiniai (pvz., skydliaukė, eritrocitai, lytiniai organai, oda, akys (ypač pigmentinių gyvūnų)), kurie gali būti svarbūs vertinant bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą. Siekiant kuo geriau panaudoti gyvūnus ir tuo atveju, kai atliekant pusiau lėtinio arba lėtinio toksiškumo tyrimus pastebimas toksiškumas tiksliniams organams, turėtų būti svarstoma galimybė tais pačiais laiko momentais ištirti papildomus audinius. Be to, ataskaitoje turėtų būti nurodyta (radioaktyvi) likutinė koncentracija, audinių ir plazmos (kraujo) santykis.

38. Be to, gali reikėti (taip pat kompetentingos institucijos prašymu) įvertinti pasiskirstymą audiniuose papildomais laiko momentais, pvz., esant didžiausiai koncentracijai plazmoje ir (arba) kraujyje (pvz., T_{max}) arba esant didžiausiam šalinimo su šlapimu greičiui, nustatytiems atliekant atitinkamus plazmos ir (arba) kraujo kinetinius arba išsiskyrimo bandymus. Ši informacija gali būti naudinga norint suprasti toksiškumą ir bandomosios cheminės medžiagos ir metabolitų kaupimosi ir tvarumo galimybę. Turėtų būti pateiktas ėminių pasirinkimo pagrindimas; analizei skirti ėminiai paprastai turėtų būti tokie pat, kaip nurodyta pirmiau (žr. 37 skirsnį).

▼M4

39. Kiekybinis radioaktyvumo įvertinimas pasiskirstymo audiniuose tyrimų tikslais gali būti atliekamas taikant organų skrodimą, homogenizavimą, deginimą ir (arba) tirpinimą, o tada – surinktų likučių scintiliacijos skystyje skaičiavimus (SSS). Nustatant bandomosios cheminės medžiagos pasiskirstymą organuose ir (arba) audiniuose, gali būti naudingi tam tikri metodai, kurie dabar yra daugiau ar mažiau išplėtoti, pvz., kiekybinis viso kūno autoradiografavimas arba receptorių mikroskopinis autoradiografavimas (3) (4).

40. Jeigu dozė duodama ne per burną, gali būti imami ir analizuojami specifiniai audiniai, pvz., plaučiai, jeigu tai inhaliaciniai tyrimai, ir oda, jeigu tai poveikio per odą tyrimai. Žr. 74–78 skirsnius.

Metabolizmas

41. Siekiant nustatyti ir kiekybiškai įvertinti nepakitusią bandomąją cheminę medžiagą ir metabolitus, turėtų būti renkamos išskyros (ir, jeigu reikia, plazma), kaip aprašyta 44–49 skirsniuose. Kad būti lengviau nustatyti metabolitus tam tikro dydžio dozei skirtoje grupėje, gali būti kartu sudedamos atskirai paimtos išskyros. Rekomenduojama apibūdinti kiekvieno laikotarpio metabolitus. Tačiau, jeigu dėl ėminio ir (arba) radioaktyvumo nebuvimo to padaryti negalima, galima kartu sudėti skirtingais laikotarpiais paimtą šlapimą ir išmatas, tačiau negalima kartu sudėti skirtingų lyčių gyvūnų išskyrų arba skirtingas dozes gavusių gyvūnų išskyrų. Apibūdinant dozę gavusių gyvūnų šlapimą, išmatas, pasibaigusį radioaktyvumą ir, jeigu taikytina, tulžį, turėtų būti taikomi atitinkami kokybiniai ir kiekybiniai metodai.

42. Turėtų būti imamasi pagrįstų priemonių, kad būtų nustatyti visi metabolitai, kurių kiekis sudaro 5 % arba daugiau duodamos dozės, ir parengti bandomosios cheminės medžiagos apykaitos schemą. Turėtų būti nustatytos bandomosios cheminės medžiagos, kurių nustatytasis kiekis išskyrose sudaro 5 % arba daugiau duotos dozės. Nustatant šias chemines medžiagas turėtų būti tiksliai nustatyta jų struktūra. Paprastai nustatymas atliekamas metabolito kochromatografijos būdu, taikant žinomus standartus ir dvi nepanašias sistemas arba metodus, kuriais galima tiesiogiai nustatyti struktūrą, pvz., masių spektrometrijos, branduolinio magnetinio rezonanso (BMR) ir t. t. Jeigu taikoma kochromatografija, chromatografijos metodų, pagal kuriuos, taikant dvi skirtingas tirpiklių sistemas, naudojama ta pati pastovi fazė, taikymas nėra laikomas tinkama dvimetode metabolitų nustatymo patikra, nes šie metodai nėra nepriklausomi. Nustatymas kochromatografijos būdu turėtų būti atliekamas naudojant dvi nepanašias, analitiškai nepriklausomas sistemas, pvz., atvirkštinės ir įprastos fazių plono sluoksnio chromatografiją (PSC) ir didelio slėgio skysčių chromatografiją (DSSC). Jeigu chromatografinis atskyrimas yra tinkamos kokybės, papildomas patvirtinimas spektroskopinėmis priemonėmis nebūtinas. Vienareikšmis nustatymas taip pat gali būti užtikrinamas taikant metodus, kuriais gaunama informacijos apie struktūrą, pvz., skysčių chromatografijos ir masių spektrometrijos (SC-MS) arba skysčių chromatografijos ir dvigubos masių spektrometrijos (SC-MS/MS), dujų chromatografijos ir masių spektrometrijos (DC-MS) ir BMR spektrometrijos.

43. Jeigu metabolitų, kurių kiekis duotoje dozėje sudaro 5 % arba daugiau, nustatyti neįmanoma, galutinėje ataskaitoje turėtų būti pateiktas pagrindimas ir (arba) paaiškinimas. Bandomosios cheminės medžiagos keliamų pavojų ir (arba) rizikos vertinimo tikslais siekiant geriau suprasti metabolinį kelią, gali būti naudinga nustatyti metabolitus, kurių kiekis duotoje dozėje yra mažesnis kaip 5 %. Jeigu įmanoma, turėtų būti pateikta informacija apie struktūrą. Šiuo tikslu gali būti apibūdinama plazma, kraujas arba kiti audiniai.

▼M4

Šalinimas

44. Duotos dozės šalinimo greitis ir laipsnis turėtų būti nustatomi matuojant iš šlapimo, išmatų ir iškvėpto oro regeneruotos (radioaktyvios) dozės procentinę dalį. Šie duomenys taip pat bus naudingi nustatant masių balansą. Tinkamais laiko intervalais turėtų būti nustatyti iš šlapimo, išmatų ir iškvėpto oro pašalintos bandomosios cheminės medžiagos (radioaktyvių izotopų) kiekiai (žr. 47–49 skirsnius). Kartotinės dozės bandymai turėtų būti tinkamai suplanuoti, kad būtų galima surinkti šalinimo duomenis ir pasiekti 26 skirsnyje aprašytus tikslus. Tai leis palyginti vienos dozės bandymus.

45. Jeigu bandomasis tyrimas parodė, kad su išvepiamu oru pašalinama nedaug bandomosios cheminės medžiagos (radioaktyvių izotopų) (kaip nurodyta 49 skirsnyje), per galutinį tyrimą iškvepiamo oro rinkti nereikia.

46. Kiekvienas gyvūnas turėtų būti įkeliamas į atskirą metabolizmo (šlapimo, išmatų ir iškvepiamo oro) kamerą, skirtą surinkti išskyras. Kiekvieno rinkimo laikotarpio (žr. 47–49 skirsnius) pabaigoje metabolizmo kameros turėtų būti išplautos tinkamu tirpikliu (vadinamuoju „narvų plovikliu“), kad būtų užtikrintas kuo didesnis bandomosios cheminės medžiagos (radioaktyvių izotopų) regeneravimas. Išskyrų rinkimas turėtų būti baigtas per septynias dienas arba regeneravus ne mažiau kaip 90 % duotos dozės (žiūrint, kas pirmiau įvyksta).

47. Bendri bandomosios cheminės medžiagos (radioaktyvių izotopų) kiekiai šlapime turėtų būti nustatomi ne mažiau kaip dviem laiko momentais pirmąją rinkimo dieną (vienas iš šių laiko momentų turėtų būti 24 valandos po dozės davimo), o vėliau – kasdien iki tyrimo pabaigos. Siūloma pirmąją dieną pasirinkti daugiau kaip du ėminių ėmimo laiko momentus (pvz., po 6, 12 ir 24 val.). Siekiant gauti informacijos apie alternatyvius arba papildomus rinkimo laiko momentus, turėtų būti išanalizuoti bandomųjų tyrimų rezultatai. Turėtų būti pateiktas rinkimo tvarkaraščių pagrindimas.

48. Bendri bandomosios cheminės medžiagos (radioaktyvių izotopų) kiekiai išmatose turėtų būti nustatomi kasdien, pradedant po 24 valandų nuo dozės davimo, iki tyrimo pabaigos, išskyrus atvejus, kai bandomieji tyrimai rodo, kad turėtų būti taikomi alternatyvūs arba papildomi rinkimo laiko momentai. Turėtų būti pateiktas alternatyvių rinkimo tvarkaraščių pagrindimas.

49. Iškvėpto CO_2 ir kitų lakių medžiagų rinkimas per konkretų tyrimą gali būti nutraukiamas, jeigu 24 valandų rinkimo laikotarpiu iškvėptame ore aptinkama mažiau kaip 1 % duotos dozės.

Laiko tyrimai

Plazmos ir (arba) kraujo kinetika

50. Šių tyrimų tikslas – gauti bandomosios cheminės medžiagos pagrindinių toksikokinetinių parametrų [pvz., C_{max}, T_{max}, pusinės eliminacijos laiko ($t_{1/2}$), PPK] įverčius. Šie tyrimai gali būti atliekami duodant vieną dozę, bet labiau tikėtina, kad reikės duoti dvi arba daugiau dozių. Dozės turėtų būti nustatomos atsižvelgiant į bandymo pobūdį ir (arba) nagrinėjamą klausimą. Nagrinėjant tokius klausimus kaip bandomosios cheminės medžiagos biologinis įsisavinimas ir (arba) siekiant išsiaiškinti dozės poveikį išsivalymui (pvz., išsiaiškinti, ar išsivalymo proceso įsotinimas priklauso nuo dozės), gali reikėti kinetinių duomenų.

51. Atliekant šiuos tyrimus, vieno dydžio dozei skirtoje grupėje turėtų būti ne mažiau kaip po keturis vienos lyties gyvūnus. Naudojamų gyvūnų lyties pasirinkimas turėtų būti pagrįstas. Jeigu yra įrodymų, kad toksiškumas skirtingų lyčių gyvūnams gerokai skiriasi, turėtų būti svarstoma galimybė naudoti abiejų lyčių gyvūnus (po keturis patinus ir keturias pateles).

▼M4

52. Davus bandomosios cheminės medžiagos (žymėtos radioaktyviu izotopu) dozę, iš kiekvieno gyvūno tinkamais laiko momentais, taikant tinkamą ėminių ėmimo metodiką, turėtų būti paimti kraujo ėminiai. Kraujo ėminių tūris ir kiekis, kuriuos galima gauti iš vieno gyvūno, gali būti ribojamas galimų kartotinio ėminių ėmimo poveikio gyvūno sveikatai ir (arba) fiziologijai ir (arba) analizės metodo jautrumui. Turėtų būti išanalizuoti kiekvieno gyvūno ėminiai. Tam tikromis aplinkybėmis (pvz., apibūdinant metabolitus) gali reikėti sudėti daugiau nei iš vieno gyvūno paimtus ėminius. Sudėtiniai ėminiai turėtų būti aiškiai identifikuojami, turėtų būti pateiktas ėminio sudėjimo pagrindimas. Jeigu naudojama radioaktyviu izotopu žymėtoji bandomoji cheminė medžiaga, gali reikėti atlikti bendrojo radioaktyvumo analizę. Jeigu tokia analizė atliekama, bendrasis radioaktyvumas turėtų būti analizuojamas visame kraujyje arba plazmoje ir raudonuosiuose kraujo kūneliuose, kad būtų galima apskaičiuoti kraujo kūnelių ir plazmos santykį. Kitais atvejais gali reikėti atlikti konkretesnius tyrimus, kuriems būtina nustatyti pirminį junginį ir (arba) metabolitus arba įvertinti jungimąsi su baltymais.

Kinetika kituose audiniuose

53. Šių tyrimų tikslas – gauti informacijos apie laiką, suteikiančios galimybę nagrinėti klausimus, susijusius su tokiais aspektais kaip toksinio veikimo būdas, biologinis įsisavinimas ir biologinis tvarumas, kurie įvertinami nustatant cheminės medžiagos lygius įvairiuose audiniuose. Audiniai ir laiko momentų skaičius parenkami atsižvelgiant į nagrinėtiną klausimą ir bandomosios cheminės medžiagos toksikologinę duomenų bazę. Rengiant šių papildomų kinetikos audiniuose tyrimų planą turėtų būti atsižvelgiama į informaciją, surinktą taip, kaip aprašyta 37–40 skirsniuose. Per šiuos tyrimus gali būti duodama viena dozė arba duodamos kartotinės dozės. Turėtų būti pateiktas taikomo metodo pagrindimas.

54. Kinetikos kituose audiniuose tyrimų motyvai gali būti tokie:

— pailgėjusio pusinės eliminacijos iš kraujo laiko įrodymai, rodantys galimą bandomosios cheminės medžiagos kaupimąsi įvairiuose audiniuose, arba

— noras išsiaiškinti, ar konkrečiuose audiniuose pasiekiamas pastovus lygis (pvz., per kartotinės dozės tyrimus, net jeigu galėjo būti akivaizdžiai pasiektas pastovus bandomosios cheminės medžiagos lygis kraujyje, gali kilti poreikis įsitikinti, ar pastovus lygis pasiektas ir tiksliniuose audiniuose).

55. Atliekant tokius laiko tyrimus, pagal kiekvieną dozės dydį ir laiko momentą ne mažiau kaip keturiems gyvūnams turėtų būti duodama tinkama oralinė bandomosios cheminės medžiagos dozė ir stebimas pasiskirstymo pasirinktuose audiniuose laikas. Jeigu nepastebima specifinio poveikio kurios nors lyties gyvūnams, gali būti naudojami tik vienos lyties gyvūnai. Ar analizuoti bendrąjį radioaktyvumą arba pirminę cheminę medžiagą ir (arba) metabolitus, priklauso ir nuo nagrinėjamo audinio. Pasiskirstymo audiniuose vertinimas turėtų būti atliekamas taikant tinkamus metodus.

Fermentų sužadinimas ir (arba) slopinimas

56. Tyrimai, kuriais nagrinėjamas galimas poveikis fermentų sužadinimui ir (arba) slopinimui arba tiriamos bandomosios cheminės medžiagos biologinei transformacijai, gali būti reikalingi vienu arba daugiau iš šių atvejų:

1. kai turimi įrodymai rodo, kad esama priklausomybės tarp bandomosios cheminės medžiagos biologinės transformacijos ir padidėjusio toksiškumo;

2. kai turimi toksiškumo duomenys rodo netiesinę dozės ir metabolizmo tarpusavio priklausomybę;

▼M4

3. kai metabolitų nustatymo tyrimų rezultatai rodo, kad nustatytas galbūt toksiškas metabolitas, kuris galėjo susidaryti dėl bandomosios cheminės medžiagos sužadinto fermentų veikimo;

4. aiškinantis poveikį, kuris tariamai susijęs su fermentų sužadinimo reiškiniu;

5. jeigu per bandymus *in vitro* arba *in vivo*, naudojant skirtingų rūšių gyvūnus arba taikant skirtingas sąlygas pastebima toksikologiniu požiūriu svarbių bandomosios cheminės medžiagos metabolinių savybių pokyčių, gali reikėti apibūdinti susijusius fermentus (pvz., I fazės fermentus, pvz., nuo citochromo P450 priklausomos monooksigenazės sistemos izofermentus, II fazės fermentus, pvz., sulfotransferazės arba uridindifosfato gliukuronoziltransferazės izofermentus, arba kitus susijusius fermentus). Ši informacija gali būti naudojama siekiant įvertinti tarprūšinio ekstrapoliavimo tinkamumą.

57. Vertinant su bandomąja chemine medžiaga susijusius toksikokinetinius pokyčius, turėtų būti taikomi atitinkami tyrimų protokolai, kurie turėtų būti tinkamai patvirtinti ir pagrįsti. Pavyzdinių tyrimo planų sandara: kartotinės radioaktyviu izotopu nežymėtos bandomosios cheminės medžiagos dozės davimas ir vienos radioaktyviu izotopu žymėtosios dozės davimas keturioliktą dieną arba kartotinės radioaktyviu izotopu žymėtosios bandomosios cheminės medžiagos dozės davimas ir ėminių ėmimas pirmą, septintą ir keturioliktą dieną, siekiant nustatyti metabolitų pobūdį. Duodant kartotinę radioaktyviu izotopu žymėtosios bandomosios cheminės medžiagos dozę taip pat galima gauti informacijos apie bioakumuliaciją (žr. 26 skirsnį).

PAPILDOMI METODAI

58. Be dėstant šį bandymo metodą aprašytų bandymų *in vivo*, gali būti taikomi papildomi metodai, kuriais gali būti gauta naudingos informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos sugertį, pasiskirstymą, metabolizmą arba šalinimą tam tikrų rūšių gyvūnų organizmuose.

Tyrimų *in vitro* informacijos naudojimas

59. Atliekant tyrimus *in vitro* ir taikant atitinkamas bandymų sistemas, gali būti išnagrinėta keletas su bandomosios cheminės medžiagos metabolizmu susijusių klausimų. Galimiems metabolitams tirti gali būti naudojami ką tik atskirti arba išauginti kepenų hepatocitai ir ląstelinės frakcijos (pvz., mikrosomos ir citozolis arba S9 frakcijos). Rizikos vertinimo tikslais gali būti svarbu turėti žinių apie vietinį metabolizmą tiksliniame organe, pvz., plaučiuose. Šiais tikslais gali būti naudingos tikslinių audinių mikrosomų frakcijos. Mikrosomų tyrimai gali būti naudingi nagrinėjant galimus lyčių ir gyvenimo etapų skirtumus ir apibūdinant fermentų parametrus (K_m ir V_{max}), kurie gali padėti įvertinti metabolizmo priklausomybę nuo dozės atsižvelgiant į poveikio lygius. Be to, mikrosomos gali būti naudingos siekiant nustatyti specifinius fermentus, dalyvaujančius bandomosios cheminės medžiagos metabolizmo procesuose; tai gali būti svarbu tarprūšiniam ekstrapoliavimui (taip pat žr. 56 skirsnį). Taip pat gali būti tiriama biologinės transformacijos sužadinimo galimybė, naudojant dominančios bandomosios cheminės medžiagos dozę gavusių gyvūnų kepenų ląstelines frakcijas (pvz., mikrosomas ir citozolį), atliekant hepatocitų sužadinimo tyrimus *in vitro* arba remiantis specifinėmis ląstelių linijomis, išskiriančiomis reikiamus fermentus. Tam tikromis aplinkybėmis ir tinkamomis sąlygomis gali būt svarstoma galimybė nustatant galimus gyvūnų rūšių skirtumus biologinės transformacijos požiūriu naudoti žmogaus audinių ląstelines frakcijas. Tyrimų *in vitro* rezultatai taip pat gali būti naudingi kuriant FPTK modelius (5).

▼M4

60. Sugerties per odą tyrimais *in vitro* galima gauti papildomos informacijos, kuria remiantis būtų galima apibūdinti sugertį (6).

61. Iš kepenų ląstelių paimtos pirminių ląstelių kultūros ir ką tik paimtos audinių dalys gali būti naudojamos nagrinėjant panašius klausimus kaip ir kepenų mikrosomų atveju. Tam tikrais atvejais atsakyti į specifinius klausimus gali būti įmanoma naudojant ląstelių linijas, dėl kurių nustatytas atitinkamo fermento išskyrimas, arba inžinerijos būdu gautas ląstelių linijas. Kartais gali būti naudinga ištirti specifinių citochromo P450 izosomų (pvz., CYP1A1, 2E1, 1A2 ir kitų) ir (arba) II fazės fermentų slopinimą ir sužadinimą naudojant pirminį junginį ir atliekant tyrimus *in vitro*. Gauta informacija gali būti naudinga panašios struktūros junginiams.

Per toksiškumo tyrimus gautų toksikokinetinių duomenų, kaip papildomos informacijos, naudojimas

62. Kraujo, audinių ir (arba) išskyrų ėminiai, gauti atliekant kitus toksiškumo tyrimus, gali suteikti duomenų apie biologinį įsisavinimą, plazmos koncentracijos kaitą per tam tikrą laiką (PPK, C_{max}), bioakumuliacijos galimybę, išsivalymo greičius ir su lytimi bei gyvenimo etapu susijusius metabolizmo ir kinetikos pokyčius.

63. Sudarant tyrimo planą, gali būti siekiama atsakyti į klausimus, susijusius su: sugerties įsotinimu, biologinės transformacijos arba šalinimo keliais esant didesnėms dozėms, naujų metabolinių kelių veikimu esant didesnėms dozėms ir toksinių metabolitų ribojimu taikant tik didesnes dozes.

64. Kiti pavojų vertinimo aspektai gali būti susiję su tokiais klausimais:

— jautrumu pagal amžių, atsižvelgiant į hematoencefalinio barjero, kepenų būklės ir (arba) detoksifikacijos galimybių skirtumus,

— pogrupių jautrumu, atsižvelgiant į biologinės transformacijos galimybių arba kitokius toksikokinetinius skirtumus,

— poveikio dydžiu vaisiui, kai tas poveikis daromas cheminėms medžiagoms prasiskverbiant per placentą arba žindant naujagimį.

Toksikokinetinio modeliavimo taikymas

65. Toksikokinetiniai modeliai gali būti naudingi įvairiais pavojų ir rizikos vertinimo aspektais, pvz., prognozuojant sisteminį poveikį ir dozę vidaus audiniams. Be to, galima išnagrinėti specifinius veikimo būdo klausimus; šie modeliai gali būti tarprūšinio ekstrapoliavimo, poveikio būdų, dozės davimo būdų ir žmogui gresiančios rizikos vertinimo pagrindas. Duomenys, naudingi kuriant bandomajai cheminei medžiagai skirtus FPTK modelius, kai naudojamos bet kokios gyvūnų rūšys: 1) pasiskirstymo koeficientai, 2) biocheminės konstantos ir fiziologiniai parametrai, 3) su konkrečiu poveikio būdu susiję sugerties parametrai ir 4) tyrimų *in vivo* kinetiniai duomenys, skirti vertinti modelius [pvz., išsivalymo parametrai, skirti tam tikriems (> 10 %) šalinimo būdams, su metabolizmu susiję K_m ir V_{max}]. Kuriant modelius naudojami bandymų duomenys turėtų būti rengiami taikant moksliškai patikimus metodus, o modelių rezultatai turėtų būti patvirtinami. Siekiant palengvinti nekategorizuotų arba fiziologija pagrįstų modelių kūrimą, dažnai nustatomi su tam tikra bandomąja chemine medžiaga ir gyvūnų rūšimi susiję parametrai, pvz., sugerties greičiai, pasiskirstymo kraujyje ir audinyje rodikliai ir metabolizmo konstantos (7).

▼M4

DUOMENYS IR ATASKAITOS

66. Rekomenduojama tyrimo ataskaitoje nurodyti turinį.

Pagrindinė ataskaitos dalis

67. Ataskaitos pagrindinėje dalyje turėtų būti pateikta aprašant šį bandymo metodą nurodyta informacija, sugrupuota į toliau nurodytus skyrius ir skirsnius.

Santrauka

68. Šiame tyrimo ataskaitos skyriuje turėtų būti pateikta tyrimo plano santrauka ir taikytų metodų aprašas. Jame turėtų būti aiškiai pateikti pagrindiniai gauti rezultatai, susiję su masių balansu, metabolitų pobūdžiu ir gausa, likučiais audiniuose, išsivalymo greičiu, bioakumuliacijos galimybe, lyčių skirtumais ir t. t. Santrauka turėtų būti pakankamai išsami, kad ja remiantis būtų galima įvertinti gautus rezultatus.

Įvadas

69. Šiame tyrimo ataskaitos skyriuje turėtų būti nurodyti tyrimo tikslai, loginis pagrindas ir planas, tai pat atitinkamos nuorodos ir susijusi istorinė informacija.

Medžiagos ir metodai

70. Šiame ataskaitos skyriuje turėtų būti pateikti išsamūs visos susijusios informacijos aprašai, kuriais apibūdinama:

a) Bandomoji cheminė medžiaga

Šiame poskyryje turėtų būti nuodytas bandomosios cheminės medžiagos tapatumas: cheminės medžiagos pavadinimas, molekulinė struktūra, kokybinis ir kiekybinis jos cheminės sudėties įvertinimas, cheminis grynumas ir, jeigu įmanoma, priemaišų tipas ir kiekiai. Be to, šiame poskyryje turėtų būti pateikta informacija apie fizines ir chemines savybes, nurodant fizinę būseną, spalvą, bendrąjį tirpumo ir (arba) pasiskirstymo koeficientą, stabilumą, jeigu taikytina, ėsdinamąsias savybes. Jeigu taikytina, turėtų būti pateikta informacija apie izomerus. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga žymėta radioaktyviu izotopu, šiame poskyryje turėtų būti pateikta tokia informacija: radionuklido tipas, žymės vieta, savitasis aktyvumas ir radiocheminis grynumas.

Turėtų būti nurodyti nešiklių, skiediklių, suspensijos terpių ir emulsiklių arba kitų duodant bandomosios cheminės medžiagos dozes naudojamų medžiagų tipai arba pateikti šių medžiagų aprašai.

b) Bandomieji gyvūnai

Šiame poskyryje turėtų būti pateikta informacija apie bandomuosius gyvūnus, nurodant pasirinktą gyvūnų rūšį, padermę ir amžių pradedant tyrimą ir tokio pasirinkimo pagrindą, taip pat kūno masę, sveikatos būklę ir gyvūnų laikymo sąlygas.

c) Metodai

Šiame poskyryje turėtų būti pateikta išsami informacija apie tyrimo planą ir taikytą metodiką. Jame turėtų būti aprašyta:

1. padarytų poveikio būdo ir poveikio sąlygų pakeitimų pagrindimas, jeigu taikytina;

▼M4

2. dozių dydžių parinkimo pagrindimas;

3. planuojant tolesnius bandymais pagrįstus tyrimus naudoti bandomieji tyrimai, jeigu taikytina. Turėtų būti pateikti pamatiniai bandomųjų tyrimų duomenys;

4. kaip buvo paruoštas dozės tirpalas ir koks buvo naudojamas (jeigu buvo) tirpiklis arba nešiklis;

5. dozę gaunančių grupių skaičius ir gyvūnų skaičius grupėje;

6. dozių dydžiai ir tūris (ir, jeigu naudoti radioaktyvūs izotopai, savitasis dozės aktyvumas);

7. dozės davimo būdas (-ai) ir metodai;

8. dozių davimo dažnumas;

9. nešėrimo laikotarpis (jeigu taikytas);

10. bendras vienam gyvūnui tenkantis radioaktyvumas;

11. gyvūnų laikymas;

12. ėminių ėmimas ir tvarkymas;

13. taikyti analitiniai metabolitų išskyrimo, kiekybinio įvertinimo ir jų tapatumo nustatymo metodai;

14. taikytų metodų aptikimo riba;

15. kiti taikyti eksperimentiniai matavimai ir procedūros (įskaitant metodų tinkamumo metabolitų analizei patvirtinimą).

d) Statistinė analizė

Jeigu atliekama tyrimo rezultatų statistinė analizė, turėtų būti pateikta pakankamai informacijos apie analizės metodą ir kompiuterinę programą, kad nepriklausomas ekspertas arba statistikos specialistas galėtų iš naujo įvertinti bei atkurti analizės eigą.

Jeigu taikomos modeliavimo tyrimų sistemos, pvz., FPTK, aprašant modelius turėtų būti pateiktas išsamus modelio aprašas, kad būtų galima atlikti nepriklausomą modelio atkūrimą ir patvirtinimą (žr. 65 skirsnį ir priedėlį „Apibrėžtys“).

Rezultatai

71. Visi duomenys turėtų būti apibendrinti lentelėse, pateikiant atitinkamą statistinį įvertinimą, kaip aprašyta šio skyriaus tekste. Radioaktyvumo skaičiavimų duomenys turėtų būti apibendrinti ir pateikti atsižvelgiant į tyrimą, paprastai – mikrogramais arba miligramais, tenkančiais ėminio masei, tačiau gali būti naudojami ir kiti matavimo vienetai. Šiame skyriuje turėtų būti pateiktos grafinės rezultatų iliustracijos, tipinių chromatografijos ir spektrometrijos duomenų kopijos, metabolitų identifikavimo ir (arba) kiekybinio įvertinimo duomenys ir numanomi metaboliniai keliai, nurodant metabolitų molekulinę struktūrą. Be to, jeigu taikytina, šiame skyriuje turėtų būti pateikta tokia informacija:

1. iš šlapimo, išmatų, iškvėpto oro ir narvelyje buvusio šlapimo ir išmatų paplavų regeneruotas radioaktyvių izotopų kiekis ir procentinė jų dalis:

— jeigu atliekant tyrimus dozė duodama per odą, taip pat turėtų būti pateikti duomenys apie bandomosios cheminės medžiagos regeneravimą iš paveiktos odos, odos nuoplovų ir apie liekamąjį radioaktyvumą odą gaubiančioje aparatūroje ir metabolizmo kameroje, taip pat odos plovimo tyrimo rezultatus. Išsamesnis aptarimas pateiktas 74–77 skirsniuose,

▼M4

— jeigu tai inhaliaciniai tyrimai, taip pat turėtų būti pateikti duomenys apie bandomosios cheminės medžiagos regeneravimą iš plaučių ir nosies audinių (8). Išsamesnis aptarimas pateiktas 78 skirsnyje;

2. Pasiskirstymas audiniuose, nurodomas procentine duotos dozės dalimi ir koncentracija (mikrogramais, tenkančiais audinio gramui) ir pateikiant audinių ir kraujo kūnelių arba audinių ir plazmos santykius;

3. medžiagų balansas, sudarytas pagal kiekvieną tyrimą, pateikiant kūno audinių ir išskyrų aprašus;

4. koncentracijos plazmoje ir su plazma susiję toksikokinetiniai parametrai (biologinis įsisavinimas, PPK, C_{max}, T_{max}, išsivalymas, pusinės eliminacijos laikas), nustatyti atitinkamu (-ais) būdu (-ais) davus dozę;

5. bandomosios cheminės medžiagos sugerties greitis ir laipsnis, nustatyti atitinkamu (-ais) būdu (-ais) davus dozę;

6. iš išskyrų surinkti bandomosios cheminės medžiagos ir metabolitų kiekiai (nurodomi kaip duotos dozės procentinė dalis);

7. nuoroda į papildomų duomenų šaltinius, kuriuose gali būti atskirų gyvūnų duomenų apie visas matuojamas pasekmes (pvz., dozės davimo būdas, procentinis regeneravimas, toksikokinetiniai parametrai ir t. t.);

8. diagrama su siūlomais metabolizmo būdais ir metabolitų molekulinėmis struktūromis.

Aptarimas ir išvados

72. Šiame skyriuje autorius (-iai) turėtų:

1. pateikti siūlomą metabolizmo būdą, pagrįstą bandomosios cheminės medžiagos metabolizmo ir perdavimo rezultatais;

2. aptarti galimas gyvūnų rūšių ir lyčių skirtumus, susijusius su bandomosios cheminės medžiagos perdavimu ir (arba) biologine transformacija;

3. pateikti lentelėse ir aptarti metabolitų tapatumą ir kiekį, išsivalymo greičius, bioakumuliacijos galimybę ir pirminės cheminės medžiagos ir (arba) metabolito (-ų) likučių audiniuose kiekį, taip pat, jeigu taikytina, galimus nuo dozės priklausomus toksikokinetinių parametrų pokyčius;

4. įtraukti į šį skyrių susijusius toksikokinetinius duomenis, gautus atliekant toksiškumo tyrimus;

5. pateikti tikslią išvadą, kurią galima pagrįsti tyrimo rezultatais;

6. įtraukti daugiau skyrių (jeigu reikia arba jeigu taikytina).

73. Norint pateikti pagalbinės bibliografinės informacijos, lentelių, diagramų, priedų ir t. t., turėtų būti įtraukiami papildomi skyriai.

▼M4

ALTERNATYVŪS POVEIKIO BŪDAI

Poveikis per odą

Dozės davimas per odą

74. Šiame skirsnyje pateikiama specifinės informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos toksikokinetines savybes, kai dozė duodama per odą. Nagrinėjant sugertį per odą reikėtų remtis šio priedo B.44 skyriumi [„Sugertis per odą. *In vivo* metodas“ (9)]. Nagrinėjant kitas pasekmes, pvz., pasiskirstymą ir metabolizmą, gali būti taikomas šis – B.36 – bandymo metodas. Dozę duodant per odą, gali būti duodama vieno arba daugiau dydžių bandomosios cheminės medžiagos dozės. Bandomoji cheminė medžiaga (pvz., neskiesta, skiesta arba preparuota medžiaga, kurios sudėtyje yra cheminės medžiagos, kuria daromas poveikis per odą) turėtų būti tokia pat, kuri gali turėti poveikio žmonėms arba kitoms galimoms tikslinėms gyvūnų rūšims (arba gali būti naudojamas realus tokios medžiagos pakaitalas). Dozės (-ių) dydis (-žiai) turėtų būti parenkami pagal šio bandymo metodo 20–26 skirsnius. Parenkant per odą duodamą dozę galima atsižvelgti į tokius veiksnius kaip numatomas poveikis žmogui ir (arba) dozės, kurias taikant buvo pastebėtas toksiškumas per kitus toksinio poveikio per odą tyrimus. Per odą duodamos dozės prireikus turėtų būti ištirpinamos tinkamame nešiklyje ir duodamos parenkant tokį tūrį, kurio pakaktų duoti dozę. Prieš pat bandymą nuo bandomųjų gyvūnų kūno sprando srityje nukerpamas kailis. Galima ir skusti, bet tai turėtų būti atliekama apytikriai prieš 24 valandas iki bandymo. Jeigu kailis kerpamas arba skutamas, reikėtų stengtis nenutrinti odos, nes dėl to gali pasikeisti jos pralaidumas. Bandomajai cheminei medžiagai uždėti turėtų būti nukerpama arba nuskutama apie 10 % kūno paviršiaus Jeigu cheminės medžiagos labai toksiškos, padengiamas paviršiaus plotas gali būti mažesnis nei apytikriai 10 %, bet kaip galima didesnis plotas turėtų būti padengiamas plonu vienodu sluoksniu. Toks pat paviršiaus ploto apdorojimas turėtų būti taikomas visoms bandymų per odą grupėms. Vietos, per kurias duodama dozė, turėtų būti apsaugotos tinkama gerai pritvirtinta danga. Gyvūnai turėtų būti laikomi atskirai.

75. Turėtų būti atliktas odos plovimo tyrimas, skirtas įvertinti duotos bandomosios cheminės medžiagos dozės dydį, kuris gali būti pašalinamas nuo odos plaunant paveiktą odą švelniu muilu ir vandeniu. Šis tyrimas taip pat gali padėti nustatyti masių balansą, kai bandomoji cheminė medžiaga duodama per odą. Atliekant šį odos plovimo tyrimą, dviem gyvūnams turėtų būti duodama viena bandomosios cheminės medžiagos dozė. Dozės dydis turėtų būti parenkamas pagal šio bandymo metodo 23 skirsnį (taip pat žr. 76 skirsnį, kuriame aptariama sąlyčio su oda trukmė). Turėtų būti nustatyti plaunant regeneruojami bandomosios cheminės medžiagos kiekiai, kad būtų galima įvertinti bandomosios cheminės medžiagos pašalinimo plaunant veiksmingumą.

76. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga nėra pernelyg ėsdinanti, ji turėtų būti dedama ir laikoma ant odos ne trumpiau kaip šešias valandas. Pašalinant dangą, paveikta sritis turėtų būti nuplaunama pagal odos plovimo procedūrą (žr. 75 skirsnį). Turėtų būti ištirtas ant dangos ir paplavose likęs bandomosios cheminės medžiagos kiekis. Baigiant tyrimus, kiekvienas gyvūnas turėtų būti humaniškai numarintas pagal antrąjį (2) literatūros šaltinį, o paveikta oda turėtų būti nudirta. Turėtų būti ištirtas atitinkamoje paveiktos odos dalyje likęs bandomosios cheminės medžiagos (radioaktyvių izotopų) kiekis.

77. Vertinant vaistų toksikokinetines savybes, atsižvelgiant į atitinkamą reglamentavimo sistemą gali reikėti taikyti kitokias procedūras.

▼M4

Inhaliacinis poveikis

78. Turėtų būti taikoma viena bandomosios cheminės medžiagos koncentracija (arba, jeigu reikia, daugiau). Koncentracija (-os) turėtų būti parenkamos pagal šio bandymo metodo 20–26 skirsnius. Inhaliacinis poveikis turėtų būti daromas naudojant nosies arba snukio gaubtus, kad būtų išvengta sugerties kitais poveikio būdais (8). Jeigu taikomos kitokios inhaliacinio poveikio procedūros, pakeitimai turėtų būti pagrįsti dokumentais. Turėtų būti nustatyta inhaliacinio poveikio trukmė; įprasta poveikio trukmė – 4–6 val.

LITERATŪRA

1. OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the SAFEty of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.

2. OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in SAFEty Evaluation; Environmental Health and SAFEty Publications, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.

3. Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73–81.

4. Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25–40.

5. Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400–411.

6. Šio priedo B.45 skyrius. Sugertis per odą. In vitro metodas.

7. IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical SAFEty.

8. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9. Šio priedo B.44 skyrius. Sugertis per odą. In vivo metodas.

10. Barton HA, et al. (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical SAFEty Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.

11. Gibaldi M and Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Priedėlis

APIBRĖŽTYS

Sugertis – cheminės medžiagos sugėrimas į audinius arba perdavimas iš vieno audinio į kitą. Sugertis siejama su pirminiu junginiu ir visais jo metabolitais. Nereikėtų painioti su biologiniu įsisavinimu.

Kaupimasis (bioakumuliacija) – bandomosios cheminės medžiagos kiekio audiniuose (paprastai – riebaliniuose audiniuose, davus kartotinę dozę) didėjimas laikui bėgant; jeigu bandomosios cheminės medžiagos patekimo į kūną greitis didesnis už tos medžiagos šalinimo greitį, bandomoji cheminė medžiaga kaupiasi organizme ir gali susidaryti toksiškos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos.

SPMŠ – sugerties, pasiskirstymo, metabolizmo ir šalinimo santrumpa.

PPK (plotas po plazmos koncentracijos ir laiko tarpusavio priklausomybės kreive) – plotas po kreive, susidarantis bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ir laiko tarpusavio priklausomybės grafike. Jis parodo bendrą per iš anksto nustatytą laikotarpį kūno absorbuotą bandomosios cheminės medžiagos kiekį. Jeigu priklausomybė tiesinė, PPK (nuo nulinio laiko momento iki begalybės) yra proporcingas bendram kūno sugertam bandomosios cheminės medžiagos kiekiui, nepaisant sugerties greičio.

Autoradiografija (viso kūno autoradiografija) – metodika, skirta kokybiškai ir (arba) kiekybiškai įvertinti radioaktyvios bandomosios cheminės medžiagos buvimą audiniuose, naudojant rentgeno juostą arba modernesnę skaitmeninę fosforografiją, skirtą atvaizduoti radioaktyviu izotopu žymėtąsias molekules arba molekulių fragmentus registruojant tiriamo objekto spinduliuojamą radiaciją. Kiekybinė viso kūno autoradiografija, palyginti su organų skrodimu, gali būti naudingesnė vertinant bandomosios cheminės medžiagos pasiskirstymą ir bendrąjį radioaktyvios medžiagos regeneravimą bei išskyrimą audiniuose. Pvz., šis metodas naudingesnis tuo, kad jį galima taikyti kaip pavyzdį naudojant pigmentinį gyvūną, siekiant įvertinti galimą bandomosios cheminės medžiagos jungimąsi su melaninu, galinčiu surišti tam tikras molekules. Tačiau, nors šiuo metu galima gauti tinkamas viso kūno didelio masto mažo giminiškumo jungimosi vietų apžvalgas, jo geba atpažinti specifines tikslines vietas, pvz., jungimosi prie receptorių vietas, kurioms aptikti būtina gana didelė raiška ir didelis jautris, yra ribota. Taikant autoradiografiją, duodamo junginio masių balanso nustatymo bandymai turėtų būti atliekami kaip atskira bandymų grupė arba kaip atskiras tyrimas nei pasiskirstymo audiniuose bandymas; visos išskyros (taip pat galbūt įskaitant iškvėptą orą) ir visos skerdenos homogenizuojamos ir apibūdinamos atliekant scintiliacijos skystyje skaičiavimus.

Šalinimas su tulžimi – šalinimas per tulžies latakus.

Bioakumuliacija – žr. „Kaupimasis“.

Biologinis įsisavinimas – duotos dozės dalis, pasiekianti sisteminę apytaką arba patenkanti į fiziologinio aktyvumo vietą. Paprastai bandomosios cheminės medžiagos biologinis įsisavinimas siejamas su pirminiu junginiu, tačiau gali būti siejamas ir su jo metabolitu. Nagrinėjama tik viena cheminė forma. *Pastaba:* biologinis įsisavinimas nėra tas pats, kas sugertis. Pvz., oralinės sugerties (t. y. patekimo į žarnų sieneles ir vartinę apytakos sistemą) ir biologinio įsisavinimo (t. y. patekimo į sisteminę kraujotaką ir audinius) skirtumų, be kitų priežasčių, gali atsirasti dėl cheminės medžiagos irimo vykstant metabolizmui per žarnų sieneles arba atgaliniam nutekėjimui į žarnos spindį arba dėl presisteminio metabolizmo kepenyse (10). Toksinės sudedamosios dalies (pirminio junginio arba metabolito) biologinis įsisavinimas yra labai svarbus parametras vertinant žmonėms gresiančią riziką (atliekant didžiausiųjų dozių ekstrapoliavimą į mažiausiąsias, vieno poveikio būdo ekstrapoliavimą į kitą), siekiant nustatyti vidinę vertę remiantis išorine NNPL arba OD verte (taikytos dozės). Tiriant per burną duotos dozės poveikį kepenims pakanka ištirti oralinę sugertį. Tačiau, jeigu poveikis daromas ne per patekimo vietą, vėliau vertinant riziką paprastai patikimiau taikyti biologinio įsisavinimo, o ne sugerties parametrą.

▼M4

Biologinis tvarumas – žr. „Tvarumas“.

Biologinė transformacija – (paprastai fermentinis) dominančios bandomosios cheminės medžiagos virsmas kūne kita chemine medžiaga. Metabolizmo sinonimas.

C_{max} – maksimali (didžiausia) koncentracija kraujyje (plazmoje, serume) davus dozę arba maksimalus (didžiausias) šalinimas (su šlapimu arba išmatomis) davus dozę.

Išsivalymo greitis – kiekybinis matas, rodantis per laiko vienetą iš kraujo, plazmos arba tam tikro audinio pašalinamą bandomosios cheminės medžiagos kiekį.

Atskira dalis – struktūrinė arba biocheminė kūno, audinio arba ląstelės dalis (arba) vienetas, atskirtas nuo likusios dalies.

Detoksifikacijos būdai – procesų, kuriais toksiškos cheminės medžiagos pašalinamos iš kūno vykstant medžiagų apykaitai arba su išskyromis, seka.

Pasiskirstymas – bandomosios cheminės medžiagos ir jos produktų išsisklaidymas po organizmą.

Fermentai, izofermentai – baltymai, katalizuojantys chemines reakcijas. Izofermentai – tai fermentai, katalizuojantys panašias chemines reakcijas, tačiau turintys kitokią aminorūgščių seką.

Fermentų parametrai – K_m – Michaelio konstanta, V_{max} – didžiausias greitis.

Šalinimas – procesas (-ai), kuriuos (-iais) duota bandomoji cheminė medžiaga ir (arba) jos metabolitai pašalinami iš kūno.

Išoriškai – veikiant iš organizmo arba sistemos išorės arba susidarant organizmo arba sistemos išorėje.

Ekstrapoliacija – vienos arba daugiau nežinomų verčių išvedimas remiantis žinomais arba pastebėtais dalykais.

Pusinės eliminacijos laikas ($t_{1/2}$) – laikas, kurio reikia, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentracija atskiroje dalyje sumažėtų per pusę. Paprastai ši sąvoka vartojama kalbant apie koncentraciją plazmoje arba apie bandomosios cheminės medžiagos kiekį visame kūne.

Sužadinimas, fermentų sužadinimas – fermentų sintezė, kaip reakcija į aplinkos veiksnį arba molekulę sukėlėją.

Tiesiškumas, tiesinė kinetika – kinetiniu požiūriu procesas yra tiesinis, jeigu visi perdavimo iš vienos atskirosios dalies į kitą greičiai yra proporcingi esamiems kiekiams arba koncentracijoms, t. y. pirmojo laipsnio. Išsivalymo ir pasiskirstymo dydžiai, taip pat pusinės eliminacijos laikai atitinkamai yra konstantos. Pasiektos koncentracijos yra proporcingos dozių dydžiams (poveikiui), lengviau prognozuoti akumuliaciją. Tiesiškumą arba netiesiškumą galima įvertinti lyginant susijusius parametrus (pvz., PPK), nustatytus davus skirtingas dozes arba po vienkartinio ir kartotinio poveikio. Jeigu priklausomybės nuo dozės nėra, tai gali būti požymis, kad junginio metabolizmo procese dalyvaujantys fermentai yra įsotinti; PPK padidėjimas po kartotinės dozės, palyginti su vienkartiniu poveikiu, gali būti metabolizmo slopinimo požymis, o PPK mažėjimas gali būti metabolizmo sužadinimo požymis [taip pat žr. (11)].

Masių balansas – bandomosios cheminės medžiagos patekimo į sistemą ir pašalinimo iš jos apskaita.

Medžiagos balansas – žr. „Masių balansas“.

▼M4

Toksinio poveikio mechanizmas (būdas), veikimo mechanizmas (būdas) – veikimo mechanizmas yra specifinės biocheminės sąveikos, per kurias pasireiškia bandomosios cheminės medžiagos poveikis. Veikimo būdas yra bendresnio pobūdžio būdai, kuriais pasireiškia bandomosios cheminės medžiagos toksiškumas.

Metabolizmas – biologinės transformacijos sinonimas.

Metabolitai – metabolizmo arba metabolinių procesų produktai.

Oralinė sugertis – bandomosios cheminės medžiagos dozės procentinė dalis, absorbuota per dozės davimo vietą (t. y. per virškinimo traktą). Šis labai svarbus parametras gali būti naudojamas norint sužinoti duotos bandomosios cheminės medžiagos dalį, kuri pasiekia vartinę veną, o vėliau – kepenis.

Pasiskirstymo koeficientas – cheminės medžiagos skirtingo tirpumo dviejuose tirpikliuose matas.

Didžiausieji lygiai kraujyje (plazmoje, serume) – didžiausia koncentracija kraujyje (plazmoje, serume) davus dozę (taip pat žr. „C_{max}“).

Tvarumas (biologinis tvarumas) – ilgalaikis cheminės medžiagos išlikimas (biologinėje sistemoje) dėl atsparumo irimui ir (arba) šalinimui.

Analogijos metodas – vienos arba daugiau cheminių medžiagų pasekmės informacijos naudojimas prognozuojant tikslinės cheminės medžiagos pasekmę.

Receptorių mikroskopinė autoradiografija (arba receptorių mikroautoradiografija) – metodika, kuri gali būti taikoma tirti ksenobiotinių medžiagų sąveiką su konkrečiomis audinių sritimis arba ląstelių populiacijomis, pvz., atliekant jungimosi prie receptorių arba konkrečių veikimo būdų tyrimus, kuriems gali reikėti didelės raiškos ir didelio jautrio, kurių gali būti neįmanoma užtikrinti kitokiais metodais, pvz., viso kūno autoradiografijos.

Dozės davimo būdas (per burną, intraveninis, per odą, įkvepiant ir t. t.) – priemonės, kuriomis cheminės medžiagos perduodamos į kūną (pvz., per burną zondu, per burną su pašaru, per odą, įkvepiant, suleidžiant į veną ir t. t.).

Įsotinimas – būklė, kai vienas arba daugiau kinetinių procesų (pvz., sugertis, metabolizmas arba išsivalymas) yra maksimalaus lygio (t. y. „įsotintas“).

Jautris – metodo arba prietaiso geba išskirti matavimo atsakus, rodančius skirtingus dominančio kintamojo lygius.

Pastovūs lygiai kraujyje (plazmoje) – nepusiausvyrinė atviros sistemos būklė, kai visos sistemoje veikiančios jėgos nėra tiksliai atsveriamos priešinėmis jėgomis ir kai visų tos sistemos elementų koncentracija yra pastovi, nors medžiaga ir teka per sistemą.

Sistemų modeliai (fiziologija pagrįsti toksikokinetiniai modeliai, farmakokinetika pagrįsti modeliai, fiziologija pagrįsti farmakokinetiniai modeliai, biologija pagrįsti modeliai ir t. t.) – abstraktūs modeliai, pagal kuriuos matematine kalba aprašomas sistemos veikimas.

Tikslinis organas – audinys, kuriame pasireiškia pagrindinis neigiamas toksinės medžiagos poveikis.

▼M4

Bandomoji cheminė medžiaga – pagal šį bandymo metodą bandoma cheminė medžiaga arba mišinys.

Pasiskirstymas audiniuose – abipusis bandomosios cheminės medžiagos judėjimas iš vienos kūno vietos į kitą. Pasiskirstymą audiniuose galima ištirti atliekant organų skrodimą, homogenizavimą, deginimą ir scintiliacijos skystyje skaičiavimus arba taikant kokybinę ir (arba) kiekybinę viso kūno autoradiografiją. Pirmasis metodas yra naudingas, kai norima nustatyti koncentraciją ir procentinį regeneravimą iš audinių ir likusios tų pačių gyvūnų skerdenos, tačiau juo gali būti pasiekiama nepakankama raiška visuose audiniuose ir užtikrinamas mažesnis nei idealus bendrasis regeneravimas (< 90 %). Žr. pirmiau pateiktą šio metodo apibrėžtį.

$\mathbf{T_{max}}$ – laikas, kurio reikia norint pasiekti C_{max}.

Toksikokinetika (farmakokinetika) – cheminių medžiagų sugertis, pasiskirstymas, metabolizmas ir šalinimas laikui bėgant.

Modelių patvirtinimas – modelio tinkamumo nuosekliai apibūdinti turimus toksikokinetinius duomenis įvertinimo procedūra. Modeliai gali būti vertinami taikant statistinį ir vizualinį modeliuojamų prognozių, gautų naudojant eksperimentines vertes, palyginimą su bendruoju nepriklausomu kintamuoju (pvz., laiku). Vertinimo apimtis turėtų būti pagrįsta atsižvelgiant į numatomą modelio paskirtį.

▼C1

B.37. **ŪMIAI VEIKIANT ORGANINIAIS FOSFORO JUNGINIAIS SUKELTO UŽDELSTO NEUROTOKSIŠKUMO BANDYMAS**

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Siekiant įvertinti medžiagų toksiškumą reikia atsižvelgti į tam tikrų klasių medžiagų potencialą sukelti tam tikrų tipų neurotoksinį poveikį, kuris nenustatomas įprastais toksiškumo bandymais. Pastebėta, kad kai kurie organiniai fosforo junginiai sukelia uždelstą neurotoksinį poveikį, tad reiktų apsvarstyti šių medžiagų įvertinimą.

Siekiant nustatyti medžiagas, sukeliančias uždelstą polineuropatiją, gali būti taikomi atrankos bandymai *in vitro*, tačiau neigiami bandymo *in vitro* duomenys dar neįrodo, kad duotoji medžiaga nėra neurotoksiška.

Žiūrėti Bendrojo įvado B dalį.

1.2. APIBRĖŽTYS

Organiniai fosforo junginiai apima organinio fosforo esterius, tioesterius ar organinio fosforo anhidridus, taip pat organinio fosforo, organinio fosfono ar organinio fosforamido rūgštis ar gimininges fosforotiono, fosforonotiono ar fosforotioamido rūgštis, ar kitas medžiagas, kurios gali sukelti uždelstą neurotoksinį poveikį, būdingą šiai medžiagų klasei.

Uždelstas neurotoksiškumas yra sindromas, susijęs su ataksijos, nugaros smegenų ir periferinio nervo distalinės aksonopatijos ilgai trunkančiu uždelsimu bei neuropatijos sukeltu esterazės slopinimu nervų audiniuose.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Norint įrodyti, jog laboratorinėmis sąlygomis bandomųjų rūšių atsakas labai nesikeičia, etaloninės medžiagos gali būti išbandytos su teigiama kontroline gyvūnų grupe.

Plačiai naudojamas neurotoksikantas yra tri-o-tolilfosfatas (CAS 78–30–8, Einecs 201–103–5, CAS nomenklatūra: fosforo rūgštis, tris(2-metilfenil)esteris), taip pat žinomas kaip tris-o-krezilfosfatas.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Naminėms vištoms, kurios, jeigu reikia, yra apsaugotos nuo ūmaus cholinerginio poveikio, per virškinamąjį traktą duodama bandomosios medžiagos vienkartinė dozė. 21 dieną stebimi gyvūnų elgesio nukrypimai, ataksija ir paralyžius. Paprastai praėjus 24 ir 48 valandoms po dozavimo iš kiekvienos grupės atsitiktiniu atrankos būdu paimtoms vištoms atliekami biocheminiai tyrimai, t. y. nustatomas neuropatijos sukeltas esterazės slopinimas. Praėjus 21 dienai po medžiagos poveikio, likusios vištos numarinamos ir tam tikri nervų audiniai ištiriami histopatologiškai.

▼C1

1.5. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.5.1. **Pasiruošimas**

Sveikos jaunos suaugusios vištos, nesergančios atlikti bandymą trukdančiomis virusinėmis ligomis, negaunančios medikamentų ir neturinčios eisenos pakitimų, atsitiktinės atrankos principu paskirstomos į bandomąją ir kontrolinę grupes ir mažiausiai 5 dienas prieš bandymą aklimatizuojamos laboratorijos sąlygomis.

Reikia naudoti pakankamai didelius narvus arba aptvarus, kurie leistų vištoms laisvai judėti ir būtų lengva stebėti jų eiseną.

Bandomoji medžiaga turėtų būti dozuojama per virškinamąjį traktą, naudojant zondą, želatinines kapsules arba lygiaverčiu metodu. Skysčiai gali būti duodami neskiesti arba ištirpinti nešiklyje, pavyzdžiui, kukurūzų aliejuje; kietosios medžiagos turėtų būti ištirpinamos, nes didelės kietųjų medžiagų dozės želatininėse kapsulėse gali būti neefektyviai absorbuojamos. Jei naudojamas kitas nešiklis nei vanduo, jo toksinės savybės turi būti žinomos, o jeigu nežinomos, tai prieš bandymą jos turi būti nustatytos.

1.5.2. **Bandymo sąlygos**

1.5.2.1. *Bandomieji gyvūnai*

Rekomenduojamos nuo 8 iki 12 mėnesių amžiaus jaunos suaugusios naminės vištos dedeklės (*Gallus gallus domesticus*). Turėtų būti naudojamos standartinio dydžio veislės ir atmainos vištos, užaugintos sąlygomis, leidžiančiomis laisvai judėti.

1.5.2.2. *Skaičius ir lytis*

Be bandomosios grupės turi būti dar nešiklio kontrolinė grupė ir teigiamos kontrolės grupė. Su nešiklio kontrolinės grupės gyvūnais reikia elgtis lygiai taip pat kaip ir su bandomaisiais gyvūnais, išskyrus tai, kad jie negauna bandomosios medžiagos.

Kiekvienoje paukščių grupėje turi būti toks vištų skaičius, kad mažiausiai šešias būtų galima numarinti biocheminiams tyrimams (po tris tam tikrais dviem laiko momentais) ir kad po 21 stebėjimo dienos patologiniams tyrimams išgyventų dar šešios vištos.

Teigiamos kontrolės grupė gali būti bandoma paraleliai su kitomis grupėmis arba tai gali būti nesenai atlikto ankstesnio bandymo kontrolinė grupė. Šioje grupėje turi būti mažiausiai šešios vištos, paveiktos žinomais uždelsto veikimo neurotoksikantais, trys vištos yra skirtos biocheminiams tyrimams ir trys patologijai tirti. Rekomenduojama periodiškai atnaujinti ankstesnių bandymų duomenis. Kai bandymų laboratorija pakeičia kurį nors esminį bandymo elementą (pvz., vištų atmainą, pašarus, laikymo sąlygas), turi būti gauti nauji teigiamos kontrolės duomenys.

▼C1

1.5.2.3. *Dozės dydžiai*

Pagrindiniame bandyme naudotinų dozių dydžiams nustatyti reikia atlikti išankstinį bandymą su atitinkamu vištų ir dozių grupių skaičiumi. Kad būtų galima nustatyti pagrindinio bandymo dozių ribas, paprastai išankstiniame bandyme turi būti tam tikras gaištamumas. Norint užkirsti kelią dėl ūmaus cholinerginio poveikio kylančioms žūtims, galima naudoti atropiną ar kitą apsauginę medžiagą, kuri netrukdytų pasireikšti uždelsto neurotoksiškumo atsakams. Siekiant apskaičiuoti maksimalią nemirtiną bandomosios medžiagos dozę, galima panaudoti daugybę tiriamųjų metodų (žiūrėkite metodą B. 1 bis). Parenkant dozę gali būti naudingi anksčiau atliktų bandymų su vištomis duomenys arba bet kokia kita toksikologinė informacija.

Bandomosios medžiagos dozės dydis pagrindiniame bandyme turi būti kuo aukštesnis atsižvelgiant į išankstinio bandymo rezultatus ir aukščiausią ribinę 2 000 mg/kg kūno masės dozę. Kad ir koks būtų gaištamumas, po 21 dienos turi likti reikiamas išgyvenusių paukščių skaičius – šeši biocheminiams ir šeši histologiniams tyrimams. Siekiant užkirsti kelią gaištamumui dėl ūmaus cholinerginio poveikio, galima naudoti atropiną arba bet kurią kitą apsauginę medžiagą, netrukdančią pasireikšti uždelsto neurotoksiškumo atsakams.

1.5.2.4. *Ribinis bandymas*

Jeigu tirtas dozės lygis, ne žemesnis, negu 2 000 mg/kg kūno masės, nesukelia pastebimų toksinių poveikių ir jeigu iš turimų duomenų apie struktūriškai panašias medžiagas toksinio poveikio nesitikima, didesnių dozių bandymai nebūtini. Toks ribinis bandymas netaikomas tais atvejais, kai atsižvelgiant į žmonių sąlytį su medžiaga reikia naudoti didesnio dydžio dozę.

1.5.2.5. *Stebėjimo laikotarpis*

Stebėjimo laikotarpis turėtų trukti 21 dieną.

1.5.3. **Bandymo eiga**

Po to, kai paukštis gauna apsauginę medžiagą, kuri užkerta kelią nuo dėl ūmaus cholinerginio poveikio galimai žūčiai, duodama bandomosios medžiagos vienkartinė dozė.

1.5.3.1. *Bendrasis stebėjimas*

Stebėjimai prasideda tuoj pat po medžiagos davimo. Pirmas dvi dienas visos vištos atidžiai stebimos kelis kartus, o vėliau mažiausiai vieną kartą per dieną 21 dieną arba iki nustatyto numarinimo. Visi toksiškumo požymiai turi būti registruojami, žymint jų pradžią, tipą, ryškumą ir elgesio nukrypimų trukmę. Ataksiją reikėtų vertinti mažiausiai pagal keturių lygių skalę, taip pat reikėtų nurodyti paralyžių. Norint pastebėti minimalų toksinį poveikį, vištos, atrinktos patologijai, mažiausiai du kartus per savaitę išimamos iš narvų ir stebimas jų judamasis aktyvumas, priverčiant jas judėti, pvz., kopėčiomis. Kai pastebimi gaištantys ir patiriantys dideles kančias bei skausmą paukščiai, jie išimami iš narvų, humaniškai numarinami ir atliekama jų nekroskopija.

▼C1

1.5.3.2. *Kūno masė*

Prieš bandomosios medžiagos davimą visas vištas reikia pasverti, vėliau sveriama mažiausiai vieną kartą per savaitę.

1.5.3.3. *Biochemija*

Atsitiktinės atrankos būdu šešios vištos iš kiekvienos bandomosios ir nešiklio kontrolinės grupės bei trys vištos iš pozityvinės kontrolinės grupės (jei ši grupė paraleliai bandoma) praėjus kelioms dienoms po dozavimo numarinamos, išimamos galvos smegenys ir juosmens dalies nugaros smegenys bei ištiriamas neuropatijos sukeltas esterazės slopinimo aktyvumas. Kartais naudinga ištirti sėdimojo nervo audinio neuropatijos sukeltą esterazės slopinimo aktyvumą. Paprastai praėjus 24 valandoms numarinami trys kontrolinės ir trys bandomosios grupės paukščiai, o praėjus 48 valandoms, dar po tris, tuo tarpu trys pozityvinės kontrolės vištos numarinamos po 24 valandų. Jeigu klinikiniai intoksikacijos požymiai (tai dažnai gali būti nustatyta stebint cholinerginių požymių pradžios laiką) rodo, kad toksiška medžiaga perduodama labai lėtai, tada geriau paukščių audinių pavyzdžius imti du kartus tarp 24 ir 72 valandų po dozavimo.

Jei laikoma reikalinga, galima ištirti acetilcholinesterazę (AChE). Tačiau gali įvykti spontaninė AChE reaktyvacija *in vivo*, o tai gali sąlygoti nepakankamą medžiagos, kaip AChE inhibitoriaus, stiprumo įvertinimą.

1.5.3.4. *Bendroji nekroskopija*

Bendrosios nekroskopijos metu reikia apžiūrėti visų gyvūnų galvos bei nugaros smegenų išvaizdą.

1.5.3.5. *Histopatologinis ištyrimas*

Išgyvenusių visą stebėjimo periodą ir nepanaudotų biocheminiams tyrimams paukščių nervų audiniai turi būti mikroskopiškai ištirti. Audiniai turi būti fiksuojami *in situ*, naudojant perfuzijos metodą. Reikia atlikti smegenėlių (vidurinį-pailgąjį lygį), pailgųjų smegenų, nugaros smegenų ir periferinių nervų pjūvius. Reikia atlikti nugaros smegenų pjūvius iš viršutinio kaklinio segmento, vidurinės-krūtininės ir juosmens-kryžmens dalių. Reikia atlikti distalinių blauzdikaulio nervų ir jo atšakų į skrandžio raumenį bei sėdimojo nervo pjūvius. Šiuos pjūvius reikia dažyti atitinkamais dažais - būdingais mielinui ir aksonui.

2. **DUOMENYS**

Pasirinktų metodų (biochemijos, histopatologijos ir elgesio stebėjimo) požiūriu gauti neigiami rezultatai paprastai nereikalauja uždelsto neurotoksiškumo bandymo tęsimo. Tik šiuo požiūriu dviprasmiai arba negalutiniai rezultatai gali reikalauti tolesnio įvertinimo.

Turėtų būti pateikiami kiekvieno paukščio duomenys. Be to, visi duomenys turi būti pateikiami lentelių forma, nurodant kiekvienoje tirtoje grupėje bandymo pradžioje buvusių paukščių skaičių, paukščių su pažeidimais, elgesio ar biocheminiais pakitimais skaičių, šių pažeidimų ar pakitimų tipus ir jų sunkumo laipsnį bei paukščių procentą su kiekvieno pažeidimo ar pakitimo tipu ir sunkumo laipsniu.

▼C1

Gautus duomenis reikia vertinti pagal pakitimų pasireiškimą ir sunkumo laipsnį bei nustatant koreliacinius ryšius tarp elgesio, biochemijos ir histopatologinių pakitimų bei visų kitų pastebėtų pakitimų bandomojoje ir kontrolinėje grupėse.

Skaitmeniniai rezultatai turėtų būti apdoroti tinkamais ir priimtinais statistiniais metodais. Statistiniai metodai turėtų būti pasirinkti planuojant bandymą.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jei įmanoma, turėtų būti ši informacija:

Bandomieji gyvūnai:

— panaudotos atmainos,

— gyvūnų skaičius ir amžius,

— gavimo šaltinis, laikymo sąlygos ir kt.,

— kiekvieno gyvūno kūno masė bandymo pradžioje.

Bandymo sąlygos:

— išsami informacija apie bandomosios medžiagos preparatą, stabilumą ir homogeniškumą, kur tinkama,

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas,

— informacija apie bandomosios medžiagos davimą,

— informacija apie pašarų ir vandens kokybę,

— dozės pasirinkimo pagrindimas,

— informacija apie duotas dozes, įskaitant naudotą nešiklį, jo tūrį ir duotos medžiagos fizikinę formą,

— apsauginės medžiagos tapatumas ir išsami informacija apie jos davimą.

Rezultatai:

— kūno masės duomenys,

— grupės toksinio atsako duomenys, įskaitant nugaišimą,

— pastebėti klinikiniai pokyčiai, jų sunkumo laipsnis ir trukmė (ar grįžtami, ar ne),

— smulkus biocheminių metodų ir gautų duomenų aprašymas,

— nekroskopijos duomenys,

— smulkus visų gautų histopatologinių duomenų aprašymas,

— statistinis rezultatų apdorojimas ten, kur tinka.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

4. **NUORODOS**

Šis metodas atitinka OECD TG 418.

▼C1

B.38. **ORGANINIŲ FOSFORO JUNGINIŲ SUKELTO UŽDELSTO NEUROTOKSIŠKUMO 28 DIENŲ BANDYMAS**

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Siekiant įvertinti medžiagų toksiškumą reikia atsižvelgti į tam tikrų klasių medžiagų potencialą sukelti tam tikrų tipų neurotoksinį poveikį, kuris nenustatomas įprastais toksiškumo bandymais. Pastebėta, kad kai kurie organiniai fosforo junginiai sukelia uždelstą neurotoksinį poveikį, tad reiktų apsvarstyti šių medžiagų įvertinimą.

Siekiant nustatyti medžiagas, sukeliančias uždelstą polineuropatiją, gali būti taikomi atrankos bandymai *in vitro*, tačiau neigiami bandymo *in vitro* duomenys dar neįrodo, kad duotoji medžiaga nėra neurotoksiška.

Atliekant šį 28 dienų uždelsto neurotoksiškumo bandymą gaunama informacijos apie riziką sveikatai, kylančią gaunant medžiagą pakartotinai tam tikrą laiko tarpą. Šiuo bandymu gaunama informacijos apie reakciją į dozę bei galima nustatyti nepastebėto neigiamo poveikio ribą, reikalingą nustatant medžiagos saugumo kriterijus.

Žiūrėti Bendrojo įvado B dalį.

1.2. APIBRĖŽTYS

Organiniai fosforo junginiai apima organinio fosforo esterius, tioesterius ar organinio fosforo anhidridus, taip pat organinio fosforo, organinio fosfono ar organinio fosforamido rūgštis ar gimininges fosforotiono, fosforonotiono ar fosforotioamido rūgštis, ar kitas medžiagas, kurios gali sukelti uždelstą neurotoksinį poveikį, būdingą šiai medžiagų klasei.

Uždelstas neurotoksiškumas yra sindromas, susijęs su ataksijos, nugaros smegenų ir periferinio nervo distalinės aksonopatijos ilgai trunkančiu uždelsimu bei neuropatijos sukeltu esterazės slopinimu nervų audiniuose.

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Naminėms vištoms per virškinamąjį traktą 28 dienas kasdien duodama bandomoji medžiaga. Medžiagos davimo periodu ir praėjus 14 dienų po to bent vieną kartą dienoje gyvūnai stebimi siekiant nustatyti jų elgesio nukrypimus, ataksiją ir paralyžių. Paprastai praėjus 24 ir 48 valandoms po paskutinio dozavimo, iš kiekvienos grupės atsitiktiniu atrankos būdu paimtoms vištoms atliekami biocheminiai tyrimai, t. y. nustatomas neuropatijos sukeltas esterazės slopinimas. Praėjus dviems savaitėms po paskutinės dozės, likusios vištos numarinamos ir tam tikri nervų audiniai ištiriami histopatologiškai.

▼C1

1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.4.1. **Pasiruošimas**

Sveikos jaunos suaugusios vištos, nesergančios atlikti bandymą trukdančiomis virusinėmis ligomis, negaunančios medikamentų ir neturinčios eisenos pakitimų, atsitiktinės atrankos principu paskirstomos į bandomąją ir kontrolinę grupes ir mažiausiai 5 dienas prieš bandymą aklimatizuojamos laboratorijos sąlygomis.

Turi būti naudojami pakankamai dideli narvai arba aptvarai, kurie leistų vištoms laisvai judėti bei laisvai stebėti jų eiseną.

Bandomoji medžiaga kasdien septynias dienas per savaitę dozuojama per virškinamąjį traktą, naudojant zondą arba želatinines kapsules. Skysčiai gali būti duodami neskiesti arba ištirpinti nešiklyje, pavyzdžiui, kukurūzų aliejuje; kietosios medžiagos turėtų būti ištirpinamos, nes didelės kietųjų medžiagų dozės želatininėse kapsulėse gali būti neefektyviai absorbuojamos. Jei naudojamas kitas nešiklis nei vanduo, jo toksinės savybės turi būti žinomos, o jeigu nežinomos, tai prieš bandymą jos turi būti nustatytos.

1.4.2. **Bandymo sąlygos**

1.4.2.1. *Bandomieji gyvūnai*

Rekomenduojamos nuo 8 iki 12 mėnesių amžiaus jaunos suaugusios naminės vištos dedeklės (*Gallus gallus domesticus*). Turėtų būti naudojamos standartinio dydžio veislės ir atmainos vištos, užaugintos sąlygomis, leidžiančiomis laisvai judėti.

1.4.2.2. *Skaičius ir lytis*

Reikia sudaryti mažiausiai tris bandomąsias grupes bei vieną nešiklio kontrolinę grupę. Su nešiklio kontrolinės grupės gyvūnais reikia elgtis lygiai taip pat kaip ir su bandomaisiais gyvūnais, išskyrus tai, kad jie negautų bandomosios medžiagos.

Kiekvienoje paukščių grupėje reikia panaudoti tokį skaičių vištų, kad mažiausiai šešias galima būtų numarinti biocheminiams tyrimams (po tris, praėjus dviems skirtingiems laiko tarpams) ir, kad praėjus 14 dienų po paskutinio dozavimo patologiniams tyrimams išgyventų dar šešios vištos.

1.4.2.3. *Dozių dydžiai*

Dozės dydžius reikia parinkti atsižvelgiant į uždelsto neurotoksiškumo ūmaus bandymo rezultatus arba į jau turimus bandomosios medžiagos toksiškumo ar kinetinius duomenis. Pasirinkta didžiausia dozė turi sukelti toksinį poveikį, geriausiai uždelstą neurotoksinį poveikį, tačiau turi nesukelti gyvūno žūties ar nepakeliamų kančių. Kiti mažėjančia tvarka einantys dozių lygiai turi sukelti atitinkamai mažesnius pokyčius (atsakus), o mažiausias dozės lygis turėtų nesukelti pastebimų neigiamų poveikių.

▼C1

1.4.2.4. *Ribinis bandymas*

Jeigu tirtas dozės lygis, ne žemesnis, negu 1 000 mg/kg kūno masės/parai nesukelia pastebimų toksinių poveikių ir jeigu iš turimų duomenų apie struktūriškai panašias medžiagas nesitikima toksiškumo, didesnių dozių bandymai nebūtini. Toks ribinis bandymas netaikomas tais atvejais, kai atsižvelgiant į tikėtiną žmonių sąlytį su medžiaga reikia naudoti didesnio dydžio dozę.

1.4.2.5. *Stebėjimo periodas*

Visi paukščiai stebimi mažiausiai vieną kartą per dieną visą medžiagos dozavimo periodą ir 14 dienų po jo, iki atliekamas skrodimas.

1.4.3. **Bandymo eiga**

Paukščiams bandomoji medžiaga duodama 28 dienas kasdien septynias dienas per savaitę.

1.4.3.1. *Bendrasis stebėjimas*

Stebėjimai prasideda tuoj pat po medžiagos davimo. 28 dozavimo dienas ir 14 dienų po to visos vištos atidžiai stebimos mažiausiai vieną kartą per dieną arba iki nustatyto numarinimo. Visi toksiškumo požymiai turi būti registruojami, žymint jų pradžią, tipą, sunkumo laipsnį ir trukmę. Stebėjimas turi apimti elgesio nukrypimus, bet neturi jais apsiriboti. Ataksiją reikėtų vertinti mažiausiai pagal keturių lygių skalę ir reikėtų žymėti paralyžių. Norint pastebėti minimalų toksinį poveikį, vištos mažiausiai du kartus per savaitę išimamos iš narvų ir stebimas jų judamasis aktyvumas, priverčiant judėti, pvz., kopėčiomis. Kai pastebimi gaištantys ir patiriantys dideles kančias bei skausmą paukščiai, jie išimami iš narvų, humaniškai numarinami ir atliekama jų nekroskopija.

1.4.3.2. *Kūno masė*

Prieš pirmąjį bandomosios medžiagos davimą visas vištas reikia pasverti, vėliau tai daroma mažiausiai vieną kartą per savaitę.

1.4.3.3. *Biochemija*

Atsitiktinės atrankos būdu šešios vištos iš kiekvienos bandomosios ir nešiklio kontrolinės grupių, praėjus kelioms dienoms po paskutinės dozės, numarinamos, išimamos galvos smegenys ir juosmens dalies nugaros smegenys bei ištiriamas neuropatijos sukeltas esterazės slopinimo aktyvumas. Kartais naudinga ištirti sėdimojo nervo audinio neuropatijos sukeltą esterazės slopinimo aktyvumą. Paprastai, praėjus 24 valandoms po paskutinės dozės, numarinami trys kontrolinės ir trys kiekvienos bandomosios grupės paukščiai, o praėjus 48 valandoms, dar po tris. Jeigu ūmaus arba kitų bandymų (pvz. toksikokinetinių) duomenys rodo, kad po paskutinės dozės geriau pasirinkti kitą numarinimo laiką negu siūloma, tuomet galima pasirinkti kitą laiką ir pridėti atitinkamus dokumentus.

Taip pat galima tirti acetilcholinesterazę (AChE). Tačiau gali įvykti spontaninė AChE reaktyvacija *in vivo*, o tai gali sąlygoti nepakankamą medžiagos, kaip AChE inhibitoriaus, stiprumo įvertinimą.

▼C1

1.4.3.4. *Bendroji nekroskopija*

Bendrosios nekroskopijos, kuri atliekama numarintiems ir nugaišusiems gyvūnams, metu reikia apžiūrėti visų gyvūnų galvos bei nugaros smegenų išvaizdą.

1.4.3.5. *Histopatologinis ištyrimas*

Išgyvenusių visą stebėjimo periodą ir nepanaudotų biocheminiams tyrimams paukščių nervų audiniai turi būti mikroskopiškai ištirti. Audiniai turi būti fiksuojami *in situ*, naudojant perfuzijos metodą. Reikia tirti smegenėlių (vidurinįjį-pailgąjį lygį), pailgųjų smegenų, nugaros smegenų ir periferinių nervų dalis. Reikia atlikti nugaros smegenų pjūvius iš viršutinio kaklinio segmento, vidurinės-krūtininės ir juosmens-kryžmens dalių. Reikia atlikti distalinių blauzdikaulio nervų ir jo atšakų į skrandžio raumenį bei sėdimojo nervo pjūvius. Šiuos pjūvius reikia dažyti atitinkamais dažais - būdingais mielinui ir aksonui. Pradžioje reikia mikroskopiškai ištirti visų kontrolinės ir didžiausios dozės grupių paukščių fiksuotus audinius. Jeigu didžiausios dozės grupėje nustatomi pakitimai, reikėtų mikroskopiškai tirti viduriniosios ir mažiausios dozės grupių paukščių audinius.

2. **DUOMENYS**

Pasirinktų metodų (biochemijos, histopatologijos ir elgesio stebėjimo) požiūriu gauti neigiami rezultatai paprastai nereikalauja uždelsto neurotoksiškumo bandymo tęsimo. Tik šiuo požiūriu dviprasmiai arba negalutiniai rezultatai gali reikalauti tolesnio įvertinimo.

Turėtų būti pateikiami kiekvieno paukščio duomenys. Be to, visi duomenys turi būti pateikiami lentelių forma, nurodant kiekvienoje tirtoje grupėje bandymo pradžioje buvusių paukščių skaičių, paukščių su pažeidimais, elgesio ar biocheminiais pakitimais skaičių, šių pažeidimų ar pakitimų tipus ir sunkumo laipsnį bei paukščių procentą su kiekvieno pažeidimo ar pakitimo tipu ir sunkumo laipsniu.

Gautus duomenis reikia vertinti pagal pakitimų pasireiškimą ir sunkumo laipsnį bei nustatant koreliacinius ryšius tarp elgesio, biochemijos ir histopatologinių pakitimų bei visų kitų pastebėtų pakitimų bandomosiose ir kontrolinėje grupėse.

Skaitmeniniai rezultatai turėtų būti apdoroti tinkamais ir priimtinais statistiniais metodais. Statistiniai metodai turėtų būti pasirinkti planuojant bandymą.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jei įmanoma, pateikiama ši informacija:

Bandomieji gyvūnai:

— panaudotos atmainos,

— gyvūnų skaičius ir amžius,

— gavimo šaltinis, laikymo sąlygos ir kt.,

— kiekvieno gyvūno kūno masė bandymo pradžioje.

▼C1

Bandymo sąlygos:

— išsami informacija apie bandomosios medžiagos paruošimą, stabilumą ir homogeniškumą, kur tinkama,

— tirpiklio pasirinkimo pagrindimas,

— išsami informacija apie poveikį bandomąja medžiaga,

— išsami informacija apie pašarų ir vandens kokybę,

— dozės pasirinkimo pagrindimas,

— informacija apie duotas dozes, įskaitant naudotą nešiklį, jo turį ir duotos medžiagos fizikinę formą,

— pasirinkus biocheminiams tyrimams kitą laiką (ne po 24 ir 48 valandų), tokio pasirinkimo pagrindimas.

Rezultatai:

— kūno masės duomenys,

— duomenys apie toksinį atsaką pagal dozės lygį, įskaitant nugaišimą,

— nepastebimo neigiamo poveikio riba,

— pastebėti klinikiniai pokyčiai, jų sunkumo laipsnis ir trukmė (grįžtami ar ne),

— smulkus biocheminių metodų ir gautų duomenų aprašymas,

— nekroskopijos duomenys,

— smulkus visų gautų histopatologinių duomenų aprašymas,

— statistinis rezultatų apdorojimas ten, kur tinka.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

4. **NUORODOS**

Šis metodas atitinka OECD TG 419.

▼C1

B.39. ŽINDUOLIŲ KEPENŲ LĄSTELIŲ NENUMATYTOS DNR SINTEZĖS (NDS) BANDYMAS *IN VIVO*

1. METODAS

Šis metodas atitinka OECD TG 486 – Žinduolių kepenų ląstelių nenumatytos DNR sintezės (NDS) bandymą *in vivo* (1997).

1.1. ĮVADAS

Žinduolių kepenų ląstelių nenumatytos DNR sintezės (NDS) bandymo *in vivo* tikslas – nustatyti medžiagas, kurios sukelia DNR pažaidų reparaciją žinduolių, paveiktų bandomąja medžiaga, kepenų ląstelėse 1, 2, 3, 4.

Šiuo bandymu galima ištirti genotoksinį cheminių medžiagų poveikį kepenims. Galutinis nustatytas dydis parodo, kad kepenų ląstelėse įvyksta DNR pažaidos, o vėliau jų reparaciją. Apskritai, absorbuotų junginių metabolizmo pagrindinė vieta yra kepenys. Todėl kepenys yra tinkamas DNR pažaidų bandymo *in vivo* objektas.

Jeigu nustatoma, kad bandomoji medžiaga nepasiekia tikslinio audinio, šio bandymų metodo nereikėtų naudoti.

Nenumatytos DNR sintezės (NDS) produktai analizuojami, įvertinant žymėtų nukleozidų transportą į ląsteles, kuriose nevyksta numatyta DNR sintezė (paprastai vykstanti ląstelės ciklo S fazės metu). Plačiausiai naudojamas metodas, skirtas šiam įvertinimui, yra tričiu (3H) žymėto timidino autoradiografija. Atliekant nenumatytos DNR sintezės (NDS) bandymus *in vivo*, daugiausiai naudojamos žiurkių kepenys. Galima naudoti ir kitus audinius nei kepenys, tačiau jie nėra šio metodo objektas.

Nenumatytos DNR sintezės (NDS) nustatymas priklauso nuo pažaidos vietoje iškirptų ir kitomis pakeistų DNR bazių skaičiaus. Todėl nenumatytos DNR sintezės bandymas ypač vertingas tada, kai siekiama identifikuoti „ilgų fragmentų pažaidų“ (fragmentų ilgis siekia nuo 20 iki 30 bazių), sukeltų, paveikus bandomąja medžiaga, reparacijas. Tuo tarpu „trumpų fragmentų pažaidos“ nustatomos, esant daug mažesniam jautrumui. Be to, mutageniniai įvykiai pasireiškia dėl nevykstančios pažaidų reparacijos, klaidingai vykstančios reparacijos ar klaidingos DNR replikacijos. Nenumatytos DNR sintezės aktyvumas neparodo pažaidų reparacijos efektyvumo. Visai įmanoma, kad mutagenas sąveikauja su DNR, tačiau pažaidos reparacija iškirpos atstatymo būdu nevyksta. Tai, kad nenumatytos DNR sintezės bandymo metu negaunama specifinės informacijos apie mutageninį aktyvumą, kompensuoja didelis matavimo jautrumas, nes tiriamas visas genomas.

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. APIBRĖŽTYS

Ląstelės, kuriose vyksta reparacija – ląstelės, kurių grynasis branduolio granulių (GBG) skaičius yra didesnis negu pradinė vertė, ir tai patvirtina bandymą atliekanti laboratorija.

Grynasis branduolio granulių skaičius (GBG) – kiekybinis nenumatytos DNR sintezės aktyvumo ląstelėse, atliekant nenumatytos DNR sintezės bandymą autoradiografijos metodu, įvertinimo matas, išreiškiamas iš branduolio granulių (BG) skaičiaus atimant vidutinį citoplazminių granulių, esančių nukleoplazminiuose ploteliuose, skaičių (CG): GBG = BG -CG. GBG nustatomas kiekvienoje ląstelėje ir tada apskaičiuojama kultūroje ar paraleliose kultūrose esančių ląstelių GBG bendra vertė.

▼C1

Nenumatyta DNR sintezė (NDS) – DNR reparacinė sintezė, vykstanti po cheminėmis medžiagomis ar fiziniais veiksniais sukeltos DNR pažaidos apimto regiono iškirpimo bei pašalinimo.

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Tiriant nenumatytą DNR sintezę (NDS) žinduolių kepenų ląstelėse *in vivo*, parodoma, kad reparacinė DNR sintezė vyksta po to, kai cheminėmis medžiagomis ar fiziniais veiksniais sukeltos DNR pažaidos apimtas regionas iškerpamas ir pašalinamas. Šis bandymas bendru atveju yra pagrįstas ^{3}H žymėto timidino įterpimu į kepenų ląstelių, kurios sudaro labai nedidelę ląstelių, esančių ląstelinio ciklo S fazėje, dalį, DNR. ^{3}H žymėto timidino transportas į ląstelę vertinamas autoradiografijos metodu, kadangi šis metodas nėra toks jautrus ląstelių, esančių S fazėje, atžvilgiu, kaip scintiliacijos skystyje nustatymo metodas.

1.4. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.4.1. **Pasiruošimas**

1.4.1.1. *Gyvūnų rūšies pasirinkimas*

Dažniausiai yra naudojamos žiurkės, tačiau gali būti panaudotos ir kitos atitinkamos žinduolių rūšys. Reikėtų naudoti dažniausiai vartojamus jaunų sveikų suaugusių gyvūnų laboratorines veisles. Bandymo pradžioje gyvūnų svorio variacijos turi būti minimalios ir neviršyti ± 20 % kiekvienos lyties gyvūnų vidutinio svorio.

1.4.1.2. *Laikymo ir maitinimo sąlygos*

Taikomos Pagrindinio įvado B dalyje nurodytos sąlygos, nors stengiamasi, kad drėgmė siektų 50–60 %.

1.4.1.3. *Gyvūnų paruošimas*

Sveiki jauni subrendę gyvūnai pasirinktinai suskirstomi į kontrolinę bei bandomąją grupes. Narvai pastatomi taip, kad būtų kuo labiau sumažintas aplinkos poveikis, susijęs su narvų išdėstymu. Kiekvienas gyvūnas turi savo identifikacijos ženklą. Prieš pradedant bandymą, gyvūnams leidžiama aklimatizuotis prie laboratorinių sąlygų mažiausiai 5 dienas.

1.4.1.4. *Bandomosios medžiagos paruošimas*

Kietosios bandomosios cheminės medžiagos ištirpinamos arba suspenduojamos atitinkamuose tirpikliuose ar nešikliuose ir prireikus praskiedžiamos prieš duodant gyvūnams. Skystos bandomosios medžiagos dozuojamos iš karto arba prieš tai praskiedžiamos. Naudojami švieži bandomosios medžiagos preparatai, nebent duomenys apie medžiagos stabilumą rodo, kad ją galima laikyti.

1.4.2. **Bandymo sąlygos**

1.4.2.1. *Tirpiklis/nešiklis*

Naudojamos tirpiklio ar nešiklio dozės neturėtų kelti jokio toksinio poveikio ir neturėtų kilti spėlionių, kad jis gali chemiškai reaguoti su bandomąja medžiaga. Jeigu naudojami kiti, mažiau žinomi tirpikliai ir (arba) nešikliai, reikia pateikti jų tinkamumą įrodančius duomenis. Jei yra įmanoma, tai pirmiausia rekomenduojama naudoti vandeninį tirpiklį arba nešiklį.

▼C1

1.4.2.2. *Kontroliniai mėginiai*

Atliekant kiekvieną nepriklausomą eksperimento dalį, vienu metu turi būti naudojami teigiami ir neigiami (tirpiklis/nešiklis) kontroliniai mėginiai.. Kontrolinės grupės gyvūnai turi būti laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip ir bandomieji gyvūnai, tik jie neveikiami bandomąja medžiaga.

Teigiami kontroliniai mėginiai turi būti žinomos medžiagos, sukeliančios nenumatytą DNR sintezę, kai jos duodamos tokia doze, kuri, kaip tikimasi, užgoš lengvai nustatomą pašalinį foną. Kai naudojamos vidutinį atsaką sukeliančios dozės, tai reikia naudoti teigiamus kontrolinius mėginius, kuriems yra būtina metabolinė aktyvacija (4). Dozės turi būti taip parenkamos, kad gaunami poveikiai būtų aiškūs, bet tyrėjas negalėtų iškart dešifruoti užkoduotus objektinius stiklelius. Teigiamoms kontrolinėms medžiagoms priklauso:

Mėginių paėmimo laikas	Medžiaga	CAS Nr.	Einecs Nr.
Ankstyvasis mėginių paėmimas (2–4 valandos)	N-nitrozodimetilaminas	62–75–9	200–249–8
Vėlyvasis mėginių paėmimas (12–16 valandų)	N-2-fluorenilacetamidas (2-AAF)	53–96–3	200–188–6

Kitos atitinkamos teigiamos kontrolinės medžiagos irgi gali būti naudojamos. Priimtina, kad teigiama kontrolinė medžiaga duodama kitu būdu nei bandomoji medžiaga.

1.5. BANDYMO ATLIKIMO METODIKA

1.5.1. **Gyvūnų skaičius ir lytis**

Atsižvelgiant į tiriamojo atsako natūraliąją biologinę variaciją, reikia panaudoti tinkamą gyvūnų skaičių. Kiekvienoje grupėje turi būti mažiausiai 3 bandomieji gyvūnai. Jei yra didelė anksčiau atliktų bandymų duomenų bazė, tai vienu metu naudojamose teigiamose ir neigiamose kontrolinėse grupėse turi būti tik po 1 ar 2 gyvūnus.

Jei bandymo metu galima gauti anksčiau atliktų bandymų, kuriems naudota ta pati gyvūnų rūšis ir tas pats veikimo bandomąja medžiaga būdas, duomenų, kurie rodo, kad toksiškumas abiems lytims nelabai skiriasi, užtenka ištirti vienos lyties gyvūnus, geriausia patinus. Jeigu žmogaus sąlytis su bandomąja medžiaga priklauso nuo lyties, pvz., kai kurių farmakologiškai aktyvių medžiagų atveju, reikia ištirti atitinkamos lyties gyvūną.

1.5.2. **Veikimo tvarkaraštis**

Paprastai bandomosios medžiagos duodamos tik vieną kartą.

1.5.3. **Dozės dydžiai**

Paprastai naudojami 2 dozės dydžiai. Didžiausia doze laikoma dozė, kuri sukelia tokius toksiškumo požymius, kad pagal tą pačią seką duodama didesnė dozė būtų mirtina. Apskritai, žemesnioji dozė turi sudaryti nuo 25 % iki 50 % didesniosios dozės.

▼C1

Medžiagos, pasižyminčios specifiniu biologiniu aktyvumu, kai jų dozės būna mažos ir netoksiškos (pavyzdžiui tokios kaip hormonai ir mitogenai) gali būti laikomos išimtimi, kai joms taikomi dozę nustatantys kriterijai ir tada jos tiriamos kiekvienu atveju atskirai. Jeigu nėra tinkamų duomenų ir tuo tikslu atliekama intervalo paieška, tai ji atliekama toje pačioje laboratorijoje, panaudojant tos pačios rūšies veislės ir lyties gyvūnus bei tą patį veikimo būdą kaip ir pagrindinio bandymo metu.

Didžiausia dozė taip pat gali būti apibrėžiama kaip dozė, kurią davus, kepenyse pasireiškia kai kurie toksiškumo požymiai (pavyzdžiui, piknotiniai branduoliai).

1.5.4. **Ribinis bandymas**

Jei atlikus bandymą su bent viena 2 000 mg/kg kūno masės dydžio doze, kuri duota per vieną arba du kartus tą pačia dieną, nepastebima jokio toksinio poveikio bei, remiantis struktūriškai panašių cheminių medžiagų tyrimų duomenimis, genotoksinis poveikis nenumatomas, viso bandymo atlikti gali nereikėti. Atsižvelgiant į numatomą žmogaus sąlytį su medžiaga, gali reikėti atlikti ribinį bandymą su didesne doze.

1.5.5. **Dozių davimas**

Bandomoji medžiaga yra paprastai duodama priverstinai maitinant per vamzdelį, įstatant jį į skrandį, tinkamai įvedant kanulę per vamzdelį. Bandomąją medžiagą galima įvesti ir kitais būdais, jei jie yra pagrindžiami. Tačiau įvedimas į pilvo ertmę nerekomenduojamas, nes bandomoji medžiaga gali tiesiogiai paveikti kepenis per cirkuliacinę sistemą. Maksimalus skysčio, priverstinai duodamo per vamzdelį arba injekuojamo į pilvą vienu metu, tūris priklauso nuo bandomojo gyvūno dydžio. Tūris neturi viršyti 2 ml/100 g kūno masės. Didesnių nei šitų tūrių davimas turi būti pagrindžiamas. Išskyrus dirginančias ar ėsdinančias medžiagas, kurių didesnės koncentracijos sukelia labai sunkų poveikį, bandomosios medžiagos tūrio kitimas turi būti sumažinamas iki minimumo, koncentraciją taip sureguliuojant, kad esant visiems dozės lygiams, tūris būtų pastovus.

1.5.6. **Kepenų ląstelių paruošimas**

Kepenų ląstelės yra paruošiamos paimant jas iš gyvūnų, paveiktų bandomąja medžiaga, po dozės davimo praėjus 12–16 valandų. Paprastai reikia paimti papildomą mėginį (po veikimo medžiaga praėjus 2–4 valandoms), nebent po 12–16 valandų laikotarpiu buvo gautas aiškus teigiamas atsakas. Tačiau mėginius paimti galima ir kitu metu, kuris pagrindžiamas, remiantis toksikokinetinių bandymų duomenimis.

Perleidžiant kolagenazę per kepenis *in situ* ir sudarant sąlygas naujai disocijavusioms kepenų ląstelėms pačioms prisitvirtinti prie tinkamo paviršiaus, gaunamos žinduolių kepenų ląstelių trumpalaikės kultūros. Neigiamų kontrolinių gyvūnų kepenų ląstelių gyvybingumas mažiausiai turi siekti 50 %.

1.5.7. **Nenumatytos DNR sintezės (NDS) nustatymas**

Šviežiai išskirtos žinduolių kepenų ląstelės paprastai inkubuojamos terpėje, turinčioje 3H žymėto timidino atitinkamam laikui (pavyzdžiui, nuo 3 iki 8 valandų). Baigiantis inkubacijai, terpė turi būti atskiriama nuo ląstelių, kurios vėliau gali būti inkubuojamos terpėje, turinčioje nežymėto timidino perteklių tam, kad sumažėtų neįsijungusio timidino radioaktyvumas (vadinamasis „šaltasis persekiojimas“). Po inkubacijos ląstelės plaunamos, fiksuojamos bei džiovinamos. Jei inkubacija užtrunka ilgiau, tai nežymėto timidino perteklius terpėje nėra būtinas. Objektiniai stikleliai pamerkiami į autoradiografinę emulsiją, eksponuojami tamsoje (pvz., laikant šaldytuve 7–14 dienų), išryškinami, dažomi ir skaičiuojamos sidabro granulės, susidariusios ekspozicijos metu. Iš kiekvieno gyvūno paimtų mėginių paruošiama nuo 2 iki 3 stiklelių.

▼C1

1.5.8. **Analizė**

Ląstelės, esančios paruoštuose objektiniuose stikleliuose, turi pasižymėti normaliomis morfologinėmis ypatybėmis tam, kad būtų galima įvertinti svarbią neplanuotą DNR sintezę. Preparatai tiriami mikroskopu, ieškant akivaizdžių toksiškumo požymių (pavyzdžiui, piknotinių branduolių arba sumažėjusio įvestos žymės radioaktyvumo).

Prieš skaičiuojant granules, objektiniai stikleliai užkoduojami. Normaliai kiekvieno gyvūno atveju 2 objektiniuose stikleliuose įvertinama 100 ląstelių. Jei kiekvieno gyvūno atveju įvertinama mažiau nei 100 ląstelių, tai šitai pagrindžiama. Granulės neskaičiuojamos branduoliuose, jei ląstelės yra S fazėje, tačiau reikia nurodyti ląstelių, esančių S fazėje, skaičių.

^{3}H žymėto timidino įjungimas į morfologiškai normalių ląstelių branduolius bei citoplazmą, įvertinamas pagal sidabro granulių sankaupas, turi būti tiriamas atitinkamais metodais.

Granulių skaičius yra nustatomas virš branduolio (branduolio granulės, BG) ir nukleoplazminiai ploteliai nustatomi virš citoplazmos (citoplazminės granulės, CG). CG skaičius nustatomas matuojant labiausiai pažymėtą citoplazmos plotą, arba, išvedant dviejų ar trijų atsitiktinių citoplazminių granulių, esančių prie branduolio, skaičiavimų rezultatų vidurkį. Kiti skaičiavimo metodai (pvz. visų ląstelių suskaičiavimas) gali būti naudojami, jei naudojimą galima pagrįsti (6).

2. **DUOMENYS**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Turi būti pateikiami duomenys apie kiekvieną objektinį stiklelį bei tirtą gyvūną. Be to, visi duomenys pateikiami apibendrintai, lentelių forma. Grynasis branduolio granulių (GBG) skaičius nustatomas kiekvienoje ląstelėje, kiekvieno gyvūno ląstelėse bei kiekvienos dozės ar laiko intervalo atveju, iš branduolio granulių (BG) skaičiaus atimant citoplazminių granulių (CG) skaičių. Jei skaičiuojamos ląstelės, kuriose vyksta „reparacija“, tai kriterijai, taikomi šioms ląstelėms apibūdinti, turi būti pagrindžiami bei remtis anksčiau gautais neigiamų kontrolinių mėginių tyrimo duomenimis. Rezultatai, pateikiami skaičiais, gali būti vertinami statistiniais metodais. Jei atliekami statistiniai tyrimai, tai prieš pradedant bandymą, jie turi būti pasirinkti bei pagrindžiami.

2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Teigiamų/neigiamų atsakų kriterijų pavyzdžiai:

teigiami
- i) GBG vertės yra aukščiau nustatyto slenkstinio lygio, kuris pagrindžiamas, remiantis anksčiau laboratorijoje gautais duomenimis; arba
- ii) GBG vertės yra žymiai didesnės už kontrolinio mėginio, naudojamo tuo pačiu metu, vertę;

neigiami
- i) GBG vertės atitinka arba yra mažesnės už anksčiau naudoto kontrolinio mėginio slenkstinį lygį; arba
- ii) GBG vertės yra nežymiai didesnės už kontrolinio mėginio, naudojamo tuo pačiu metu, vertę.

▼C1

Reikia aptarti duomenų biologinę vertę: atsižvelgiama į tokius parametrus, kaip variacija tarp atskirų gyvūnų, dozės ir atsako tarpusavio ryšys bei citotoksiškumas. Tačiau statistinė svarba neturėtų būti vieninteliu faktoriumi, apsprendžiančiu, ar atsakas teigiamas ar ne.

Nors daugumos eksperimentų metu buvo gauti aiškiai teigiami ar neigiami rezultatai, išimtiniais atvejais gautų rezultatų rinkinys neleis padaryti teisingos išvados apie bandomosios medžiagos aktyvumą. Rezultatai gali likti abejotini ar neaiškūs, nepriklausomai nuo atliktų eksperimentų skaičiaus.

Teigiami rezultatai, gauti tiriant neplanuotą DNR sintezę (NDS) žinduolių kepenų ląstelėse *in vivo*, rodo, kad bandomoji medžiaga sukelia DNR pažaidas žinduolių kepenų ląstelėse *in vivo*, o pažaidų reparacija vyksta neplanuotos DNR sintezės (NDS) metu *in vitro*. Neigiamas rezultatas rodo, kad esant bandymo sąlygoms, bandomoji medžiaga nesukelia DNR pažaidų, nustatomų šiuo bandymu.

Reikia aptarti tą galimybę, ar bandomoji medžiaga ar jos metabolitai pasieks bendrąją apytaką ar tik tikslinį audinį (pvz., sisteminio toksiškumo atveju)

3. **ATASKAITA**

BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikiama tokia informacija:

Tirpiklis/nešiklis:

— priežastys, dėl kurių buvo pasirinktas šis nešiklis,

— bandomosios cheminės medžiagos, esančios tirpiklyje/nešiklyje, tirpumas ir stabilumas, jei toks yra žinomas.

Bandomieji gyvūnai:

— panaudota rūšis ar veislė,

— gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,

— šaltinis, laikymo sąlygos, maitinimas ir pan.,

— kiekvieno gyvūno svoris prieš pradedant bandymą ir kiekvienos grupės svorio riba, vidurkiai bei standartinis nukrypimas.

Bandymo sąlygos:

— teigiami ir neigiami (tirpiklis/nešiklis) kontroliniai mėginiai,

— intervalo paieškos bandymo, jei jis buvo vykdomas, duomenys,

— pagrindinė priežastis, nulėmusi dozės dydžio pasirinkimą,

— duomenys apie bandomosios medžiagos paruošimą,

— duomenys apie bandomosios medžiagos davimą,

— pagrindinė priežastis, nulėmusi davimo būdo pasirinkimą,

— metodai, kuriais patvirtinama, kad bandomoji cheminė medžiaga pateko į bendrąją cirkuliaciją ar audinį, į kurį ji buvo nukreipta, jei tai įmanoma nurodyti,

▼C1

— tikrosios dozės (mg/kg kūno masės/parai) ir bandomosios medžiagos koncentracijos maiste/geriamajame vandenyje (ppm) perskaičiavimo į tikrąją dozę faktorius, jei naudojamas,

— duomenys apie pašarų ir geriamojo vandens kokybę,

— išsamus veikimo bandomąja medžiaga ir mėginio paėmimo tvarkaraščio aprašymas,

— metodai toksiškumui įvertinti,

— kepenų ląstelių paruošimo ir kultivavimo metodai,

— panaudotas autoradiografinis metodas,

— paruoštų objektinių stiklelių ir įvertintų ląstelių skaičius,

— įvertinimo kriterijai,

— teigiamų, neigiamų ar abejotinų bandymo rezultatų nustatymo kriterijai.

Rezultatai:

— kiekvieno objektinio stiklelio, gyvūno ir gyvūnų grupės branduolio granulių, citoplazminių granulių ir grynojo branduolio granulių skaičiaus vidutinės vertės,

— dozės ir atsako tarpusavio ryšys, jei tai įmanoma nurodyti,

— statistinės analizės, jei bet kokios buvo atliktos,

— toksiškumo požymiai,

— duomenys apie tuo pačiu metu naudotus neigiamus (tirpiklis/-nešiklis) ir teigiamus kontrolinius mėginius,

— anksčiau gauti duomenys apie neigiamus kontrolinius mėginius, nurodant intervalus, vidurkius ir standartinius nukrypimus,

— „ląstelių, kuriose vyksta reparacija“, skaičius, jeigu jis buvo nustatytas,

— ląstelių, esančių S fazėje skaičius, jeigu jis buvo nustatytas,

— ląstelių gyvybingumas.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

4. **NUORODOS**

1) Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G. (1985). An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. Mutation Res., 156, p. 1–18.

2) Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987). A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. Mutation Res. 189, p. 123–133.

3) Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I. de G. (1993). In Vivo Rat Liver UDS Assay. In: Kirkland D.J. and Fox M., (Eds) Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, p. 52–77.

▼C1

4) Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, h. (1993). Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and In *Vivo*. Mutation Res. 312, p. 263–285.

5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993). Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS). Mutation Res. 291, p. 21–27.

6) Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E. (1982). Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay. Environ. Mutagen, 4, p. 553–562.

▼C1

B.40. **ODOS SUARDYMAS *IN VITRO*. ODOS SLUOKSNIO ELEKTRINĖS VARŽOS (OSEV) BANDYMAS**

1. **METODAS**

Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 430 (2004).

1.1. ĮVADAS

Odos suardymu vadinamas negrįžtamas odos audinių pažeidimas po bandomosios medžiagos uždėjimo [kaip apibrėžta pagal Visuotinai suderintą cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo sistemą (*Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures*- GHS)] (1). Odos suardomumui įvertinti pagal šį metodą nenaudojami gyvi gyvūnai.

Odos suardomumas paprastai buvo įvertinamas naudojant laboratorinius gyvūnus (2). Peržiūrint B.4 bandymo metodą atsižvelgta į gyvūnams sukeliamas kančias ir skausmą, ir metodas pakoreguotas numatant *in vitro* metodus, taip gyvūnams nesukeliant skausmo ir kančių.

Pirmasis žingsnis reguliavimo tikslais apibrėžiant alternatyvius bandymus, kurie gali būti naudojami odos suardomumui bandyti, buvo pradiniai tinkamumo patvirtinimo bandymai (3). Vėliau buvo atliekamas oficialus odos suardymui įvertinti skirtų *in vitro* metodų (4)(5) tinkamumo patvirtinimas (6)(7)(8). Pagal šių bandymų rezultatus ir kitus paskelbtus duomenis (9), buvo pateikta rekomendacija, pagal kurią in *vitro* odos suardomumui įvertinti galėtų būti taikomi šie bandymai (9)(10)(11): žmogaus odos modelio bandymas (žr. *B. 40bis* bandymo metodą) ir odos sluoksnio elektrinės varžos bandymas (šis metodas).

Tinkamumo patvirtinimo ir kituose paskelbtuose bandymuose teigiama, kad žiurkių odos sluoksnio varžos (OSEV) bandymu (12)(13) galima patikimai atskirti žinomas odą suardančias ir odos nesuardančias medžiagas (5)(9).

Naudojant šiame metode aprašytą bandymą, galima nustatyti ardančias chemines medžiagas ir mišinius. Be to, galima nustatyti neardančias medžiagas ir mišinius, jei rezultatams patvirtinti išanalizuojama kita turima informacija (pvz., pH, struktūros ir aktyvumo santykių, žmonėms ir (arba) gyvūnams gautų duomenų) įrodomoji vertė (1)(2)(11)(14). Paprastai šiuo bandymu negaunama informacijos apie odos dirginimą ir nėra galimybės ardančias medžiagas suskirstyti į kategorijas, kaip tai leidžia daryti Visuotinai suderinta klasifikavimo sistema (GHS) (1).

Norint visiškai įvertinti vienkartinio odos veikimo vietinį poveikį odai, rekomenduojama taikyti nuosekliųjų bandymų strategiją, kuri pridedama prie B.4 bandymo metodo (2) ir numatyta Visuotinai suderintoje sistemoje (GHS) (1). Šią bandymo strategiją sudaro odos suardymo *in vitro* bandymai (kaip aprašyta šiame metode) ir odos dirginimo bandymai prieš sprendžiant klausimą dėl bandymų su gyvais gyvūnais.

▼C1

1.2. APIBRĖŽTYS

Odos suardymas *in vivo*: negrįžtamas odos pažeidimas; būtent, matomoji nekrozė per epidermį ir odos nekrozė po bandomosios medžiagos uždėjimo ne ilgiau kaip keturioms valandoms. Odos suardymo požymiai yra opos, kraujavimas, kruvini šašai ir, baigiantis 14 parų stebėjimo laikotarpiui, odos blukimas dėl jos išbalimo, visiškai nuplikusios vietos ir randai. Neaiškiems pažeidimams nustatyti reikėtų atlikti histopatologinį tyrimą.

Odos sluoksnio elektrinė varža (OSEV): pilnutinės odos elektrinės varžos matas, išreikštas varžos verte kiloomais. Paprastas ir patikimas metodas užtvaro funkcijai įvertinti, registruojant jonų praėjimą per odos sluoksnį Vitstono tiltelio aparato pagalba.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

1 lentelė

Etaloninės cheminės medžiagos

Pavadinimas	Einecs Nr.	CAS Nr.	
1,2-diaminopropanas	201–155–9	78–90–0	Labai ardanti
Akrilo rūgštis	201–177–9	79–10–7	Labai ardanti
2-tret-butilfenolis	201–807–2	88–18–6	Ardanti
Kalio hidroksidas (10 %)	215–181–3	1310–58–3	Ardanti
Sieros rūgštis (10 %)	231–639–5	7664–93–9	Ardanti
Oktano rūgštis (kaprilo rūgštis)	204–677–5	124–07–02	Ardanti
4-amino-1,2,4-triazolas	209–533–5	584–13–4	Neardanti
Eugenolis	202–589–1	97–53–0	Neardanti
Fenetilbromidas	203–130–8	103–63–9	Neardanti
Tetrachloretilenas	204–825–9	27–18–4	Neardanti
Izostearino rūgštis	250–178–0	30399–84–9	Neardanti
4-(metiltio)-benzaldehidas	222–365–7	3446–89–7	Neardanti

Didesnė dalis išvardytų medžiagų yra paimta iš ECVAM tarptautiniam tinkamumo patvirtinimo bandymui (4) atrinktų cheminių medžiagų sąrašo. Jų atranka pagrįsta šiais kriterijais:

i) vienodas ardančių ir neardančių medžiagų skaičius;

▼C1

ii) naudojamos prekyboje esančios medžiagos, kurios priklauso didesnei atitinkamų cheminių junginių klasių daliai;

iii) įtrauktos labai ardančios ir mažiau ardančios medžiagos, siekiant nustatyti ardomojo poveikio stiprumu pagrįstus skirtumus;

iv) pasirinktos cheminės medžiagos, su kuriomis būtų galima dirbti laboratorijoje, nesukeliant kitų rimtų, išskyrus odos suardymą, pavojų.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandomoji medžiaga uždedama ant odos diskų epidermio paviršiaus ne ilgiau kaip 24 h, kai diskai yra įdėti į dviejų kamerų bandymo sistemą, kurioje odos diskai šias kameras skiria. Imami humaniškai numarintų 28–30 parų amžiaus žiurkių odos diskai. Ardančios medžiagos nustatomos pagal jų gebą paveikti normalaus *stratum corneum* vientisumą ir užtvaro funkciją, kuri matuojama kaip OSEV sumažėjimas mažiau ribinės vertės (12). Nustatant žiurkių OSEV, buvo pasirinkta ribinė 5 kΩ vertė, pagrįsta dideliu kiekiu duomenų apie labai įvairias chemines medžiagas, pagal kuriuos didžioji dauguma verčių buvo aiškiai didesnės (dažnai > 10 kΩ) arba gerokai mažesnės (dažnai < 3 kΩ) už šią vertę (12). Paprastai medžiagos, kurios gyvūnams nėra ardančios, bet yra dirginančios arba nedirginančios, nesumažina OSEV iki vertės, mažesnės už šią ribinę vertę. Be to, naudojant kitus odos preparatus arba kitą įrangą, ribinė vertė gali pasikeisti, todėl reikėtų atlikti papildomą tinkamumo įvertinimą.

Bandymo procedūros dalį sudaro dažiklio surišimo pakopa, atliekant patvirtinamąjį OSEV teigiamų rezultatų, įskaitant vertes apie 5 kΩ, bandymą. Dažiklio surišimo pakopoje nustatoma, ar jonų pralaidumas padidėja dėl fizinio *stratum corneum* suardymo. Buvo įrodyta, kad OSEV metodu naudojant žiurkių odą galima numatyti *in vivo* odos suardomumą bandyme su triušiais, įvertinamą pagal B.4 bandymo metodą (2). Reikia pažymėti, kad *in vivo* bandymas su triušiais labai mažina odos suardomumo ir odos dirginimo duomenis palyginti su žmonių odos lopinėlio bandymu (15).

1.5. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.5.1. **Gyvūnai**

Pasirinktoji rūšis yra žiurkės, nes šiame bandyme jų odos jautrumas cheminėms medžiagoms buvo įrodytas anksčiau (10). Amžius (kai paimama oda) ir žiurkių veislė yra ypač svarbi užtikrinant, kad plaukų folikulai būtų ramybės būsenoje prieš suaugusių plaukų augimo pradžią.

▼C1

Jaunų, maždaug 22 parų amžiaus patinų arba patelių (*Wistar* arba panašios veislės žiurkių) nugaros ir šonų plaukai atsargiai nukerpami mažomis žirklėmis. Gyvūnai plaunami atsargiai trinant nukirptą plotą panardintą į antibiotiko tirpalą (kurio sudėtyje yra, pvz., streptomicino, penicilino, chloramfenikolio ir amfotericino, kurių koncentracijos pakaktų bakterijų augimui slopinti). Trečią arba ketvirtą dieną po pirmo plovimo gyvūnai dar kartą plaunami antibiotikais ir panaudojami per 3 dienas po antro plovimo, kai *stratum corneum* atsigauna po plaukų kirpimo.

1.5.2. **Odos diskų paruošimas**

Gyvūnai humaniškai numarinami, kai jie yra 28–30 dienų amžiaus; šis amžius yra ribinis. Nudiriama kiekvieno gyvūno oda nuo gyvūno nugaros ir šonų ir pašalinami pertekliniai poodiniai riebalai, juos atsargiai nuskutant nuo odos. Išpjaunami odos diskai, kurių kiekvieno skersmuo maždaug 20 mm. Odą diskų gamybai galima laikyti ir panaudoti vėliau, jei įrodoma, kad teigiamų ir neigiamų kontrolinių bandymų duomenys atitinka duomenis, gautus su ką tik paruošta oda.

Kiekvienas odos diskas dedamas ant vieno PTFE (politetrafluoretileno) vamzdelio galo, užtikrinant, kad epidermio paviršius liestųsi su vamzdeliu. Ant vamzdelio galo užspaudžiamas žiedinis tarpiklis odos žiedui nejudamai laikyti, o audinio perteklius apkarpomas. Vamzdelio ir žiedinio tarpiklio matmenys pateikti 2 paveiksle. Žiedinis tarpiklis ir PTFE vamzdelis kruopščiai užsandarinami vazelinu. Spyruokliniu spaustuku vamzdelis tvirtinamas rinktuvo kameroje su $MgSO_4$ tirpalu (154 mmol/l) (1 paveikslas). Odos diskas turi būti visiškai panardintas į $MgSO_4$ tirpalą. Iš vienos žiurkės odos galima pagaminti 10–15 odos diskų.

Prieš pradedant bandymą matuojama dviejų odos diskų elektrinė varža, kaip kiekvieno gyvūno odos kokybės kontrolės procedūros dalis. Abiejų diskų varža turi būti didesnė kaip 10 κΩ, kad likusius diskus būtų galima naudoti bandymui. Jei varžos vertė yra mažesnė kaip 10 κΩ, kiti iš tos odos pagaminti diskai išmetami.

1.5.3. **Bandomosios ir kontrolinės medžiagų uždėjimas**

Siekiant užtikrinti tinkamą bandymo modelio veikimą, kiekvienas bandymas turi būti vykdomas lygiagrečiai atliekant kontrolinius teigiamus ir neigiamus bandymus. Turi būti naudojami vieno gyvūno odos diskai. Rekomenduojamos teigiamo ir neigiamo kontrolinių bandymų medžiagos yra 10 mol/l vandenilio chlorido rūgštis ir distiliuotas vanduo.

Skystos bandomosios medžiagos (150 µl) tolygiai užpilamos ant epidermio sluoksnio vamzdelio viduje. Kai tiriamos kietos medžiagos, ant disko tolygiai uždedamas pakankamas kietos medžiagos kiekis, kad būtų padengtas visas epidermio paviršius. Ant kietos medžiagos viršaus užpilama dejonizuoto vandens (150 µl) ir vamzdelis nestipriai pakratomas. Siekiant pasiekti didžiausią įmanomą sąlytį su oda, kietas medžiagas gali tekti pašildyti iki 30 °C, kad bandomoji medžiaga išsilydytų arba suminkštėtų, arba sumalti į granules arba miltelius.

▼C1

Kiekvienai bandomajai ir kontrolinei medžiagai naudojami trys odos diskai. Bandomoji medžiaga uždedama 24 h esant 20–23 °C. Bandomoji medžiaga pašalinama plaunant ją ne didesnės kaip 30 °C temperatūros vandentiekio vandens srove tol, kol daugiau medžiagos nebeįmanoma pašalinti.

1.5.4. **OSEV matavimai**

Odos pilnutinė varža matuojama kaip OSEV, išmatuota naudojant žemos įtampos, kintamosios srovės Vitstono tiltelį (13). Bendrosios tiltelio specifikacijos: 1–3 V darbinė įtampa, sinusinė arba stačiakampio formos kintamoji 50–1 000 Hz srovė ir bent 0,1–30 kΩ matavimo intervalas. Tinkamumo patvirtinimo matavimams naudojamas tiltelis matuoja induktyvumą, talpą ir varžą iki 2 000 h, 2 000 μF ir 2 MΩ, esant 100 Hz arba 1 kHz dažniui, ir naudojant nuoseklaus arba lygiagretaus jungimo vertes. Atliekant suardomumo bandymo OSEV matavimus, užrašoma varža, esant 100 Hz dažniui ir naudojant nuoseklaus jungimo vertes. Prieš matuojant elektrinę varžą odos paviršiaus įtemptis sumažinama įpilant epidermiui padengti pakankamą tūrį 70 % etanolio. Po kelių sekundžių etanolis iš vamzdelio pašalinamas ir audinys drėkinamas įpilant 3 ml $MgSO_4$ tirpalo (154 mmol/l). Tiltelio elektrodai dedami iš abiejų odos disko pusių jo varžai kΩ išmatuoti (1 paveikslas). Elektrodų matmenys ir elektrodų ilgiai žemiau dantytų spaustukų pateikti 2 paveiksle. Spaustukas, prijungtas prie vidinio elektrodo, matuojant varžą remiasi į PTFE vamzdelio viršų, siekiant užtikrinti, kad reikiama elektrodo dalis būtų įmerkta į $MgSO_4$ tirpalą. Išorinis elektrodas įstatomas į rinktuvo kamerą taip, kad jis remtųsi į kameros dugną. Užtikrinamas nekintamas atstumas tarp spyruoklinio spaustuko ir PTFE vamzdelio dugno (2 paveikslas), kadangi šis atstumas turi įtakos gautai varžos vertei. Dėl tos pačios priežasties atstumas tarp vidinio elektrodo ir odos disko turi būti pastovus ir kiek įmanoma mažesnis (1–2 mm).

Jei išmatuota varžos vertė yra didesnė kaip 20 kΩ, tai gali būti dėl bandomosios medžiagos likučių, dengiančių odos disko epidermio paviršių. Galima mėginti dar kartą pašalinti šią dangą, pvz., užkimšti PTFE vamzdelio angą pirštinėtu nykščiu ir purtyti maždaug 10 s; $MgSO_4$ tirpalas išpilamas ir varža dar kartą matuojama, įpylus naujo $MgSO_4$ tirpalo.

Bandymo aparato savybės bei matmenys ir taikoma matavimo procedūra gali turėti įtakos gautoms OSEV vertėms. 5 kΩ ardymo ribinė vertė buvo nustatyta pagal duomenis, gautus naudojant šiame metode aprašytą konkretų aparatą ir procedūrą. Gali būti taikomos kitos ribinės ir kontrolinės vertės, jei pakinta bandymo sąlygos arba naudojamas kitas aparatas. Taigi metodą ir varžos ribines vertes būtina kalibruoti, bandant eilę etalonų, pasirinktų iš tinkamumo patvirtinimo bandyme naudotų cheminių medžiagų (4) (5), arba iš medžiagų, kurių klasė atitinka bandomų cheminių medžiagų klasę. Tinkamų etaloninių cheminių medžiagų rinkinys pateiktas 1 lentelėje.

▼C1

1.5.5. **Dažiklio surišimo metodai**

Veikiant tam tikroms neardančioms medžiagoms varža gali sumažėti iki mažesnės kaip ribinė 5 κΩ vertė, todėl jonai galėtų prasiskverbti per *stratum corneum* ir todėl mažėtų elektrinė varža (5). Pvz., neutraliosios organinės medžiagos ir paviršinio aktyvumo savybių turinčios cheminės medžiagos (įskaitant ploviklius, emulsiklius ir kitas paviršinio aktyvumo medžiagas) gali pašalinti odos riebalus, todėl užtvaras tampa pralaidesnis jonams. Taigi, jei nėra akivaizdžių odos pažeidimų, o bandomųjų medžiagų OSEV vertės yra mažesnės kaip 5 κΩ arba arti šios vertės, turi būti atliekamas kontrolinių bandinių ir apdorotų audinių dažiklio skverbties įvertinimas, siekiant nustatyti, ar gautos OSEV vertės buvo padidėjusio odos pralaidumo ar odos suardymo rezultatas (3)(5). Pastaruoju atveju, kai įtrūksta *stratum corneum*, ant odos paviršiaus uždėtas sulforodamino B dažiklis greitai skverbiasi ir nudažo apačioje esantį audinį. Šis konkretus dažiklis yra atsparus daugeliui įvairių cheminių medžiagų, ir jo neveikia toliau aprašyta ekstrahavimo procedūra.

1.5.5.1. *Sulforodamino B dažiklio uždėjimas ir pašalinimas*

Po OSEV įvertinimo magnio sulfatas išpilamas iš vamzdelio ir oda kruopščiai apžiūrima, ieškant akivaizdžių jos pažeidimų. Jei nėra akivaizdžių didesnių pažeidimų, sulforodamino B dažiklio (rūgščiojo raudonojo 52; C.I. 45100; Einecs numeris 222–529–8; CAS numeris 3520–42–1), 150 μl 10 % (m/V) tirpalo distiliuotame vandenyje užpilama ant kiekvieno disko epidermio paviršiaus 2 valandoms. Vėliau šie odos diskai maždaug 10 s plaunami kambario temperatūros vandentiekio vandeniu dažiklio pertekliui/-nesuristam dažikliui pašalinti. Kiekvienas odos diskas atsargiai išimamas iš PTFE vamzdelio ir įdedamas į buteliuką (pvz., 20 ml stiklinį scintiliacinį buteliuką) su dejonizuotu vandeniu (8 ml). Indai nestipriai kratomi 5 min., kad būtų pašalintas likęs nesuristas dažiklio kiekis. Ši plovimo procedūra kartojama, odos diskai išimami ir įdedami į indus su 30 % (m/V) natrio dodecilsulfato tirpalo distiliuotame vandenyje ir inkubuojami per naktį esant 60 °C.

Po inkubavimo kiekvienas diskas išimamas ir išmetamas, o likęs tirpalas centrifuguojamas 8 min 21 °C temperatūroje (santykinė išcentrinė jėga ~175 × g). 1 ml tirpalo virš nuosėdų skiedžiamas penkis kartus (V/V) [t. y. 1 ml + 4 ml] 30 % (m/V) natrio dodecilsulfato tirpalu distiliuotame vandenyje. Tirpalo optinis tankis matuojamas esant 565 nm bangos ilgiui.

1.5.5.2. *Dažiklio kiekio apskaičiavimas*

Sulforodamino B dažiklio kiekis vienam diskui apskaičiuojamas pagal optinio tankio vertes (5) (sulforodamino B dažiklio molinis ekstinkcijos koeficientas = $8{,}7 \times l0^4$, esant 565 nm; molekulinė masė = 580). Dažiklio kiekis ant kiekvieno disko nustatomas, naudojant atitinkamą kalibravimo kreivę, vėliau apskaičiuojamas kartotinių bandinių vidutinis dažiklio kiekis.

2. **DUOMENYS**

Bandomajai medžiagai, be to, teigiamiems ir neigiamiems kontroliniams bandiniams gautos varžos vertės (κΩ) ir vidutinės dažiklio kiekio vertės (μg/diskui), jei tinka, pateikiamos lentelėse (atskirų bandymų duomenys ir vidutinė vertė ± standartinis nuokrypis), įskaitant lygiagrečių/kartotinių bandymų rezultatus, vidurkius ir atskiras vertes.

▼C1

2.1. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Vidutiniai OSEV rezultatai yra priimtini, jei bandymo laboratorijoje lygiagrečiai atliekamų teigiamų ir neigiamų kontrolinių bandymų vertės patenka į metodui priimtinus intervalus. Priimtini varžos intervalai, taikant pirmiau aprašytą metodą ir aparatūrą, pateikti šioje lentelėje:

Kontrolinis bandymas	Medžiaga	Varžos intervalas (κΩ)
Teigiamas	10 mol/l druskos rūgštis	0,5–1,0
Neigiamas	Distiliuotas vanduo	10–25

Vidutiniai dažiklio surišimo rezultatai yra priimtini, jei lygiagrečios kontrolinių bandymų vertės patenka į metodui priimtinus intervalus. Rekomenduojami kontrolinėms medžiagoms priimtini dažiklio kiekio intervalai, taikant pirmiau aprašytą metodą ir aparatūrą, pateikti toliau:

Kontrolinis bandymas	Medžiaga	Dažiklio kiekio intervalas (μg/diskas)
Teigiamas	10 mol/l druskos rūgštis	40–100
Neigiamas	Distiliuotas vanduo	15–35

Laikoma, kad bandomoji medžiaga neardo odos:

i) jei bandomosios medžiagos OSEV vidutinė vertė yra didesnė kaip 5 κΩ, arba

ii) OSEV vidutinė vertė yra lygi 5 κΩ arba mažesnė kaip 5 κΩ, ir

— odos diske nematyti akivaizdžių pažeidimų, ir

— vidutinis dažiklio ant disko kiekis yra gerokai mažesnis už vidutinį dažiklio ant disko kiekį, gautą lygiagrečiai atliekant teigiamą kontrolinį bandymą su 10 mol/l HCl.

Laikoma, kad bandomoji medžiaga ardo odą:

i) jei OSEV vidurkis yra 5 κΩ arba mažesnis kaip 5 κΩ, ir odos diskas yra akivaizdžiai pažeistas, arba

ii) OSEV vidurkis yra lygus 5 κΩ arba mažesnis kaip 5 κΩ, ir

— odos diske nematyti akivaizdžių pažeidimų, bet

— vidutinis dažiklio ant disko kiekis yra lygus vidutiniam dažiklio ant disko kiekiui, gautam lygiagrečiai atliekant teigiamą kontrolinį bandymą su 10 mol/l HCl, arba didesnis.

▼C1

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta tokia informacija:

Bandomoji ir kontrolinė medžiagos:

— cheminis (-iai) pavadinimas (-ai), pvz., IUPAC arba CAS pavadinimas, ir CAS numeris, jei žinomas,

— medžiagos arba preparato grynumas ir sudėtis (masės procentine (-ėmis) dalimi (-is), fizinė prigimtis,

— fizikinės ir cheminės savybės, pvz., fizikinė būsena, pH, stabilumas, tirpumas vandenyje, svarbios atliekamam bandymui,

— bandomosios ir(arba) kontrolinės medžiagų apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas),

— stabilumas, jei žinomas.

Bandomieji gyvūnai:

— naudota rūšis ir lytis,

— gyvūnų amžius, kai paimama jų oda,

— šaltinis, laikymo sąlygos, šėrimas ir t.t.,

— išsami informacija apie odos paruošimą.

Bandymo sąlygos:

— bandymo aparato kalibravimo kreivės,

— kalibravimo kreivės, skirtos dažiklio surišimo bandymui,

— OSEV matavimams naudojama išsami informacija apie bandymų procedūrą,

— dažiklio surišimo įvertinimui naudojama išsami informacija apie bandymų procedūrą; jei taikoma,

— visų bandymo procedūrų pakeitimų aprašymas,

— taikytų vertinimo kriterijų aprašymas.

Rezultatai:

— lentelėse pateikti OSEV ir dažiklio surišimo bandymo (jei taikoma) duomenys pagal atskirus gyvūnus ir atskirus odos bandinius,

— visų pastebėtų reiškinių aprašymas.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

4. **NUORODOS**

1) OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

▼C1

2) Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/Corrosion.

3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, p. 219–255.

4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. in Vitro 12, p. 471–482.

5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, h.-G., and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. in Vitro 12, p. 483–524.

6) OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, p. 62.

7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem. J.H., Bruner. L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder. R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski. D., Spielmann, h., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, p. 129–147.

8) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97–3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf

9) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, p. 275–280.

10) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02–4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

11) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st–2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

12) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C. (1986). An *in vitro* skin corrosivity test -modificationsand validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, p. 507–512.

▼C1

13) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J., and Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test *in vitro*: results of an inter-laboratory trial. Toxic. in Vitro 6, p. 191–194.

14) Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: p. 709–720.

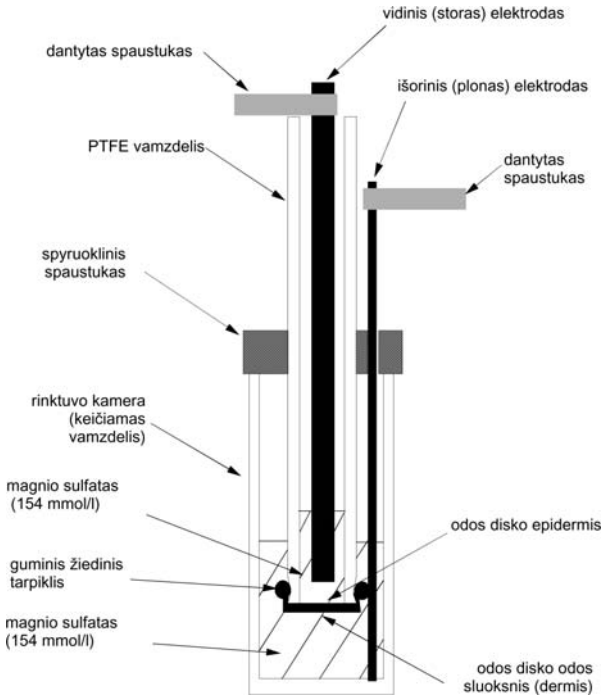
15) Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, h.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. Fd. Chem. Toxicol. 35, p. 845–852.

16) Oliver G.J.A, Pemberton M.A and Rhodes C. (1988). An In Vitro model for identifying skin-corrosive chemicals. I. Initial Validation. Toxic. in Vitro. 2, p. 7–17.

▼C1

1 paveikslas

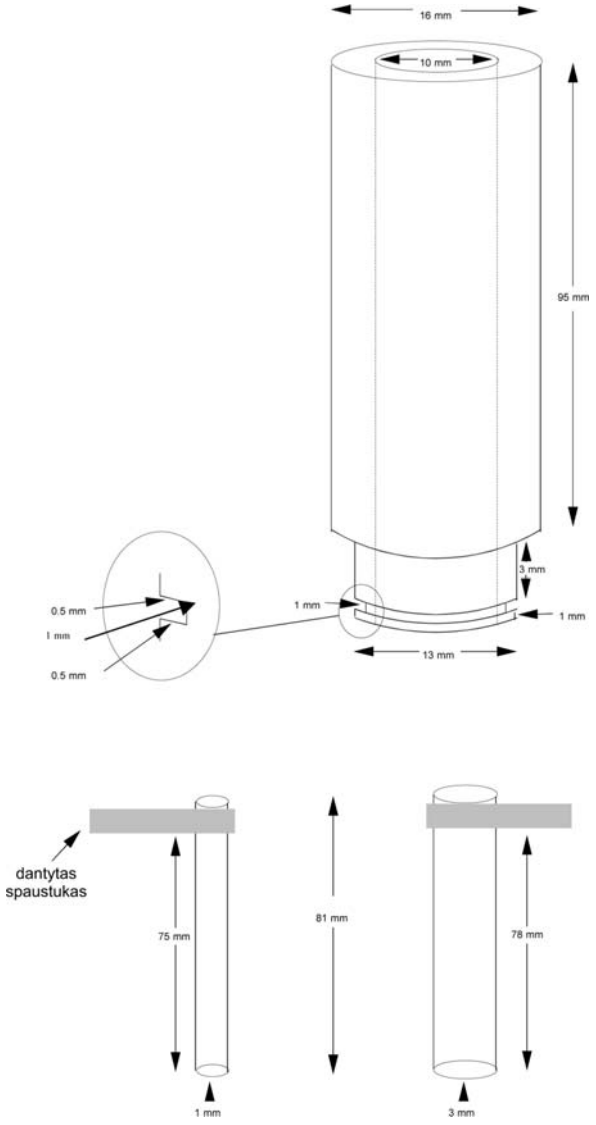
Žiurkių odos OSEV bandymo aparatas



▼C1

2 paveikslas

Politetrafluoretileno (PFTE) ir rinktuvo vamzdelių bei naudojamų elektrodų matmenys



▼C1

Viršuje pavaizduoto aparato svarbiausi parametrai:

— PTFE vamzdelio vidinis skersmuo,

— elektrodų ir PTFE bei rinktuvo vamzdelių ilgio santykis turi būti toks, kad elektrodai neliestų odos disko ir standartinio ilgio elektrodo atkarpa būtų panardinta į $MgSO_4$ tirpalą,

— $MgSO_4$ tirpalo tūris rinktuvo vamzdelyje turi užtikrinti 1 paveiksle parodytą skysčio lygių rinktuvo ir PTFE vamzdeliuose santykį,

— odos diskas turėtų būti pakankamai tvirtai pritvirtintas prie PTFE vamzdelio, kad elektrinės varžos rodmuo būtų tikrasis odos savybių matas.

▼C1

B.40 bis. **ODOS SUARDYMAS *IN VITRO*. ŽMOGAUS ODOS MODELIO BANDYMAS**

1. **METODAS**

Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 431 (2004).

1.1. ĮVADAS

Odos suardymu vadinamas negrįžtamas odos audinių pažeidimas po bandomosios medžiagos uždėjimo [kaip apibrėžta pagal Visuotinai suderintą cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo sistemą (*Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures*– GHS)] (1). Odos suardomumui įvertinti pagal šį metodą nenaudojami gyvi gyvūnai arba jų audiniai.

Odos suardomumas paprastai buvo įvertinamas naudojant laboratorinius gyvūnus (2). Peržiūrint B.4 bandymo metodą atsižvelgta į gyvūnams sukeliamas kančias ir skausmą, ir metodas pakoreguotas numatant *in vitro* metodus, taip gyvūnams nesukeliant skausmo ir kančių.

Pirmasis žingsnis reguliavimo tikslais apibrėžiant alternatyvius bandymus, kurie gali būti naudojami odos suardomumui bandyti, buvo pradiniai tinkamumo patvirtinimo bandymai (3). Vėliau buvo atliekamas oficialus odos suardymui įvertinti skirtų *in vitro* metodų (4) (5) tinkamumo patvirtinimas (6) (7) (8). Pagal šių bandymų rezultatus ir kitus paskelbtus duomenis (9), buvo pateikta rekomendacija, pagal kurią *in vitro* odos suardomumui įvertinti galėtų būti taikomi šie bandymai (10) (11) (12) (13): žmogaus odos modelio bandymas (šis metodas) ir odos sluoksnio elektrinės varžos bandymas (žr. B.40 bandymo metodą).

Tinkamumo patvirtinimo bandymų metu gauta duomenų, kad bandymais, kuriuose naudojami žmogaus odos modeliai (3) (4) (5) (9), galima patikimai atskirti žinomas odą suardančias ir odos nesuardančias medžiagas. Be to, pagal bandymo protokolą galima gauti smarkiai odą suardančių ir mažiau suardančių medžiagų skirtumo rodmenį.

Naudojant šiame metode aprašytą bandymą, galima nustatyti ardančias chemines medžiagas ir mišinius. Be to, galima nustatyti neardančias medžiagas ir mišinius, jei rezultatams patvirtinti išanalizuojama kita turima informacija (pvz., pH, struktūros ir aktyvumo santykių, žmonėms ir (arba) gyvūnams gautų duomenų) įrodomoji vertė (1) (2) (13) (14). Paprastai šiuo bandymu negaunama reikiamos informacijos apie odos dirginimą ir nėra galimybės ardančias medžiagas suskirstyti į kategorijas, kaip tai leidžia daryti Visuotinai suderinta klasifikavimo sistema (GHS) (1).

Norint visapusiškai įvertinti vienkartinio odos veikimo vietinį poveikį odai, rekomenduojama taikyti nuosekliųjų bandymų strategiją, kuri pridedama prie B.4 bandymo metodo (2) ir numatyta Visuotinai suderintoje klasifikavimo sistemoje (GHS) (1). Šią bandymo strategiją sudaro odos suardymo *in vitro* bandymai (kaip aprašyta šiame metode) ir odos dirginimo bandymai prieš sprendžiant klausimą dėl bandymų su gyvais gyvūnais.

▼C1

1.2. APIBRĖŽTYS

Odos suardymas *in vivo* – negrįžtamas odos pažeidimas; būtent, matoma epidermio ir tikrosios odos (dermio) nekrozė praėjus ne daugiau kaip keturioms valandoms po bandomosios medžiagos uždėjimo. Tipiniai suardymo požymiai: opos, kraujavimas, kruvini šašai ir, baigiantis 14 parų stebėjimo laikotarpiui, odos blukimas dėl jos išbalimo, visiškai nuplikusios vietos ir randai. Neaiškūs pažeidimai turėtų būti vertinami pasitelkiant histopatologinį tyrimą.

Ląstelių gyvybingumas – parametras suminiam ląstelių populiacijos aktyvumui matuoti (pvz., ląstelių mitochondrinių dehidrogenazių geba redukuoti vitalinį dažiklį MTT), kuris, atsižvelgiant į galutinį matuojamą dydį ir taikomą bandymo schemą, yra susijęs su suminiu ląstelių kiekiu ir (arba) jų gyvybingumu.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

1 lentelė

Etaloninės cheminės medžiagos

Pavadinimas	Einecs Nr.	CAS Nr.	
1,2-diaminopropanas	201–155–9	78–90–0	Labai ardanti
Akrilo rūgštis	201–177–9	79–10–7	Labai ardanti
2-tret-butilfenolis	201–807–2	88–18–6	Ardanti
Kalio hidroksidas (10 %)	215–181–3	1310–58–3	Ardanti
Sieros rūgštis (10 %)	231–639–5	7664–93–9	Ardanti
Oktano rūgštis (kaprilo rūgštis)	204–677–5	124–07–02	Ardanti
4-amino-1,2,4-triazolas	209–533–5	584–13–4	Neardanti
Eugenolis	202–589–1	97–53–0	Neardanti
Fenetilbromidas	203–130–8	103–63–9	Neardanti
Tetrachloretilenas	204–825–9	27–18–4	Neardanti
Izostearino rūgštis	250–178–0	30399–84–9	Neardanti
4-(metiltio)-benzaldehidas	222–365–7	3446–89–7	Neardanti

Didesnė išvardytų medžiagų dalis yra įtraukta į ECVAM tarptautiniam tinkamumo patvirtinimo bandymui (4) atrinktų cheminių medžiagų sąrašą. Jų atranka pagrįsta šiais kriterijais:

i) vienodas ardančių ir neardančių medžiagų skaičius;

ii) naudojamos prekyboje esančios medžiagos, kurios priklauso didesnei atitinkamų cheminių junginių klasių daliai;

iii) siekiant nustatyti ardomojo poveikio stiprumu pagrįstus skirtumus, įtrauktos labai ardančios ir mažiau ardančios medžiagos;

▼C1

iv) pasirinktos tokios cheminės medžiagos, su kuriomis būtų galima dirbti laboratorijoje nesukeliant kitų rimtų, išskyrus odos suardymą, pavojų.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandomoji cheminė medžiaga uždedama ant trijų matmenų žmogaus odos modelio, kurį sudaro bent jau rekonstruotas epidermis ir funkcionalus *stratum corneum*. Ardančios medžiagos nustatomos pagal jų sugebėjimą po tam tikro veikimo laikotarpio sumažinti ląstelių gyvybingumą [nustatomą, pvz., taikant MTT redukavimo bandymą (15)] iki lygio, kuris būtų mažesnis už apibrėžtą ribinį lygį. Žmogaus odos modelio bandymas pagrįstas hipoteze, kad ardančios cheminės medžiagos gali prasiskverbti per *stratum corneum* difuzijos arba suardymo būdu ir yra citotoksiškos po juo esančių sluoksnių ląstelėms.

1.4.1. **Bandymo eiga**

1.4.1.1. *Žmogaus odos modeliai*

Žmogaus odos modelius galima pasigaminti arba pirkti (pvz., EpiDerm™ ir EPISKIN™ modelius) (16) (17) (18) (19) arba sukurti ar pasigaminti bandymų laboratorijoje (20) (21). Pripažįstama, kad naudojant žmogaus odą būtina atsižvelgti į nacionalinius ir tarptautinius etinius aspektus bei sąlygas. Turi būti patvirtintas visų naujų modelių tinkamumas (bent tokiu mastu, kuris aprašytas 1.4.1.1.2). Šiam bandymui naudojami žmogaus odos modeliai turi atitikti šias sąlygas:

1.4.1.1.1. Bendrosios modeliui taikomos sąlygos

Epiteliui sukurti turi būti naudojami žmogaus keratinocitai. Po funkcionaliu *stratum corneum* turi būti daugybiniai gyvybingų epitelio ląstelių sluoksniai. Be to, odos modelis gali turėti stromos komponentų sluoksnį. *Stratum corneum* turi būti daugiasluoksnis ir turėti būtinąjį riebalinį profilį, kad susidarytų pakankamai tvirtas funkcionalus užtvaras, per kurį negalėtų greitai prasiskverbti citotoksiniai markeriai. Modelio sulaikomosios savybės turi neleisti medžiagai apeiti *stratum corneum* ir patekti į gyvybingąjį audinį. Jei bandomosios medžiagos galėtų apeiti *stratum corneum*, odos veikimo medžiaga modeliavimas būtų netinkamas. Odos modelis neturi būti užterštas bakterijomis (įskaitant mikoplazmą) arba grybeliais.

1.4.1.1.2. Funkcinės modeliui taikomos sąlygos

Gyvybingumas paprastai kiekybiškai įvertinamas naudojant MTT arba kitus medžiagų apykaitoje dalyvaujančius vitalinius dažiklius. Šiais atvejais iš neigiamo kontrolinio bandinio audinio ekstrahuoto (ištirpinto) dažiklio optinis tankis turi būti bent 20 kartų didesnis už vien tik ekstrahavimo tirpiklio optinį tankį [apžvalga pateikta (22)]. Neigiamo kontrolinio bandinio audinys turi būti patvarus kultūroje (užtikrinti panašius gyvybingumo matavimus) visą bandomojo veikimo trukmę. *Stratum corneum* turi būti pakankamai tvirtas, kad galėtų atsispirti greitai cheminių citotoksinių markerių (pvz., 1 % Triton X-100) skverbčiai. Šią savybę galima įvertinti veikimo trukme, per kurią ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % (ET_{50}) (pvz., EpiDerm™ ir EPISKIN™ modeliams šis laikas > 2 h). Turi būti aišku, kad audinys geba atsikurti laikui bėgant, ir, pageidautina, skirtingose laboratorijose. Be to, jis turi padėti nustatyti etaloninių cheminių medžiagų ardomojo poveikio stiprumą (žr. 1 lentelę), kai tokios medžiagos naudojamos pagal pasirinktą bandymo protokolą.

▼C1

1.4.1.2. *Bandomosios ir kontrolinės medžiagų uždėjimas*

Kiekvienam apdorojimui (veikimo trukmei) naudojami du kartotiniai audinio bandiniai, įskaitant kontrolinius bandinius. Tiriant skystąsias medžiagas, naudojamos bandomosios medžiagos kiekio turi pakakti tolygiam odos paviršiaus padengimui medžiaga, kurios reikėtų naudoti ne mažiau kaip 25 $\mu L/cm^2$. Jei bandomos kietosios medžiagos, turi būti uždedamas pakankamas medžiagos kiekis odos paviršiui tolygiai uždengti, ją reikėtų sudrėkinti dejonizuotu arba distiliuotu vandeniu geram sąlyčiui su oda užtikrinti. Prireikus kietosios medžiagos prieš naudojimą sumalamos į miltelius. Paviršiaus padengimo metodas turi būti tinkamas bandomajai medžiagai (žr. pvz., 5 nuorodą). Pasibaigus veikimo laikotarpiui, bandomoji medžiaga turi būti kruopščiai nuplauta nuo odos paviršiaus su atitinkamu buferiniu tirpalu arba 0,9 % NaCl.

Norint užtikrinti adekvačias eksperimentinio modelio charakteristikas, kiekvienam bandymui naudojami lygiagretūs teigiami ir neigiami kontroliniai bandiniai. Rekomenduojamos teigiamų kontrolinių bandinių medžiagos yra ledinė acto rūgštis arba 8 mol/l KOH. Rekomenduojamos neigiamų kontrolinių bandinių medžiagos yra 0,9 % NaCl arba vanduo.

1.4.1.3. *Ląstelių gyvybingumo matavimai*

Ląstelių gyvybingumas matuojamas tik naudojantis patvirtintais kiekybiniais metodais. Be to, naudojamas gyvybingumo matavimo metodas turi tikti naudojamai trijų matmenų audinio konstrukcijai matuoti. Nespecifinis dažiklių surišimas turi netrukdyti gyvybingumo matavimui. Todėl baltymais surišami dažikliai ir medžiagų apykaitoje nedalyvaujantys dažikliai netinka (tarkim, neutralusis raudonasis). Dažniausiai naudojamas MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolinio bromido, tiazolilo mėlynojo, Einecs numeris 206–069–5, CAS numeris 298–93–1)] redukavimo bandymas, kuriuo, kaip buvo įrodyta, gaunami tikslūs ir atkuriami rezultatai (5), tačiau galima naudoti kitus dažiklius. Esant reikiamai inkubacijos temperatūrai, odos bandinys 3 h įdedamas į atitinkamos koncentracijos MTT tirpalą (pvz., 0,3–1 mg/ml). Mėlynos formazano nuosėdos ekstrahuojamos tirpikliu (izopropanoliu) ir formazano koncentracija nustatoma matuojant optinį tankį, kai bangos ilgis yra nuo 540 iki 595 nm.

Bandomosios medžiagos cheminis vitalinio dažiklio veikimas gali būti panašus į medžiagų apykaitą ląstelėse, todėl būtų gautas klaidingas gyvybingumo įvertis. Buvo įrodyta, kad taip atsitinka, kai tokia bandomoji medžiaga nėra visiškai nuplaunama nuo odos (9). Jei bandomoji medžiaga tiesiogiai veikia vitalinį dažiklį, turi būti naudojami papildomi kontroliniai bandiniai, skirti bandomųjų medžiagų trukdžiams nustatyti ir gyvybingumo matavimo pataisoms padaryti (9) (23).

2. **DUOMENYS**

Kiekvienam audiniui lentelėse pateikiamos optinio tankio vertės ir apskaičiuotos ląstelių gyvybingumo procentinės vertės, gautos bandomajai medžiagai ir teigiamiems bei neigiamiems kontroliniams bandiniams, įskaitant kartotinių bandymų, jei atliekami, duomenis, vidutines ir atskiras vertes.

▼C1

2.1. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Kiekvieno bandomojo bandinio gautos optinio tankio vertės gali būti naudojamos nustatant gyvybingumo procentinę dalį lyginant su neigiamais kontroliniais bandiniais, kurių gyvybingumo vertė pagal susitarimą prilyginama 100 %. Ribinė ląstelių gyvybingumo procentinės dalies vertė, skirianti ardančias ir neardančias bandomąsias medžiagas (arba skirtingas ar suardymo savybių klases), arba statistinė (-ės) procedūra (-os), taikyta (-os) rezultatams įvertinti ir ardančioms medžiagoms nustatyti, turi būti aiškiai apibrėžtos ir patvirtintos dokumentais, be to turi būti įrodytas jų tinkamumas. Apskritai, šios ribinės vertės yra nustatytos optimizuojant bandymą, patikrintos pradinio tinkamumo patvirtinimo etapu ir patvirtintos atliekant tinkamumo patvirtinimo bandymą. Kaip pavyzdys, pateikiama suardymo savybių prognozė, taikant EpiDerm™ modelį (9):

laikoma, kad bandomoji medžiaga suardo odą:

i) jei po 3 min. veikimo odos gyvybingumas yra mažesnis kaip 50 %, arba

ii) jei po 3 min. veikimo gyvybingumas yra lygus 50 % arba didesnis, bet po 1 h veikimo gyvybingumas yra mažesnis kaip 15 %.

Laikoma, kad bandomoji medžiaga neardo odos:

i) jei po 3 min. veikimo gyvybingumas yra lygus 50 % arba didesnis ir po 1 h veikimo gyvybingumas yra lygus 15 % arba didesnis.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti ši informacija:

bandomoji ir kontrolinė medžiagos:

— cheminis (-iai) pavadinimas (-ai), pvz., IUPAC arba CAS pavadinimas, CAS numeris, jei žinomas;

— medžiagos arba preparato grynumas ir sudėtis (masės procentinė (-ės) dalis (-ys));

— fizikinės ir cheminės savybės, pvz., fizikinė būsena, pH, stabilumas, tirpumas vandenyje, svarbios atliekamam bandymui:

— bandomųjų/kontrolinių medžiagų apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);

— stabilumas, jei žinomas.

Naudoto odos modelio ir protokolo pagrindimas.

Bandymo sąlygos:

— naudota ląstelių sistema;

— informacija apie matavimo prietaiso (pvz., spektrofotometro), naudoto ląstelių gyvybingumui matuoti, kalibravimą;

▼C1

— visa konkretų odos modelį patvirtinanti informacija, įskaitant jo tinkamumą;

— išsami informacija apie taikytą bandymo procedūrą;

— naudotos bandomosios dozės;

— visų bandymo procedūros pakeitimų aprašymas;

— nuoroda į anksčiau gautus duomenis apie modelį;

— taikytų vertinimo kriterijų aprašymas.

Rezultatai:

— atskirų bandinių duomenys, suvesti į lenteles;

— kitų pastebėtų reiškinių aprašymas.

Rezultatų aptarimas.

Išvada.

4. **NUORODOS**

1) OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

2) Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/Corrosion.

3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23, p. 219–255.

4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. In Vitro 12, p. 471–482.

5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, h.G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. In Vitro 12, p. 483–524.

6) OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, p. 62.

7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, h., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, p. 129–147.

8) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97–3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf.

▼C1

9) Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, h., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhutter, h.G. (2000). The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. ATLA 28, p. 371–401.

10) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275–280.

11) ECVAM (2000). ECVAM News & Views. ATLA 28, 365–67.

12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02–4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

13) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st–2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

14) Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, p. 709–720.

15) Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity asssays. J.Immunol. Meth. 65, p. 55–63.

16) Cannon, C.L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxic. In Vitro 8, p. 889–891.

17) Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., 2000. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. International Journal of Pharmaceutics. 203, p. 211–225.

18) Tinois E, Gaetani Q, Gayraud B, Dupont D, Rougier A, Pouradier DX (1994). The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis in vitro. In In vitro Skin Toxicology. Edited by A Rougier, AM Goldberg and HI Maibach: p. 133–140.

19) Tinois E, Tiollier J, Gaucherand M, Dumas h, Tardy M, Thivolet J (1991). In vitro and post –transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. Experimental Cell Research 193: p. 310–319.

20) Parentau, N.L., Bilbo, P., Molte, C.J., Mason, V.S., and Rosenberg, h. (1992). The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. Cytotechnology 9, p. 163–171.

21) Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F., Parentau, N.L. (1994). Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. Biotechnology and Bioengineering 43/8, p. 747–756.

▼C1

22) Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regulation 5, p. 69–84.

23) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Rouget, R., and van de Sandt, J.J.M., and Botham, P.A. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. Toxic. InVitro 15, p. 57–93.

▼C1

B.41. **3T3 NRU FOTOKSIŠKUMO *IN VITRO* BANDYMAS**

1. **METODAS**

Šis metodas atitinka OECD TG 432 (2004).

1.1. ĮVADAS

Fototoksiškumas apibrėžiamas kaip toksinis atsakas į ant kūno uždėtą medžiagą, kuris atsiranda arba padidėja (tampa matomas esant mažesnėms dozėms) po to paveikus šviesa, arba kuris sukeliamas sisteminiu būdu davus medžiagos ir po to apšvietus odą.

3T3 NRU fototoksiškumo *in vitro* bandymas naudojamas bandomosios medžiagos fototoksiniam potencialui nustatyti, kuris atsiranda sužadinus medžiagą ją veikiant šviesa. Bandymu įvertinamas fotocitotoksiškumas, nustatant santykinį ląstelių gyvybingumo mažėjimą, kai jos veikiamos chemine medžiaga esant šviesai, palyginti su gyvybingumo mažėjimu tamsoje. Tikėtina, kad šiuo bandymu nustatytos medžiagos yra fototoksiškos *in vivo* po to, kai organizmas jomis buvo veikiamas sisteminiu būdu ir jos pateko į odą arba kai jomis veikiama konkreti odos vieta.

Apie daug cheminių medžiagų rūšių yra paskelbta, jog jos sukelia fototoksinį poveikį (1) (2) (3) (4). Visų jų bendra savybė – gebėjimas sugerti saulės šviesos bangų ilgio energiją. Pagal pirmąjį fotochemijos dėsnį (*Grotthaus-Draper* dėsnį) fotocheminei reakcijai vykti turi būti sugertas pakankamas šviesos kvantų kiekis. Taigi prieš planuojant biologinį bandymą, turi būti nustatytas bandomosios cheminės medžiagos UV/matomosios šviesos sugerties spektras pagal OECD bandymų rekomendaciją 101. Buvo padaryta prielaida, kad jei molinis ekstinkcijos/sugerties koeficientas yra mažesnis kaip 10 $l \times mol^{-1} \times cm^{-1}$, maža tikimybė, kad cheminė medžiaga yra fotochemiškai aktyvi. Tokių medžiagų nebūtina bandyti atliekant 3T3 NRU fototoksiškumo *in vitro* arba bet kurį kitą biologinį bandymą neigiamam fotocheminiam poveikiui nustatyti (1) (5). Taip pat žr. 1 priedėlį.

3T3 NRU fototoksiškumo *in vitro* bandymo patikimumas ir tinkamumas buvo įvertintas neseniai (6) (7) (8) (9). Buvo įrodyta, kad pagal 3T3 NRU fototoksiškumo *in vitro* bandymą galima prognozuoti ūmų fototoksinį poveikį gyvūnams ir žmonėms *in vivo*. Bandymas neskirtas kitokio pobūdžio žalingam poveikiui, kuris gali atsirasti kartu veikiant cheminei medžiagai ir šviesai, pvz., fotogenotoksiškumui, fotoalergijai arba fotokancerogeniškumui, nustatyti ir juo neįmanoma įvertinti fototoksinio potencialo. Be to, bandymas netinka, jei norima nustatyti netiesioginius fototoksiškumo mechanizmus, bandomosios medžiagos metabolitų poveikį arba mišinių poveikį.

Nors iš esmės reikalaujama, kad atliekant visus *in vitro* bandymus genotoksiniam ir kancerogeniniam potencialui prognozuoti, būtina naudoti metabolines sistemas, fototoksikologijoje iki šiol yra tik reti pavyzdžiai, kai medžiaga turi patirti metabolinį virsmą, kad *in vivo* arba *in vitro* ji veiktų kaip fototoksiška medžiaga. Todėl reikalavimas šį bandymą atlikti naudojant metabolinės aktyvacijos sistemą nėra laikomas būtinu arba moksliškai pagrįstu.

▼C1

1.2. APIBRĖŽTYS

Energinė apšvieta – ultravioletinės (UV) arba matomosios šviesos, krentančios ant paviršiaus, intensyvumas, išreiškiamas W/m^2 arba mW/cm^2.

Šviesos dozė – ultravioletinės (UV) arba matomosios šviesos, krentančios ant paviršiaus, kiekis (= intensyvumas × laikas), išreikštas J (= W × s) ploto vienetui, pvz., J/m^2 arba J/cm^2.

UV šviesos bangų juostos – TRK (*Tarptautinė apšvietimo komisija*) rekomendavo šiuos žymenis: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) ir UVC (100–280 nm). Be to, naudojami kiti žymenys; UVB ir UVA skiriamoji riba dažnai yra 320 nm, o UVA galima padalyti į UV-A1 ir UV-A2, skiriamąją ribą nustačius ties maždaug 340 nm.

Ląstelių gyvybingumas – suminio ląstelių populiacijos aktyvumo įvertinimo parametras (pvz., vitalinio neutraliojo raudonojo dažiklio sugėrimas ląstelių lizosomose), kuris, atsižvelgiant į galutinį matuojamą dydį ir taikomą bandymo schemą, yra susijęs su suminių ląstelių kiekiu ir (arba) jų gyvybingumu.

Santykinis ląstelių gyvybingumas – ląstelių gyvybingumas, palyginti su gyvybingumu, gautu naudojant neigiamus kontrolinius (nešiklio) bandinius, kuriems buvo taikoma visa bandymo procedūra (arba + Irr arba –Irr), tačiau jie nebuvo veikiami bandomąja chemine medžiaga.

FDF (fotodirginimo faktorius) – faktorius, išreiškiantis dviejų vienodai efektyvių bandomosios medžiagos citotoksinių koncentracijos verčių (IC_{50}), gautų nesant (–Irr) ir esant (+ Irr) necitotoksiniam švitinimui UVA/matomąja šviesa, santykį.

IC_{50} – bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 %.

VFE (vidutinis fotoefektas) – matmuo, nustatytas atliekant koncentracijos ir atsako kreivių, gautų nesant (–Irr) ir esant (+ Irr) necitotoksiniam švitinimui UVA/matomąja šviesa, matematinę analizę.

Fototoksiškumas – ūmus toksinis atsakas, kuris atsiranda, kai oda iš pradžių veikiama tam tikromis cheminėmis medžiagomis, o vėliau šviesa, arba kuris panašiai sukeliamas, kai oda apšvitinama po to, kai organizmui sisteminiu būdu buvo duodama bandomoji cheminė medžiaga.

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

3T3 NRU fototoksiškumo *in vitro* bandymas yra pagrįstas cheminės medžiagos citotoksiškumo lyginimu, kai ji bandoma, būdama apšvitinta modeliuojamos saulės šviesos necitotoksine doze, ir tamsoje. Šiame bandyme citotoksiškumas yra išreiškiamas kaip su koncentracija susijęs vitalinio neutraliojo raudonojo (NR) dažiklio sugėrimo mažėjimas, išmatuotas praėjus 24 h po veikimo chemine medžiaga ir švitinimo (10). NR yra silpnas katijoninis dažiklis, kuris ne difuzijos būdu lengvai prasiskverbia per ląstelių membranas, susikaupdamas ląstelių lizosomose. Dėl jautrių lizosomos membranų ląstelių paviršiaus pakitimų lizosomos darosi trapios, be to, vyksta kiti pakitimai, kurie laipsniškai tampa negrįžtamais. Dėl tokių ksenobiotikais sukeltų pakitimų mažėja NR sugėrimas ir surišimas. Taigi įmanoma atskirti gyvybingas, pažeistas arba žuvusias ląsteles, o tai yra šio bandymo pagrindas.

▼C1

Balb/c veislės pelių 3T3 ląstelės 24 h laikomos kultūroje monosluoksniui gauti. Iš pradžių kiekviena bandomoji medžiaga (8 skirtingų dydžių jos koncentracijos) 1 h inkubuojama dviejose 96 duobučių lėkšteles. Vėliau viena iš lėkštelių apšvitinama didžiausia doze, kuri nėra citotoksiška, o kita lėkštelė laikoma tamsoje. Tuomet abiejų lėkštelių apdorojimo terpė yra keičiama kultūros terpe ir dar po 24 h inkubavimo ląstelių gyvybingumas nustatomas, matuojant neutraliojo raudonojo sugėrimą. Ląstelių gyvybingumas išreiškiamas kaip procentinė neapdorotų tirpiklio kontrolinių bandinių gyvybingumo dalis ir apskaičiuojamas kiekvienai bandomajai koncentracijai. Fototoksiniam potencialui prognozuoti lyginami atsakai į skirtingas medžiagos, apšvitintos arba laikytos tamsoje, koncentracijas, kai lygis paprastai būna IC_{50}, t. y. toks kad ląstelių gyvybingumas sumažėja iki 50 % palyginti su neapdorotais kontroliniais bandiniais.

1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.4.1. **Paruošiamieji darbai**

1.4.1.1. *Ląstelės*

Atliekant tinkamumo patvirtinimo bandymą, buvo naudojama nepertraukiama pelių fibroblastų linija, Balb/c 3T3, 31 klonas, iš *American Type Culture Collection* (ATCC), Manassas, VA, JAV arba *European Collection of Cell Cultures* (ECACC), Salisbury, Wiltshire, JK, todėl rekomenduojama naudoti šias ląsteles, gautas iš reikalavimus atitinkančios ląstelių saugyklos. Pagal tą pačią bandymo procedūrą galima naudoti kitas ląsteles arba ląstelių linijas, jei kultivavimo sąlygos pritaikomos specifiniams ląstelių poreikiams, tačiau turi būti įrodytas lygiavertiškumas.

Ląstelės turi būti reguliariai tikrinamos, ar jos neužterštos mikoplazma, ir naudojamos tik jei jos visiškai nėra (11).

Svarbu, kad ląstelių jautrumas UV spinduliuotei būtų reguliariai tikrinamas pagal šiame metode aprašytą kokybės kontrolės procedūrą. Kadangi ląstelių jautrumas UVA gali padidėti didėjant persėjimų skaičiui, turėtų būti naudojamos mažiausio turimo persėjimų skaičiaus Balb/c 3T3 ląstelės, pageidautina mažesnio kaip 100 (žr. 1.4.2.2.2 skirsnį ir 2 priedėlį).

1.4.1.2. *Terpės ir auginimo sąlygos*

Įprastu būdu persėjant ląsteles ir atliekant bandymo procedūras, turi būti naudojama tinkama kultivavimo terpė ir paisoma inkubavimo sąlygų, pvz., Balb/c 3T3 ląstelių terpė yra DMEM (*Dulbecco 's Modified Eagle's Medium*), papildyta 10 % naujagimių veršelių serumu, 4 mmol/l glutamino, penicilinu (100 TV) ir streptomicinu (100 μg/ml); inkubuojama drėgnoje atmosferoje, esant 37 °C, o CO_2 kiekis siekia 5–7,5 %, priklausomai nuo buferinio tirpalo (žr. 1.4.1.4 skirsnio antrą pastraipą). Ypač svarbu, kad ląstelių kultivavimo sąlygos leistų užtikrinti ląstelių ciklo trukmę, kuri atitinka įprastą naudojamų ląstelių arba jų linijų gyvavimo laikotarpį

1.4.1.3. *Kultūrų ruošimas*

Užšaldytų pradinių kultūrų ląstelės sėjamos kultivavimo terpėje atitinkamu tankiu ir bent kartą persėjamos prieš jas naudojant 3T3 NRU fototoksinio poveikio *in vitro* bandyme.

▼C1

Fototoksiškumo bandymui naudojamos ląstelės sėjamos į kultivavimo terpę tokiu tankiu, kad pasibaigus bandymui, t. y. kai nustatomas gyvybingumas, praėjus 48 h po ląstelių pasėjimo, atskiros ląstelių kolonijos nesusilietų, Balb/c/3T3 linijos ląstelėms, kultivuojamoms 96 duobučių lėkštelėse, rekomenduojamas ląstelių tankis yra 1 × 10 ląstelių vienoje duobutėje.

Kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai skirtos ląstelės vienodai sėjamos į 2 atskiras 96 duobučių lėkšteles, kurios lygiagrečiai naudojamos visame bandyme, esant vienodoms kultivavimo sąlygoms, išskyrus laikotarpį, kai vienos lėkštelės ląstelės švitinamos (+ Irr), o kitos – laikomos tamsoje(-Irr).

1.4.1.4. *Bandomosios medžiagos ruošimas*

Bandomos cheminės medžiagos turi būti iš naujo ruošiamos prieš pradedant bandymą, išskyrus atvejus, kai turimi duomenys įrodo jų stabilumą laikymo sąlygomis. Rekomenduojama visus cheminės medžiagos paruošimo ir ląstelių pradinio apdorojimo darbus atlikti tokiomis apšvietimo sąlygomis, kuriomis prieš švitinimą būtų išvengta bandomosios medžiagos fotoaktyvinimo arba skilimo.

Bandomosios medžiagos ištirpinamos buferiniuose druskų tirpaluose, pvz., *Earle's Balanced Salt Solution* (EBSS), arba kituose fiziologiškai pusiausviruose buferiniuose tirpaluose, kuriuose neturi būti baltymų komponentų (pvz., pH indikatorinių dažiklių ir vitaminų), kad būtų išvengta trukdžių švitinant. Kadangi švitinamos ląstelės maždaug 50 min. laikomos ne CO_2 inkubatoriuje, reikia imtis priemonių šarmo koncentracijos didėjimui išvengti. Jei naudojami mažos talpos buferiniai tirpalai, pvz., EBSS, pH didėjimo išvengti galima, jei ląstelės inkubuojamos esant 7,5 % CO_2. Jei ląstelės inkubuojamos esant tik 5 % CO_2, reikėtų pasirinkti didesnės talpos buferinį tirpalą.

Cheminės medžiagos, kurių tirpumas vandenyje yra ribotas, turi būti tirpinamos atitinkamame tirpiklyje. Jei naudojamas tirpiklis, jo tūris visose kultivavimo terpėse, t. y. neigiamuose (tirpiklių) kontroliniuose bandiniuose ir visų bandomosios medžiagos koncentracijos verčių bandiniuose, turi būti vienodas, ir tirpiklis neturi būti citotoksiškas esant tokiai jo koncentracijai. Bandomosios medžiagos koncentracijos vertės pasirenkamos taip, kad nesusidarytų nuosėdos arba drumsti tirpalai.

Rekomenduojami tirpikliai yra dimetilsulfoksidas (DMSO) ir etanolis (ETOH). Gali tikti ir kiti mažai citotoksiniai tirpikliai. Prieš naudojant turi būti patikrintos visų tirpiklių konkrečios savybės, pvz., reagavimas su bandomąja medžiaga, fototoksinio poveikio slopinimas, radikalų sugavimo ir (arba) cheminio stabilumo tirpiklyje savybės.

Tirpinimui palengvinti galima naudoti sūkurinį ir (arba) ultragarsinį maišymą ir (arba) šildymą iki atitinkamos temperatūros, jei tai neturi įtakos bandomosios cheminės medžiagos stabilumui.

▼C1

1.4.1.5. *Švitinimo sąlygos*

1.4.1.5.1. Šviesos šaltinis

Tiriant medžiagų fototoksiškumą, tinkamo šviesos šaltinio bei šviesos filtrų pasirinkimas yra svarbiausias veiksnys. UVA bei matomosios šviesos sritys paprastai yra susijusios su fototoksinėmis reakcijomis *in vivo* (3) (12), o UVB sritis apskritai yra mažiau svarbi ir yra ypač citotoksinė; citotoksinės savybės stiprėja 1 000 kartų, jei bangos ilgis sumažėja nuo 313 iki 280 nm (13). Tarp tinkamo šviesos šaltinio pasirinkimo kriterijų turi būti reikalavimas, kad šviesos šaltinio spinduliuotė atitiktų bandomosios cheminės medžiagos sugeriamos spinduliuotės bangos ilgius (sugerties spektrą), o šviesos dozės (pasiekiamos per priimtiną veikimo trukmę) pakaktų žinomoms fototoksiškoms medžiagoms nustatyti. Be to, naudojami bangų ilgiai ir dozės neturi per daug kenkti bandymo sistemai, pvz., šilumos spinduliavimas (infraraudonoji sritis).

Manoma, kad optimalus būdas dirbtinei šviesai gauti yra saulės šviesos imitatoriai. Filtruojamojo saulės šviesos imitatoriaus švitinimo galios pasiskirstymas turi būti artimas (14) nurodytai dienos šviesai lauko sąlygomis. Saulės šviesos imitatoriuose naudojamos ksenono ir gyvsidabrinės metalų halogenidų (legiruotos) lempos (15). Pastarųjų privalumas – mažesnis spinduliuojamos šilumos kiekis, be to, jos yra pigesnės, tačiau ne taip tiksliai atitinka saulės šviesos spektrą palyginti su ksenono lempomis. Kadangi didelę visų saulės šviesos imitatorių spinduliuotės dalį sudaro UVB spinduliuotė, jie turi būti tinkamai filtruojami, kad susilpnintų labai citotoksinę UVB bangų ilgio spinduliuotę. Kadangi ląstelių kultūrai naudojamos plastikinės medžiagos turi UV stabilizatorių, spektras turi būti matuojamas per tokio paties, kaip ir bandyme naudojamo tipo 96 duobučių lėkštelės dangtį. Kad ir kokių būtų imamasi priemonių spektro dalims silpninti filtravimu ir nepaisant neišvengiamo įrangos filtruojamojo poveikio, šiuos filtrus praėjusios šviesos spektras neturi nukrypti nuo etaloninės dienos šviesos lauko sąlygomis (14). Filtruojamojo saulės šviesos imitatoriaus, naudojamo vykdant 3T3 NRU fototoksiškumo *in vitro* bandymo tinkamumo patvirtinimo bandymą, spinduliuotės spektro skirstinio pavyzdys pateiktas (8) (16). Taip pat žr. 2 priedėlio 1 paveikslą.

1.4.1.5.2. Dozimetrija

Šviesos intensyvumas (energinė apšvieta) turėtų būti reguliariai tikrinamas prieš kiekvieną fototoksiškumo bandymą, naudojant tinkamą plačiajuostį UV spinduliuotės matuoklį. Intensyvumas turi būti matuojamas per tokio paties, kaip ir bandyme naudojamo tipo 96 duobučių plokštelės dangtį. UV spinduliuotės matuoklis turi būti kalibruojamas pagal šviesos šaltinį. UV spinduliuotės matuoklio veikimą būtina tikrinti, ir šiam tikslui rekomenduojama naudoti antrą to paties tipo ir vienodo kalibravimo UV spinduliuotės matuoklį. Būtų geriausia, jei filtruojamo šviesos šaltinio spektrinei energinei apšvietai matuoti ir plačiajuosčio UV spinduliuotės matuoklio kalibravimui tikrinti kas tam tikrą ilgesnį laiko tarpą būtų naudojamas spektroradiometras.

Buvo nustatyta, kad 5 J/cm dozė (išmatuota UVA srityje) nėra citotoksiška Balb/c 3T3 ląstelėms ir jos pakanka sužadinti chemines medžiagas, kad būtų sukeltos fototoksinės reakcijos (6) (17), pvz., norint pasiekti 5 J/cm^2 per 50 min laikotarpį, nustatoma 1,7 mW/cm^2 energinė apšvieta. Žr. 2 priedėlio 2 paveikslą. Jei naudojama kita ląstelių linija arba skirtingas šviesos šaltinis, švitinimo dozę gali tekti kalibruoti taip, kad būtų galima pasirinkti tokį dozės režimą, kuris nebūtų kenksmingas ląstelėms, bet kuriuo gautos dozės pakaktų sužadinti etalonines fototoksines medžiagas. Šviesos trukmė apskaičiuojama taip:

▼C1

$$t(\text{min}) = \left(\frac{(\text{švitinimo dozė } (J \,/\, (cm)^2) \times 1\,000)}{(\text{energinė apšvieta } (mW \,/\, (cm)^2) \times 60)} \right) \quad (1\ \text{J} = 1\text{W} \times \text{s})$$

1.4.2. **Bandymo sąlygos**

1.4.2.1. *Bandomosios medžiagos koncentracijos vertės*

Cheminės medžiagos, bandomos šviesoje (+ Irr) ir tamsoje (-Irr), koncentracijos verčių intervalas turi būti tinkamai nustatytas dozės intervalo radimo bandymais. Gali būti naudinga nustatyti pradinį tirpumą ir po 60 min. (arba po tiek laiko, kiek skiriama veikimui medžiaga), kadangi tirpumas laikui bėgant arba švitinimo laikotarpiu gali pasikeisti. Siekiant išvengti toksinio poveikio, kurį sukelia netinkamos kultivavimo sąlygos arba labai šarminės arba rūgštinės cheminės medžiagos, ląstelių kultūrų pH vertės intervalas, pridėjus cheminės medžiagos, turėtų būti 6,5–7,8.

Didžiausia bandomosios medžiagos koncentracija turi atitikti fiziologines bandymo sąlygas, pvz., turėtų būti išvengta įtempimo, kurį sukelia osmozė ir pH. Nelygu, kokia yra bandomoji cheminė medžiaga, gali tekti atsižvelgti į kitas fizikines ir chemines savybes, pvz., į veiksnius, ribojančius didžiausią bandomąją koncentraciją. Palyginti mažai tirpios medžiagos, kurios nėra toksiškos iki pat soties koncentracijos, turėtų būti bandomos esant didžiausiai įmanomai koncentracijai. Apskritai turėtų būti išvengta bandomosios medžiagos nuosėdų susidarymo esant bet kuriai bandomajai koncentracijai. Didžiausia bandomosios medžiagos koncentracija neturėtų būti didesnė kaip 1 000 μg/ml; osmolingumas neturi būti didesnis kaip 10 mmol. Naudojamos 8 bandomosios medžiagos koncentracijos vertės, kurios, skiedžiamos pagal tą patį skiedimo faktorių, sudaro geometrinę progresiją (žr. 2.1 skirsnio antrąją pastraipą).

Jei yra informacijos (gautos intervalo radimo bandymu), kad atliekant bandymą tamsoje (-Irr) bandomoji cheminė medžiaga nėra citotoksiška iki pat ribinės koncentracijos, bet švitinama (+ Irr) yra labai citotoksiška, norint atitikti tinkamos duomenų kokybės reikalavimą, (+ Irr) ir (-Irr) bandymams pasirinktini koncentracijos intervalai gali skirtis.

1.4.2.2. *Kontroliniai bandiniai*

1.4.2.2.1. Ląstelių jautrumas spinduliuotei, ankstesnių bandymų duomenys

Turi būti reguliariai (maždaug kas penktą pasėjimą) tikrinamas ląstelių jautrumas šviesos šaltiniui, įvertinant jų gyvybingumą po veikimo didėjančiomis spinduliuotės dozėmis. Įvertinant turi būti naudojamos kelios spinduliuotės dozės, įskaitant tokias, kurios yra gerokai didesnės negu naudojama 3T3 NRU fototoksiškumo bandymui. Lengviausias šių dozių kiekybinio įvertinimo būdas – matuoti šviesos šaltinio UV spinduliuotės dalis. Ląstelės sėjamos tokiu tankumu, kuris naudojamas 3T3 NRU fototoksinio poveikio *in vitro* bandyme, ir apšvitinamos kitą dieną. Dar po dienos išmatuojamas ląstelių gyvybingumas, naudojant neutraliojo raudonojo sugėrimą. Turi būti įrodyta, kad gautos didžiausios necitotoksinės dozės (pvz., atliekant tinkamumo patvirtinimo bandymą: 5 J/cm [UVA]) pakanka etaloninėms cheminėms medžiagoms (1 lentelė) tinkamai klasifikuoti.

▼C1

1.4.2.2.2. Jautrumas spinduliuotei, atliekamų bandymų tikrinimas

Bandymas atitinka kokybės kriterijus, jei apšvitintiems neigiamiems/tirpiklio kontroliniams bandiniams gauta gyvybingumo vertė yra didesnė kaip 80 % palyginti su tamsoje laikomu neigiamu/tirpiklio kontroliniu bandiniu.

1.4.2.2.3. Tirpiklio kontrolinių bandinių ląstelių gyvybingumas

Iš tirpiklio kontrolinių bandinių ekstrahuoto neutraliojo raudonojo absoliutus optinis tankis (OD540NRU) rodo, ar vienoje duobutėje pasėtos 1×10^4 ląstelės augo dvi bandymo dienas esant normaliam dvigubėjimo laikui. Bandymas atitinka priimtinumo kriterijus, jei vidutinė neapdorotų kontrolinių bandinių OD540 Nru vertė yra > 0,4 (t. y. maždaug dvidešimt kartų didesnė už fonui naudojamo tirpiklio optinį tankį).

1.4.2.2.4. Teigiamas kontrolinis bandinys

Lygiagrečiai kiekvienam 3T3 NRU fototoksinio poveikio *in vitro* bandymui turi būti bandoma žinoma fototoksiška medžiaga. Rekomenduojamas chlorpromazinas (CPZ). CPZ bandant pagal etaloninį 3T3 NRU fototoksiškumo *in vitro* bandymo protokolą, buvo apibrėžti šie bandymo priimtinumo kriterijai: CPZ apšvitinus (+ Irr): IC50 = 0,1–2,0 μg/ml, CPZ tamsoje (-Irr): IC50 = 7,0– 90,0 μg/ml. Fotodirginimo faktorius (FDF) turėtų būti > 6. Turi būti stebimi anksčiau gauti teigiamo kontrolinio bandinio duomenys.

Vietoj chlorpromazino kaip lygiagrečiai bandomi teigiami kontroliniai bandiniai gali būti naudojamos kitos fototoksiškos medžiagos, tinkančios dėl cheminės medžiagos klasės arba tirpumo charakteristikų.

1.4.3. **Bandymo eiga (6) (7) (8) (16) (17)**

1.4.3.1. *1-oji diena*

Į kraštines 96 duobučių audinių kultūros mikrotitravimo lėkštelės duobutes įlašinama po 100 μl kultivavimo terpės (= tuštieji bandiniai). Į likusias duobutes įlašinama po 100 μl ląstelių suspensijos, kurios koncentracija 1 x 10^5 ląstelių/ml kultivavimo terpės (= 1 x 10^4 ląstelių/duobutei). Paruošiama po dvi lėkšteles kiekvienai bandomosios medžiagos koncentracijai, tirpikliui ir teigiamiems kontroliniams bandiniams.

Ląstelės inkubuojamos 24 h (žr. 1.4.1.2 skirsnį) tol, kol jos sudaro pusiau susiliejantį monosluoksnį. Per šį inkubavimo laikotarpį ląstelės atsigauna, prilimpa ir eksponentiškai didėja jų skaičius.

1.4.3.2. *2-oji diena*

Pasibaigus inkubavimui, kultivavimo terpė nupilama nuo ląstelių, kurios kruopščiai plaunamos 150 μl inkubavimui naudoto buferinio tirpalo. Įpilama 100 μl buferinio tirpalo, kuriame būtų tinkamos koncentracijos bandomoji cheminė medžiaga, arba tirpiklis (tirpiklio kontrolinis bandinys). Naudojamos 8 skirtingos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertės. Ląstelės su bandomąja medžiaga inkubuojamos tamsoje 60 min. (žr. 1.4.1.2 skirsnį ir 1.4.1.4 skirsnio antrąją pastraipą).

Iš dviejų lėkštelių, paruoštų kiekvienai bandomosios medžiagos koncentracijai ir kontroliniams bandiniams, viena atsitiktinai pasirenkama citotoksiškumui nustatyti (-Irr) (t. y. kontrolinė lėkštelė), o kita (apdorojamoji lėkštelė) – fototoksiškumui nustatyti (+ Irr).

▼C1

Esant kambario temperatūrai, ląstelės 50 min. veikiamos šviesa (+ Irr) per 96 duobučių lėkštelės dangtį, naudojant didžiausią dar necitotoksinę spinduliuotės dozę (taip pat žr. 2 priedėlį). Neapšviestos lėkštelės (-Irr) 50 min. (= veikimo šviesa trukmė) laikomos tamsioje dėžėje, esant kambario temperatūrai.

Bandomasis tirpalas nupilamas ir ląstelės kruopščiai du kartus plaunamos 150 µl inkubavimui naudoto buferinio tirpalo, kuriame nebūtų bandomosios medžiagos. Buferinis tirpalas keičiamas kultivavimo terpe ir ląstelės inkubuojamos (žr. 1.4.1.2 skirsnį.) per naktį (18–22 h).

1.4.3.3. *3-ioji diena*

1.4.3.3.1. Mikroskopinis tyrimas

Ląstelių augimas, morfologija ir monosluoksnio vientisumas turi būti ištirtas fazių kontrasto mikroskopu. Turi būti užrašyti ląstelių morfologiniai pokyčiai ir poveikis jų augimui.

1.4.3.3.2. Neutraliojo raudonojo dažiklio sugėrimo bandymas

Ląstelės plaunamos 150 µl iš anksto pašildyto buferinio tirpalo. Plovimo tirpalas pašalinamas atsargiai išleidžiant. Į terpę be serumo (16) įpilama 100 µl 50 µg/ml neutralaus raudonojo (NR) (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazino hidrochlorido, Einecs numeris 209–035–8; CAS numeris 553–24–2; C.I. 50040) ir 3 h inkubuojama, kaip aprašyta 1.4.1.2 skirsnyje. Po inkubavimo NR terpė pašalinama ir ląstelės plaunamos 150 µl buferinio tirpalo. Buferinio tirpalo perteklius pašalinamas nusausinant arba centrifuguojant.

Įpilama tiksliai 150 µl tirpalo NR desorbuoti (tik ką paruošto: 49 dalys vandens + 50 dalių etanolio + 1 dalis acto rūgšties).

Mikrotitravimo lėkštelė nestipriai purtoma 10 min. ant mikrotitravimo lėkštelės purtyklės tol, kol NR ekstrahuojamas iš ląstelių ir susidaro vienalytis tirpalas.

Spektrofotometru matuojamas NR ekstrakto optinis tankis esant 540 nm, palyginamuoju tirpalu naudojant tuščiuosius bandinius. Duomenys saugomi atitinkamo formato elektroninėje laikmenoje vėlesnei analizei.

2. **DUOMENYS**

2.1. DUOMENŲ KOKYBĖ IR KIEKYBĖ

Pagal bandymų duomenis turėtų būti įmanoma atlikti prasmingą koncentracijos ir atsako, gauto veikiant šviesa ir tamsoje, analizę ir, jei įmanoma, nustatyti bandomosios medžiagos koncentraciją, kuriai esant ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % (IC_{50}). Jei nustatomas citotoksiškumas, koncentracijos intervalas ir atskiros koncentracijos vertės turi būti parinktos tokiu būdu, kad sujungus bandymo duomenis būtų įmanoma gauti kreivę.

Aiškiai teigiamiems ir aiškiai neigiamiems rezultatams (žr. 2.3 skirsnio pirmąją pastraipą) gali pakakti pradinio bandymo, patvirtinto vienu pradiniu dozės intervalo radimo bandymu arba keliais bandymais.

▼C1

Dviprasmiški, ribiniai arba neaiškūs rezultatai turi būti išaiškinti atliekant papildomus bandymus (taip pat žr. 2.4 skirsnio antrą pastraipą). Tokiais atvejais reikėtų apsvarstyti galimybę keisti bandymo sąlygas. Bandymo sąlygos, kurias galima keisti – tai koncentracijos intervalas arba tarpai tarp jos verčių, pradinio inkubavimo trukmė ir švitinimo-veikimo trukmė. Vandenyje nepatvarioms medžiagoms labiau gali tikti trumpesnė veikimo trukmė.

2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS

Duomenims įvertinti galima apskaičiuoti fotodirginimo (PDF) arba vidutinį fotoefektą (VFE).

Fototoksiškumo matams apskaičiuoti (žr. toliau) atskirų koncentracijos ir atsako verčių aibė turi būti aproksimuojama nubrėžiant tinkamą tolydžią koncentracijos ir atsako kreivę (modelį). Kreivė pagal duomenis paprastai parenkama taikant netiesinės regresijos metodą (18). Norint įvertinti duomenų kintamumo įtaką parinktajai kreivei rekomenduojama taikyti savaiminio gerinimo (*bootstrap*) metodą.

Fotodirginimo faktorius (FDF) apskaičiuojamas taikant šią formulę:

$$PIF = \left(\frac{(IC_{50}(-Irr))}{(IC_{50}(+Irr))}\right)$$

Jei IC_{50} apšvietimo ir tamsos sąlygomis negalima apskaičiuoti, negalima nustatyti bandomosios medžiagos FDF. Vidutinis fotoefektas (VFE) yra pagrįstas visų koncentracijos ir atsako kreivių lyginimu (19). Jis apibrėžiamas kaip tipinių fotoefekto verčių rinkinio svertinis vidurkis

$$MPE = \left(\frac{\left(\sum_{i=1}^{n} w_i PE_{c_i}\right)}{\left(\sum_{i=1}^{n} w_i\right)}\right)$$

Kurią nors koncentraciją C atitinkantis fotoefektas PE_C apibrėžiamas kaip atsako RE_C ir dozės DE_C efektų sandauga, t. y. $PE_C = RE_C \times DE_C$. Atsako efektas RE_C yra atsakų, nustatomų tamsoje ir veikiant šviesa, skirtumas, t. y. $RE_C = R_C(\text{-Irr}) - R_C(+ \text{Irr})$. Dozės efektas apibrėžiamas lygtimi

$$DE_c = \left|\frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1}\right|$$

kurioje C* atitinka ekvivalentinę koncentraciją, t. y. koncentraciją, kuriai esant + Irr atsakas lygus -Irr atsakui, esant C koncentracijai. Jei C* negalima nustatyti todėl, kad + Irr kreivės atsako vertės yra sistemingai didesnės arba mažesnės už $R_C(\text{-Irr})$, dozės efektas prilyginamas 1. Svoriniai faktoriai w_i nustatomi pagal didžiausią atsako vertę, t. y. $W_i = MAX\{R_i(+ \text{Irr}), R_i(\text{-Irr})\}$. Koncentracijos verčių C_i tinklelis pasirenkamas taip, kad į kiekvieną koncentracijos verčių intervalą, apibrėžtą bandyme naudojamomis koncentracijos vertėmis, patektų vienodas taškų skaičius. VFE apskaičiuojamas pagal didžiausią koncentracijos vertę, kuriai esant bent viena iš dviejų kreivių vis dar rodo bent 10 % atsako vertę. Jei ši didžiausia koncentracija yra didesnė kaip + Irr bandyme naudojama didžiausia koncentracija, likusioji + Irr kreivės dalis nustatoma atsako vertei „0“. Atsižvelgiant į tai, ar VFE vertė yra didesnė arba ne didesnė už tinkamai pasirinkta ribinę vertę ($VFE_C = 0{,}15$), cheminė medžiaga klasifikuojama kaip fototoksiška.

▼C1

Programinės įrangos rinkinį, kuris naudojamas apskaičiuojant FDF ir VFE, galima rasti (20).

2.3. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Pagal tinkamumo patvirtinimo bandymo duomenis (8) prognozuojama, kad bandomoji medžiaga, kurios FDF < 2 arba VFE < 0,1, yra nefototoksinė. Kai 2 < FDF < 5 arba 0,1 < VFE < 0,15, prognozuojama: tikėtina, kad fototoksiška; o kai FDF > 5 arba VFE > 0,15, prognozuojama: fototoksiška.

Visos laboratorijos, pradedančios taikyti šį bandymą, iš pradžių turi išbandyti 1 lentelėje išvardytas etalonines medžiagas prieš pradėdamos bandyti bandomąsias medžiagas jų fototoksiškumui įvertinti. FDF arba VFE vertės turi būti artimos 1 lentelėje nurodytoms vertėms.

1 lentelė

Cheminis pavadinimas	Einecs Nr.	CAS Nr.	PDF	VFE	Sugerties maksimumas	Tirpiklis (1)
Amiodaronas HCl	243–293–2	[19774–82–4]	> 3,25	0,20–0,54	242 nm 300 nm (petys)	etanolis
Choloropromazina s HCl	200–701–3	[69–09–0]	> 14,4	0,33–0,63	309 nm	etanolis
Norfloksacinas	274–614–4	[70458–96–7]	> 71,6	0,34–0,90	316 nm	acetonitrilas
Antracenas	204–371–1	[120–12–7]	>18,5	0,19–0,81	356 nm	acetonitrilas
Protoporfirinas IX, dinatrio	256–815–9	[50865–01–5]	> 45,3	0,54–0,74	402 nm	etanolis
L-Histidinas		[7006–35–1]	nėra PDF	0,05–0,10	211 nm	vanduo
Heksacholorofenas	200–733–8	[70–30–4]	1,1–1,7	0,00–0,05	299 nm 317 nm (petys)	etanolis
Natrio laurilsulfatas	205–788–1	[151–21–3]	1,0–1,9	0,00–0,05	nesugeriama	vanduo

(1) Tirpiklis, naudotas sugerčiai matuoti.

2.4. DUOMENŲ AIŠKINIMAS

Jei fototoksiškumas stebimas tik esant didžiausiai bandomajai koncentracijai (ypač, vandenyje tirpių bandomųjų cheminių medžiagų), pavojui įvertinti gali reikėti papildomų analizės duomenų, pavyzdžiui, sugerties per odą, cheminės medžiagos kaupimosi odoje duomenų ir (arba) kitų bandymų duomenų, kaip antai cheminės medžiagos *in vitro* bandymų su gyvūnų arba žmonių oda arba su odos modeliais duomenų.

▼C1

Jei toksiškumas nenustatomas (+ Irr ir -Irr) ir jei blogas tirpumas riboja bandomosios koncentracijos vertes, gali būti suabejota bandomosios medžiagos tinkamumu bandyti šiuo metodu ir turėtų būti numatytas patvirtinamasis bandymas, naudojant, pvz., kitą modelį.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta bent tokia informacija:

Bandomoji medžiaga:

— tapatumas, įprasti bendrieji pavadinimai ir IUPAC pavadinimai bei CAS numeris, jei žinomas;

— fizikinė būsena ir grynumas;

— fizikinės ir cheminės savybės, svarbios atliekamam bandymui;

— UV/matomosios srities sugerties spektras;

— stabilumas ir fotocheminis stabilumas, jei žinomas.

Tirpiklis:

— tirpiklio pasirinkimo pagrindimas;

— bandomosios cheminės medžiagos tirpumas tirpiklyje;

— tirpiklio kiekio, esančio apdorojimo terpėje, procentinė dalis.

Ląstelės:

— ląstelių tipas ir šaltinis;

— mikoplazmos nebuvimo patvirtinimas;

— ląstelių sėjimų skaičius, jei žinomas;

— ląstelių jautrumas spinduliuotei, nustatytas švitinimo įranga, naudojama atliekant 3T3 NRU fototoksinio poveikio *in vitro* bandymą.

Bandymo sąlygos (1); *inkubacija prieš ir po apdorojimo*:

— kultivavimo terpės tipas ir sudėtis;

— inkubacijos sąlygos (CO_2 koncentracija, temperatūra, drėgmė);

— inkubacijos trukmė (prieš apdorojimą, po apdorojimo).

Bandymo sąlygos (2); *veikimas chemine medžiaga*:

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, kuri naudojama švitinant ir nešvitinant, pasirinkimo pagrindimas;

— riboto bandomosios cheminės medžiagos tirpumo atveju ir nesant citotoksiškumo: didžiausios bandytos koncentracijos pagrindimas;

— veikimo terpės tipas ir sudėtis (buferinis druskos tirpalas);

— veikimo chemine medžiaga trukmė.

Bandymo sąlygos (3); *švitinimas*:

— pasirinkto šviesos šaltinio pagrindimas;

▼C1

— šviesos šaltinio ir radiometro gamintojas ir tipas;

— šviesos šaltinio spektrinės energinės apšvietos charakteristikos;

— naudojamo (-ų) filtro (-ų) praleidimo ir sugerties charakteristikos;

— radiometro charakteristikos ir išsami informacija apie jo kalibravimą;

— šviesos šaltinio atstumas iki bandymo sistemos;

— UVA energinė apšvieta esant šiam atstumui, išreikšta mW/cm^2;

— švitinimo UV/matomąja šviesa trukmė;

— UVA dozė (energinė apšvieta laikas), išreikšta J/cm^2;

— švitinamų ląstelių kultūrų ir lygiagrečiai tamsoje laikomų ląstelių kultūrų temperatūra.

Bandymo sąlygos (4); *gyvybingumo bandymas, naudojant neutralųjį raudonąjį*:

— apdorojimo neutraliuoju raudonuoju terpės sudėtis;

— inkubavimo su neutraliuoju raudonuoju trukmė;

— inkubavimo sąlygos (CO_2 koncentracija, temperatūra, drėgmė);

— neutraliojo raudonojo ekstrahavimo sąlygos (tirpiklis, trukmė);

— neutraliojo raudonojo optinio tankio spektrofotometrinio matavimo bangos ilgis;

— antrasis (etaloninis) bangos ilgis, jei naudojamas;

— spektrofotometriniam matavimui naudoto palyginamojo tirpalo sudėtis, jei buvo naudojamas.

Rezultatai:

— ląstelių gyvybingumas, nustatytas kiekvienai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertei, išreikštas lygiagrečių tirpiklio kontrolinių bandinių gyvybingumo vidurkio procentine dalimi;

— koncentracijos ir atsako kreivės (santykinis ląstelių gyvybingumas kaip cheminės medžiagos koncentracijos funkcija), gautos lygiagretiems (+ Irr) ir (-Irr) bandymams;

— koncentracijos ir atsako kreivių analizė: jei įmanoma, IC_{50} (+ Irr) ir IC_{50} (-Irr) apskaičiavimas;

— dviejų koncentracijos ir atsako kreivių, gautų švitinant ir tamsoje, lyginimas, apskaičiuojant fotodirginimo faktorių (FDF) arba vidutinį fotoefektą (VFE);

— bandymo priimtinumo kriterijai; lygiagretus tirpiklio kontrolinis bandinys;

— švitintų ir nešvitintų ląstelių absoliutusis gyvybingumas (neutraliojo raudonojo ekstrakto optinis tankis);

— anksčiau gauti neigiamų ir tirpiklių kontrolinių bandinių duomenys; vidutinės vertės ir standartiniai nuokrypiai;

— bandymo priimtinumo kriterijai; lygiagretus teigiamas kontrolinis bandinys;

▼C1

— teigiamo kontrolinio bandinio IC_{50} (+ Irr) ir IC_{50} (-Irr) bei FDF/VFE;

— anksčiau gauti teigiamų kontrolinių bandinių duomenys: IC_{50} (+ Irr) ir IC_{50} (-Irr) bei FDF/VFE; vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

4. **NUORODOS**

1) Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30–31th October 2001, Secretariat's Final

2) Loveli W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: p. 95–102.

3) Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In „Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry" Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam, p XI-XXXV.

4) Spielmann, h., Loveli, W.W., Holzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, p. 314–348.

5) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In „The science of Photobiology" Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p. 79–110.

6) OECD (1997) Environmental Health and SAFEty Publications, Series on Testing and Assessment No.7 „Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water" Environment Directorate, OECD, Paris.

7) Spielmann, h, Balls, M., Doring, B., Holzhūtter, h.G, Kalweit, S., Klecak, G, L'Eplattenier, h, Liebsch, M., Loveli, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, p. 793–796.

8) Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, p. 7–8.

9) Spielmann, h, Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G De Silva, O., Holzhūtter, h.G, Clothier, R, Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Loveli, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international ES/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. In Vitro 12, p. 305–327.

10) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30–31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15 March 2002, OECD ENV7EHS, available upon request from the Secretariat.

11) Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, 119–124.

▼C1

12) Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225–237.

13) Lambert L.A., Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In „Dermatotoxicology“, edited by F.N. Marzulli and h.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p 515–530.

14) Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825–1829.

15) ISO 10977. (1993). Photography – Processed photographic colour films and paper prints – Methods for measuring image stability.

16) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3900734275

17) ZEBET/ECVAM/COLIPA – Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998.

18) Spielmann, h, Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhūtter, h.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Loveli, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC*, in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, p. 679–708.

19) Holzhūtter, h.G, and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, p. 127–138.

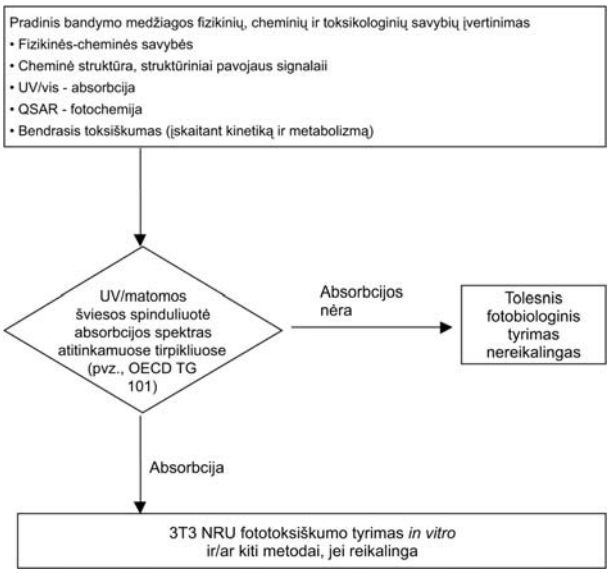
20) Holzhūtter, h.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, p. 445–462.

21) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00. html

▼C1

1 PRIEDĖLIS

3T3 NRU fototoksiškumo bandymo svarba, taikant nuoseklųjį metodą cheminių medžiagų fototoksiškumui tirti

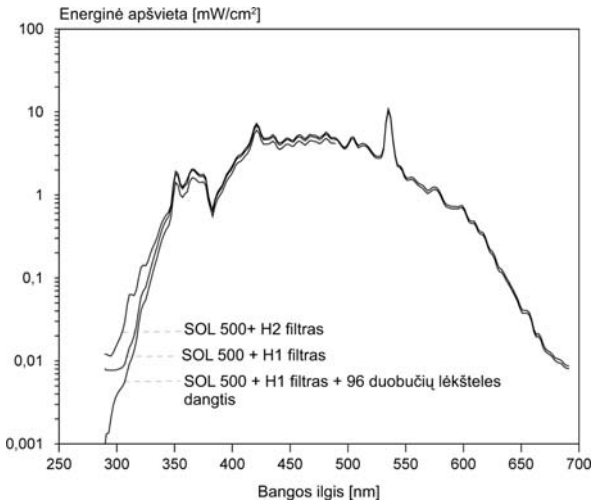


▼C1

2 PRIEDĖLIS

1 paveikslas

Filtruoto saulės šviesos imitatoriaus spektrinės galios skirstinys



(žr. 1.4.1.5.1 skirsnio antrąją pastraipą)

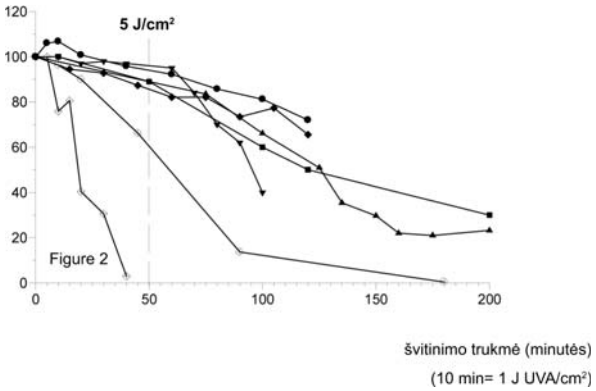
1 paveiksle pateiktas filtruoto saulės šviesos imitatoriaus priimtino spektrinės energinės apšvietos skirstinio pavyzdys. Jis yra gautas metalų halogenidais legiruotam šaltiniui, naudojamam 3T3 NRU fototoksiškumo bandymo tinkamumo patvirtinimo tyrime (6) (8) (17). Parodyta dviejų skirtingų filtrų ir 96 duobučių ląstelių kultūros lėkštelės dangčio filtruojamojo poveikio įtaka. H2 filtras buvo naudojamas tik toms bandymo sistemoms, kurios gali ištverti didesnį UVB spinduliuotės kiekį (odos modelio ir raudonųjų kraujo kūnelių fotohemolizės bandymai). Atliekant 3T3 NRU fototoksiškumo bandymą, buvo naudojamas H1 filtras. Paveiksle parodytas papildomas filtruojamasis lėkštelės dangčio poveikis, kuris iš esmės stebimas UVB srityje, švitinimo spektre vis dar liekant UVB spinduliuotės kiekiui, kurio pakanka cheminėms medžiagoms, paprastai sugeriančioms UVB bangų ilgį, pvz., amiodaronui, sužadinti (žr. 1 lentelę).

▼C1

2 paveikslas

Balb/c 3T3 ląstelių jautrumas švitinimui (išmatuotas UVA srityje)

Ląstelių gyvybingumas (neutraliojo raudonojo sugėrimo % palyginti su kontroliniais bandiniais tamsoje)



(žr. 1.4.1.5.2 skirsnio antrąją pastraipą; 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

UVA srityje matuojamas Balb/c 3T3 ląstelių jautrumas švitinimui saulės šviesos imitatoriumi, kuris naudojamas vykdant 3T3 NRU fototoksiškumo bandymo tinkamumo patvirtinimo tyrimą. Paveiksle parodyti rezultatai, gauti 7 skirtingose laboratorijose, vykdant pradinį tinkamumo patvirtinimo tyrimą (1). Dvi kreivės su šviesiais simboliais buvo gautos senesnėms ląstelėms (didelis persėjimų skaičius), kurios turėjo būti pakeistos naujomis ląstelių pradinėmis kultūromis, o kreivės su juodais simboliais rodo ląsteles su priimtinu švitinimo ištveriamumu.

Pagal šiuos duomenis buvo gauta didžiausia necitotoksinė švitinimo dozė 5 J/cm^2 (vertikali brūkšniuota linija). Horizontali brūkšniuota linija papildomai rodo didžiausią priimtiną švitinimo poveikį, nurodytą 1.4.2.2 skirsnyje.

▼M3

B.42. **ODOS JAUTRINIMAS. VIETINIO LIMFMAZGIO BANDYMAS**

ĮVADAS

1. OECD Cheminių medžiagų bandymo gairės ir jomis pagrįsti ES bandymo metodai periodiškai persvarstomi atsižvelgiant į mokslo pažangą, kintančias reguliavimo reikmes ir gyvūnų gerovės sumetimais. Anksčiau buvo patvirtintas pradinis bandymo metodas (BM) pelių odos jautrinimui nustatyti – vietinio limfmazgio bandymas (angl. *Local Lymph Node Assay*, LLNA; OECD bandymų metodika 429; šio priedo B.42 skyrius)(1). LLNA tinkamumo patvirtinimas ir susijusių darbų apžvalga paskelbta (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) šaltiniuose. Atnaujintas LLNA pagrįstas patirties ir mokslinių duomenų įvertinimu (12). Tai yra antrasis BM, parengtas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) sukeliamo gyvūnų odos jautrinimo potencialui įvertinti. Pagal kitą BM (t. y. OECD bandymų metodika 406; šio priedo B.6 skyrius) taikomi bandymai su jūros kiaulytėmis, pirmiausia maksimizacijos ir Buehlerio bandymas su jūros kiaulytėmis (13). LLNA turi tam tikrų pranašumų prieš B.6 ir OECD bandymų metodiką 406 (13) gyvūnų gerovės prasme. Šis atnaujintas LLNA bandymų metodas apima rinkinį naudojimo charakteristikų standartų (angl. *Performance Standards*, PS) (1 priedėlis), kuriuos galima taikyti naujų ir (arba) modifikuotų bandymo metodų, kurie funkciškai ir mechanistiškai panašūs į LLNA, tinkamumo patvirtinimo būklei įvertinti, laikantis OECD rekomendacinio dokumento Nr. 34 (14).

2. LLNA tiriamas odos jautrinimo indukcinis etapas ir gaunami kiekybiniai duomenys, tinkami dozės ir atsako sąryšiui įvertinti. Reikia pažymėti, kad silpni arba vidutiniai jautrikliai, kurie yra rekomenduoti kaip tinkamos teigiamo poveikio kontrolinės medžiagos (angl. *positive control chemicals*, PC) bandymams su jūrų kiaulytėmis (t. y. B. 6; OECD bandymų metodika 406) (13), tinka naudoti LLNA metodui (6) (8) (15). Šiame BM kaip vienas iš variantų aprašytas ir sumažintojo LLNA (rLLNA) metodas, kurį taikant galima būtų naudoti iki 40 % mažiau gyvūnų (16) (17) (18). rLLNA gali būti taikomas, kai reguliavimo reikmėms būtina patvirtinti odos jautrinimo potencialo neigiamą prognozę, jei laikomasi visų kitų LLNA protokolo specifikacijų, aprašytų šiame BM. Neigiamo rezultato prognozė turi būti grindžiama visa turima informacija, kaip aprašyta 4 skirsnyje. Prieš taikant rLLNA metodą, turi būti pateikiamas jo taikymo aiškus pagrindimas ir loginis pagrindas. Jei, skirtingai, nei tikėtasi, atliekant rLLNA gaunamas teigiamas arba dviprasmis rezultatas, gali prireikti papildomų bandymų rezultatams išaiškinti arba patikslinti. rLLNA neturėti būti taikomas odą jautrinančių bandomųjų medžiagų pavojingumui nustatyti, kai reikalinga informacija apie dozės ir atsako sąryšį, pvz., skirstant į kategorijas pagal Reglamentą (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo ir JT pasaulinės suderintos cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemos.

APIBRĖŽTYS

3. Vartojamos apibrėžtys pateiktos 2 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

4. LLNA yra pakaitinis metodas potencialiai odą jautrinančioms cheminėms medžiagoms nustatyti. Nereikia manyti, kad visais atvejais vietoj bandymo su jūrų kiaulytėmis (t. y. B.6; OECD bandymų metodika 406) (13), reikia taikyti LLNA bandymą; tai labiau reiškia, kad šis bandymas yra lygiavertis ir gali būti taikomas kaip pakaitinis metodas, pagal kurį teigiamų ir neigiamų rezultatų paprastai nebereikia papildomai patvirtinti. Prieš atlikdama tyrimą, bandymų laboratorija turi apsvarstyti visą turimą informaciją apie bandomąją

▼M3

medžiagą. Tokia informacija apima bandomosios medžiagos tapatumą ir cheminę struktūrą, jos fizikines ir chemines savybes, visų kitų bandomosios medžiagos *in vitro* arba *in vivo* toksiškumo bandymų rezultatus ir gimininges struktūros medžiagų toksikologinius duomenis. Ši informacija turi būti apsvarstyta, siekiant nustatyti, ar LLNA tinka medžiagai bandyti (atsižvelgiant į tam tikrų medžiagų tipų nesuderinamumą su LLNA – žr. 5 skirsnį), ir siekiant parinkti tinkamą dozę.

5. LLNA yra *in vivo* metodas, todėl alerginiam kontaktiniam jautrinimui įvertinti naudojami gyvūnai. Tačiau taikant šį metodą yra galimybė sumažinti šiam tikslui reikalingų gyvūnų skaičių. Be to, LLNA yra iš esmės geresnis gyvūnų naudojimo būdas (kelia mažiau skausmo ir kančių) bandant alerginį kontaktinį jautrinimą. LLNA yra pagrįstas imunologinių reiškinių, kuriuos cheminės medžiagos sukelia jautrinimo indukcijos etapu, nagrinėjimu. Kitaip nei darant bandymus su jūrų kiaulytėmis (t. y. B.6; OECD bandymų metodika 406) (13), taikant LLNA nereikia sukelti ypač didelio odos jautrumo reakcijų. Be to, taikant LLNA nereikia naudoti adjuvantų, kurie reikalingi darant maksimizacijos bandymą su jūrų kiaulytėmis (13). Taigi LLNA sumažina gyvūnų skausmą ir kančias. Nepaisant LLNA pranašumų prieš B.6 ir OECD bandymų metodiką 406, reikia pripažinti, kad yra tam tikrų apribojimų, dėl kurių gali tekti taikyti B.6 ir OECD bandymų metodiką 406 (13) (pvz., klaidingi neigiami rezultatai tiriant kai kuriuos metalus LLNA metodu, klaidingi teigiami rezultatai tiriant tam tikrus odos dirgiklius (pvz., kai kurias paviršinio aktyvumo medžiagų tipo chemines medžiagas))(19) (20), arba bandomosios medžiagos tirpumas). Be to, dėl cheminių medžiagų klasių arba medžiagų, kuriose yra funkcinių grupių, veikiančių kaip galimos klaidinančiosios medžiagos (21), gali tekti atlikti bandymus su jūrų kiaulytėmis (t. y. B.6; OECD bandymų metodika 406) (13). Negana to, remiantis ribota tinkamumo patvirtinimo duomenų baze, kurią daugiausia sudaro pesticidų preparatai, pastarojo tipo bandomųjų medžiagų atveju labiau tikėtinas teigiamas rezultatas taikant LLNA, nei bandymą su jūros kiaulytėmis (22). Tačiau, kai bandomi preparatai, galima apsvarstyti galimybę įtraukti keletą panašių medžiagų, kurių rezultatai žinomi, kaip palyginamąsias medžiagas, ir taip įrodyti, kad LLNA yra tinkamas (žr. 16 skirsnį). Išskyrus tokius nustatytus apribojimus, LLNA taikytinas bandant bet kurias medžiagas, nebent tos medžiagos turi tokių savybių, dėl kurių sumažėtų LLNA tikslumas.

BANDYMO METODO PRINCIPAS

6. Pagrindinis principas, kuriuo pagrįstas LLNA metodas, yra jautriklių sukelta pirminė limfocitų proliferacija medžiagos poveikio vietą drenuojančiame limfmazgyje. Ši proliferacija yra proporcinga naudojamai dozei ir alergeno gebai jautrinti, taigi tai yra paprastas būdas objektyviai ir kiekybiškai išmatuoti jautrinimą. Proliferacija įvertinama palyginant vidutinę proliferaciją bandymo grupėse ir nešikliu paveiktose kontrolinėse (angl. *vehicle treated control*, VC) grupėse. Nustatomas vidutinės proliferacijos paveiktose grupėse ir lygiagrečiose VC grupėse santykis, vadinamas dirginimo rodikliu (angl. *Stimulation Index*, SI), kuris turi būti ≥ 3, kad bandomoji medžiaga galėtų būti toliau vertinama kaip galimas odos jautriklis. Čia aprašyti metodai yra pagrįsti *in vivo* radioaktyviųjų indikatorių naudojimu padidėjusiam proliferuojančių ląstelių skaičiui išmatuoti drenuojančiuose ausų limfmazgiuose. Tačiau gali būti naudojami kiti parametrai proliferuojančių ląstelių skaičiui įvertinti, jei visiškai laikomasi PS reikalavimų (1 priedėlis).

▼M3

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Gyvūnų rūšių parinkimas

7. Šiam bandymui pasirinkta gyvūnų rūšis – pelės. Naudojamos suaugusios CBA/Ca arba CBA/J veislės pelių patelės, kurios yra neturėjusios vados ir neapvaisintos. Pradedant bandymą, gyvūnų amžius turi būti 8–12 savaičių, o gyvūnų masės skirtumas turi būti kuo mažesnis ir neviršyti 20 % vidutinės masės. Galima naudoti kitas veisles ir patinus, jei yra gauta pakankamai duomenų, kurie rodytų, kad nėra esminių veislei ir (arba) lyčiai būdingų atsako į LLNA skirtumų.

Laikymo ir šėrimo sąlygos

8. Pelės turi būti laikomos grupėmis (23), nebent pateikiamas pakankamas loginis pagrindas, kodėl peles reikia laikyti atskirai. Patalpos, kurioje laikomi bandomieji gyvūnai, temperatūra turi būti 22 ± 3 °C. Nors santykinė oro drėgmė turi būti ne mažesnė 30 % ir, pageidautina, ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, siektina, kad drėgmė būtų 50–60 %. Apšvietimas turi būti dirbtinis, taikant 12 val. šviesos ir 12 val. tamsos ciklą. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, neribojant geriamo vandens kiekio.

Gyvūnų ruošimas

9. Gyvūnai pasirenkami atsitiktinai, ženklinami, kad būtų įmanoma kiekvieną identifikuoti (tačiau netaikomas joks ausų ženklinimas), ir laikomi narveliuose mažiausiai 5 paras prieš pradedant taikyti dozes, kad galėtų priprasti prie laboratorijos sąlygų. Prieš veikimo medžiaga pradžią visi gyvūnai apžiūrimi, ar neturi pastebimų odos pažeidimų.

Dozavimo tirpalų paruošimas

10. Prieš užtepant ant pelių ausų, kietosios cheminės medžiagos ištirpinamos arba paskleidžiamos tirpikliuose / nešikliuose ir, jei reikia, atskiedžiamos. Skystos cheminės medžiagos gali būti užtepamos grynos arba atskiestos. Netirpios cheminės medžiagos, pvz., tos, kurių paprastai pasitaiko medicinos įrangoje, prieš užtepant ant pelių ausų, padidintosios ekstrakcijos būdu išskiriamos atitinkamame tirpiklyje, kad būtų gautos visos galimos išskirti sudedamosios dalys. Bandomosios medžiagos paruošiamos kasdien, nebent stabilumo duomenys rodo, kad jas galima laikyti ilgesnį laiką.

Patikimumo tikrinimas

11. Teigiamo poveikio kontrolinės cheminės medžiagos (angl. *positive control chemicals*, PC) naudojamos siekiant parodyti tyrimo tinkamumą joms reaguojant pakankamu ir atkartojamu jautrumu kaip jautrinančioms bandomosioms medžiagoms, kurių atsako dydis gerai apibūdintas. Naudoti lygiagrečias PC rekomenduojama todėl, kad taip gali būti įrodyta laboratorijos kompetencija sėkmingai atlikti bandymą per kiekvieną tyrimą ir įvertinti atkuriamumą ir palyginamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų. Kiekvieno tyrimo metu naudoti PC reikalauja ir kai kurios reguliavimo institucijos, todėl naudotojai raginami pasikonsultuoti su atitinkamomis institucijomis prieš vykdydami LLNA. Taigi, skatinama įprastai naudoti lygiagrečią PC, kad būtų išvengta papildomų bandymų su gyvūnais, reikalingų laikytis reikalavimų, kuris gali kilti PC naudojant tik periodiškai (žr. 12 skirsnį). PC

▼M3

turi sukelti teigiamą LLNA atsaką esant tokiam poveikio lygiui, kad SI padidėtų iki daugiau kaip 3, palyginti su neigiamo poveikio kontrolinės medžiagos (angl. *negative control*, NC) grupe. PC dozė turi būti parenkama taip, kad nesukeltų per didelio odos sudirginimo ar sisteminio toksiškumo, o atsako sukėlimas būtų atkuriamas, bet ne per didelis (t. y. SI > 20 būtų per didelis). Tinkamiausios PC yra 25 % heksilcinamono aldehidas (Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos [CAS] Nr. 101–86–0) acetono ir alyvų aliejaus mišinyje (4:1 tūrio dalys) ir 5 % merkaptobenztiazolas (CAS Nr. 149–30–4) *N,N*-dimetilformamidas (žr. 1 priedėlio 1 lentelę). Gali pasitaikyti aplinkybių, kai, pateikus pakankamai įrodymų, galima naudoti kitas PC, atitinkančias pirmiau nurodytus kriterijus.

12. Nors naudoti lygiagrečią PC grupę rekomenduojama, gali būti situacijų, kuriomis gali pakakti periodinių PC bandymų (t. y. ≤ 6 mėnesių intervalais), jei tai laboratorijos, kurios reguliariai atlieka LLNA (t. y. atlieka LLNA ne rečiau kaip kartą per mėnesį) ir turi anksčiau atliktų PC bandymų duomenų bazę, kuri būtų įrodymas, kad laboratorijoje gaunami atkuriami ir tikslūs rezultatai su PC. Pakankamas profesionalumas atliekant LLNA tyrimus gali būti sėkmingai įrodomas nuolat gaunant teigiamus rezultatus naudojant PC ne mažiau kaip 10-yje nepriklausomų bandymų, atliktų per pagrįstą laikotarpį (t. y. trumpesnį kaip vieneri metai).

13. Lygiagreti PC visada turi būti naudojama, jei yra procedūrinių LLNA pakeitimų (pvz., pasikeitė kvalifikuoti darbuotojai, pakeistos bandymo metodo medžiagos ir (arba) reagentai, pakeista bandymo metodo įranga, pakeistas bandomųjų gyvūnų tiekėjas); tokie pakeitimai turi būti užregistruoti laboratorijos ataskaitoje. Turi būti apsvarstytas tokių pasikeitimų poveikis anksčiau sukauptų duomenų bazės tinkamumui, vertinant būtinybę sukurti naują anksčiau sukauptų duomenų bazę, skirtą PC rezultatų nuoseklumui dokumentuoti.

14. Tyrėjai turi suprasti, kad sprendimas vykdyti PC tyrimą periodiškai, o ne nuolat, turi padarinių neigiamų tyrimų rezultatų, gautų be lygiagrečios PC naudojimo, laikotarpiu tarp kiekvieno periodinio PC tyrimo, tinkamumui ir priimtinumui. Pvz., jei, atliekant periodinį PC tyrimą, gaunamas klaidingas neigiamas rezultatas, gali būti kvestionuojami neigiami bandomosios medžiagos rezultatai, gauti laikotarpiu nuo paskutinio priimtino periodinio PC tyrimo iki nepriimtino periodinio PC tyrimo. Šių rezultatų padariniai turi būti stropiai įvertinti sprendžiant, ar nuolat vykdyti lygiagrečius, ar tik periodinius PC tyrimus. Taip pat reikia apsvarstyti galimybę lygiagrečios PC grupės tyrimams naudoti mažiau gyvūnų, jei tai moksliškai pateisinama ir jei laboratorija savo anksčiau sukauptais duomenimis įrodo, kad galima naudoti mažiau pelių (12).

15. Nors PC turi būti bandoma nešiklyje, apie kurį žinoma, kad jis sukelia pastovų atsaką (pvz., acetono ir alyvų aliejaus mišinyje; 4:1 tūrio dalys), gali būti tam tikrų reguliavimo situacijų, kai gali prireikti ištirti ir nestandartinį nešiklį (kliniškai ir (arba) chemiškai susijusį preparatą) (24). Jei lygiagreti PC bandoma kitokiame nešiklyje nei bandomoji medžiaga, turi būti naudojama atskira VC (nešiklio kontrolinė cheminė medžiaga), skirta lygiagrečiai PC.

16. Tais atvejais, kai vertinamos tam tikrai cheminių medžiagų klasei ar atsakų sričiai priklausančios bandomosios medžiagos, gali būti naudojamos ir palyginamosios medžiagos, kad būtų parodyta, jog bandymo metodas tinkamai veikia nustatant šių bandomųjų medžiagų odos jautrinimo potencialą. Atitinkamos palyginamosios medžiagos turi pasižymėti šiomis savybėmis:

— struktūriniu ir funkciniu panašumu į bandomosios medžiagos klasę,

— žinomomis fizinėmis ir (arba) cheminėmis charakteristikomis,

— apie jas turi būti patvirtinančių duomenų, gautų LLNA tyrimais,

— apie jas turi būti patvirtinančių duomenų, gautų taikant kitus bandymų su gyvūnais modelius ir (arba) iš žmonių.

▼M3

BANDYMO EIGA

Gyvūnų skaičius ir dozių dydis

17. Vienai dozės grupei naudojami ne mažiau kaip keturi gyvūnai, naudojant ne mažiau kaip tris bandomosios medžiagos koncentracijas ir vieną lygiagrečią NC (neigiamo poveikio kontrolinės cheminės medžiagos) grupę, paveikiamą tik bandomosios medžiagos nešikliu, ir PC (lygiagrečią arba naujausią, remiantis laboratorijos politika pagal 11–15 skirsnius). Reikia apsvarstyti poreikį išbandyti keletą PC dozių, ypač bandant PC periodiškai. Išskyrus tai, kad jie neveikiami bandomąja medžiaga, kontrolinių grupių gyvūnų priežiūra ir elgesys su jais turi nesiskirti nuo poveikio grupės gyvūnų.

18. Dozė ir nešiklis turi būti parenkami laikantis (3) ir (5) šaltiniuose pateikiamų rekomendacijų. Paeilinės dozės paprastai parenkamos iš atitinkamos koncentracijos verčių eilės, pvz., 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % ir t. t. Taikoma koncentracijos verčių eilė turi turėti turėti tinkamą loginį pagrindą. Reikia atsižvelgti į visą turimą toksikologinę informaciją (pvz., apie ūminį toksiškumą ir odos dirginimą) ir struktūrinę bei fizikinių ir cheminių savybių informaciją apie dominančią bandomąją medžiagą (ir (arba) struktūriškai panašias medžiagas), kad trys iš eilės taikomos koncentracijos vertės būtų parinktos taip, kad didžiausios koncentracijos poveikis būtų kuo didesnis, bet būtų išvengta sisteminio toksiškumo ir (arba) per didelio vietinio odos dirginimo (3) (25). Jei tokios informacijos neturima, gali prireikti pradinio atrankinio bandymo (žr. 21–24 skirsnius).

19. Nešiklis neturi daryti įtakos bandymo rezultatui ar jį iškraipyti ir turi būti parinktas taip, kad būtų kuo geresnis tirpumas, siekiant gauti didžiausią įmanomą koncentraciją gaminant tirpalą arba suspensiją, tinkamą bandomajai medžiagai užtepti. Rekomenduojami nešikliai yra acetono ir alyvų aliejaus mišinys (4:1 tūrio dalys), *N,N*-dimetilformamidas, metiletilketonas, propilenglikolis ir dimetilsulfoksidas (19), tačiau galima naudoti kitus nešiklius, jei pateikiamas tinkamas loginis pagrindas. Tam tikrais atvejais papildomai kontrolei gali tekti naudoti klinikiniu požiūriu atitinkantį tirpiklį arba komercinį preparatą, turintį bandomosios medžiagos. Reikia ypač stengtis užtikrinti, kad nešiklyje būtų hidrofilinių bandomųjų medžiagų, kurios drėkintų odą ir iš karto nenutekėtų, įdedant soliubilizavimo priemonių (pvz., 1 % „Pluronic® L92“). Taigi reikia vengti naudoti grynai vandeninius nešiklius.

20. Apdorojant atskirų pelių limfmazgius galima įvertinti gyvūnų variantiškumą ir statistiškai palyginti skirtumus tarp bandomosios medžiagos ir VC grupės matavimo rezultatų (žr. 35 skirsnį). Be to, kai surenkami atskirų gyvūnų duomenys, realu įvertinti galimybę sumažinti pelių skaičių PC grupėje 12. Be to, kai kurios reguliavimo institucijos reikalauja rinkti atskirtų gyvūnų duomenis. Vis dėlto kai kurioms reguliavimo institucijoms gali būti priimtini jungtiniai gyvūnų duomenys ir tokiais atvejais tyrėjai gali turėti pasirinkimą rinkti atskirų gyvūnų arba jungtinius duomenis.

Atrankinis bandymas

21. Jei neturima informacijos, pagal kurią galima nustatyti didžiausią bandomą dozę (žr. 18 skirsnį), reikia atlikti atrankinį bandymą, kad būtų nustatytas tinkamas dozės lygis atliekant LLNA. Atrankinio bandymo tikslas – nustatyti gaires didžiausiam pagrindinio LLNA tyrimo dozės lygiui parinkti, kai neturima informacijos apie koncentraciją, kuri sukelia sisteminį toksiškumą (žr. 24 skirsnį) ir (arba) per didelį vietinį odos dirginimą (žr. 23 skirsnį). Didžiausias bandomas dozės lygis turi būti 100 % bandomosios medžiagos, jei tai skysčiai, arba didžiausia įmanoma koncentracija, jei tai kietosios medžiagos ar suspensijos.

▼M3

22. Atrankinis bandymas atliekamas tokiomis pačiomis sąlygomis kaip ir pagrindinis LLNA tyrimas, išskyrus tai, kad nevertinama limfmazgių proliferacija ir galima tirti mažiau gyvūnų kiekvienoje dozės grupėje. Siūloma naudoti vieną arba du gyvūnus vienai dozės grupei. Visos pelės kasdien stebimos, ar poveikio vietoje nepasireiškia sisteminio toksiškumo ar vietinio dirginimo klinikiniai požymiai. Kūno masė užrašoma prieš bandymą ir prieš jį pabaigiant (6 dieną). Abi kiekvienos pelės ausys stebimos, ar nėra eritemos ir įvertinama pagal 1 lentelę (25). 1 dieną (prieš dozę), 3 dieną (praėjus maždaug 48 val. po pirmosios dozės) ir 6 dieną stormačiu (pvz., skaitmeniniu mikrometru arba ciferblatiniu storio matuokliu) atliekami ausų storio matavimai. Be to, 6 dieną ausų storis gali būti įvertinamas pagal ausų skylamušio svorio matavimus, atliekamus po to, kai gyvūnai humaniškai numarinami. Per didelį vietinį odos dirginimą rodo ≥ 3 edemos įvertis ir (arba) ≥ 25 % ausies storio padidėjimas bet kurią matavimo dieną (26) (27). Didžiausia pagrindiniam LLNA tyrimui parenkama dozė yra antra pagal dydį dozė iš atrankinio bandymo koncentracijų eilės (žr. 18 skirsnį), nesukelianti sisteminio toksiškumo ir (arba) per didelio vietinio odos dirginimo.

1 lentelė

Eritemos įverčiai

Pastebėjimas	Įvertis
Eritemos nėra	0
Labai nedidelė eritema (vos pastebima)	1
Aiški eritema	2
Nuo vidutinės iki sunkios eritemos	3
Nuo sunkios eritemos (buroko raudonumo) iki šašo susidarymo, kuomet nebeįmanoma įvertinti eritemos sunkumo	4

23. Taikant LLNA metodą, dirgikliams nustatyti, be ausų storio padidėjimo 25 % (26) (27), naudojamas ir statistiškai reikšmingas paveiktų pelių ausų storio padidėjimas, palyginti su kontrolinėmis pelėmis (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Vis dėlto, nors statistiškai reikšmingas padidėjimas galimas ir ausies storiui esant mažesniam kaip 25 %, tai nėra siejama konkrečiai su per dideliu dirginimu (30) (32) (33) (34).

24. Toliau išvardyti klinikiniai požymiai gali rodyti sisteminį toksiškumą (35) (36), kai yra naudojami kaip integruoto vertinimo dalis, todėl gali nurodyti didžiausią dozės lygį, skirtą pagrindiniam LLNA: nervų sistemos funkcijos pokyčiai (pvz., piloerekcija, ataksija, drebulys ir konvulsijos); elgsenos pokyčiai (pvz., agresyvumas, prausimosi pokyčiai, žymus aktyvumo lygio pokytis); kvėpavimo pokyčiai (t. y. kvėpavimo dažnio ir intensyvumo pokyčiai, pvz., dusulys, žiopčiojimas ir karkalai) ir ėdalo bei vandens vartojimo pokyčiai. Be to, vertinant turi būti atsižvelgiama į letargijos ir (arba) nereagavimo požymius ir bet kokius didesnio už nedidelį ar trumpalaikį skausmą ir kančią klinikinius požymius arba > 5 % kūno masės sumažėjimą nuo 1 iki 6 dienos, ir į nugaišimą. Gaištantys ar akivaizdžiai skausmą patiriantys ar didelės ir ilgalaikės kančios požymius rodantys gyvūnai turi būti humaniškai numarinti (37).

▼M3

Pagrindinio bandymo eksperimentinis planas

25. Eksperimentinis bandymo planas atrodo taip:

— *1 diena.* Atskirai nustatoma ir užrašoma kiekvieno gyvūno masė ir bet kokie klinikiniai pastebėjimai. Ant kiekvienos ausies išorinės pusės užtepama 25 µl atitinkamai atskiesto bandomosios medžiagos tirpalo, vien tik nešiklio arba PC (lygiagrečios arba naujausios, remiantis laboratorijos politika pagal 11–15 skirsnius).

— *2 ir 3 dienos.* Pakartojama 1 dieną daryta procedūra.

— *4 ir 5 dienos.* Jokio veikimo.

— *6 diena.* Užrašoma kiekvieno gyvūno masė. Į visų tiriamųjų ir kontrolinių pelių uodegos veną suleidžiama 250 µl sterilaus valgomosios druskos ir fosfatinio buferio tirpalo (angl. *phosphate-buffered saline*, PBS), kuriame yra 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) tričiu prisotinto (^{3}H)-metiltimidino. Arba į visų pelių uodegos veną galima suleisti 250 µL sterilaus PBS, kuriame yra 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I-jododeoksiuridino ir 10^{-5}M fluorodeoksiuridino. Po penkių valandų (5 h) gyvūnai humaniškai numarinami. Kiekvienos pelės drenuojamieji ausų limfmazgiai išpjaunami ir kiekvieno gyvūno apdorojami PBS (atskirų gyvūnų metodas); pagal kitą metodą galima išpjauti limfmazgius iš kiekvienos bandymo grupės visų gyvūnų ausų ir kartu sudėti į PBS (jungtinių poveikio grupių metodas). Limfmazgių identifikavimo ir skrodimo aprašą bei schemas galima rasti (12) šaltinyje. Norint toliau stebėti vietinį odos atsaką pagrindiniame tyrime, į tyrimo protokolą gali būti įtraukti tokie papildomi parametrai kaip ausų eritemos įverčiai arba ausų storio matavimo rezultatai (gauti storio matuokliu arba ausų skylamušio svorio matavimais atliekant nekroskopiją).

Ląstelių suspensijos ruošimas

26. Limfmazgių ląstelių (angl. *lymph node cells*, LNC), išpjautų iš vieno gyvūno abiejų ausų pagal atskirų gyvūnų metodą arba iš visų gyvūnų ausų pagal jungtinių poveikio grupių metodą, pavienių ląstelių suspensija paruošiama švelniai mechaniškai susmulkinant pro 200 µm nerūdijančio plieno tinklelį ar kitu priimtinu pavienių ląstelių suspensijos sudarymo metodu. LNC du kartus plaunamos gausiu PBS kiekiu ir DNR nusodinamos 5 % trichloracto rūgštimi (angl. *trichloroacetic acid*, TCA) 4 °C temperatūroje 18 h (3). Nuosėdos vėl suspenduojamos 1 ml TCA ir suspensija supilama į scintiliacinius mėgintuvėlius su 10 ml scintiliacinio skysčio siekiant suskaičiuoti ^{3}H, arba tiesiai į mėgintuvėlius gama impulsams skaičiuoti siekiant nustatyti ^{125}I.

Ląstelių proliferacijos nustatymas (radioaktyviųjų junginių patekimas)

27. ^{3}H-metiltimidino patekimas matuojamas skaičiuojant β scintiliacijas kaip skilimų skaičių per minutę (angl. *disintegrations per minute*, DPM). ^{125}I-jododeoksiuridino patekimas matuojamas skaičiuojant ^{125}I ir išreiškiamas kaip DPM. Atsižvelgiant į taikomą metodą, patekimas bus išreiškiamas DPM / pelei (atskirų gyvūnų metodas) arba DPM / poveikio grupei (jungtinių poveikio grupių metodas).

Sumažintasis LLNA

28. Kai kuriais atvejais, kai reguliavimo reikmėms būtina patvirtinti odos jautrinimo potencialo neigiamą prognozę, pasirinktinai galima taikyti rLLNA protokolą (16) (17) (18), naudojant mažiau gyvūnų, jei laikomasi visų kitų LLNA protokolo specifikacijų pagal šį BM. Prieš taikant rLLNA metodą, turi būti pateikiamas jo taikymo aiškus pagrindimas ir mokslinis pagrindas. Jei gaunamas teigiamas arba dviprasmis rezultatas, gali prireikti papildomų bandymų rezultatams išaiškinti arba patikslinti.

▼M3

29. Vienintelis skirtumas tarp LLNA ir rLLNA bandymo metodų protokolų yra dozės grupių skaičiaus sumažinimas ir dėl šios priežasties rLLNA nesuteikia informacijos apie dozės ir atsako sąryšį. Todėl rLLNA neturi būti taikomas, kai reikalinga informacija apie dozės ir atsako sąryšį. Kaip ir kelių dozių LLNA, rLLNA metodu vertinama bandomosios medžiagos koncentracija turi būti didžiausia koncentracija, kuri pelėms nesukelia akivaizdaus sisteminio toksiškumo ir (arba) per didelio vietinio odos dirginimo (žr. 18 skirsnį).

STEBĖJIMAI

Klinikiniai stebėjimai

30. Kiekviena pelė kruopščiai apžiūrima bent kartą per dieną siekiant nustatyti bet kokius vietinio dirginimo užtepimo vietoje arba sisteminio toksiškumo klinikinius požymius. Visi pastebėjimai apie kiekvieną pelę yra sistemingai užrašomi. Į stebėsenos planus turi būti įtraukti kriterijai, pagal kuriuos galima tuoj pat nustatyti peles, kurioms pasireiškė sisteminis toksiškumas, per didelis vietinis odos dirginimas arba odos ėsdinimas, kad gyvūnus būtų galima numarinti (37).

Kūno masė

31. Kaip nurodyta 25 skirsnyje, atskirai kiekvieno gyvūno masė išmatuojama bandymo pradžioje ir humaniškai numarinant pagal planą.

REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS

32. Kiekvienos poveikio grupės rezultatai išreiškiami kaip dirginimo rodiklis (angl., *Stimulation Index*, SI). Taikant atskirų gyvūnų metodą, SI gaunamas dalijant kiekvienos bandomosios medžiagos grupės vidutinę DPM / gyvūnui vertę ir PC grupės vidutinę DPM / gyvūnui vertę iš tirpiklio / VC grupės vidutinės DPM /gyvūnui vertės. Taigi, VC vidutinė SI vertė lygi 1. Taikant jungtinių poveikio grupių metodą, SI gaunamas bendrą visos poveikio grupės gautą radioaktyviųjų junginių patekimo dydį dalijant iš visai VC grupei gauto patekimo dydžio; šis dalmuo yra vidutinė SI vertė.

33. Vertinant rezultatus, atsakas laikomas teigiamu, jei SI $\geq$ 3. Tačiau, sprendžiant, ar ribinis rezultatas turi būti paskelbtas teigiamu, galima atsižvelgti į dozės ir atsako sąryšio stiprumą, statistinį reikšmingumą ir tirpiklio / nešiklio bei PC atsakų nuoseklumą (4) (5) (6).

34. Jei gauti rezultatai nėra visiškai aiškūs, reikia atsižvelgti į įvairias bandomosios medžiagos savybes, įskaitant tai, ar jos struktūra gimininga žinomų odos jautriklių struktūrai, ar ji sukelia per didelį vietinį pelių odos dirginimą, ir pasireiškusio dozės ir atsako sąryšio tipą. Šie ir kiti aspektai yra išsamiai aptarti kitur (7).

35. Surenkant radioaktyvumo duomenis apie kiekvieną pelę galima statistiškai išanalizuoti dozės ir atsako sąryšį tuose duomenyse ir jo laipsnį. Atliekant bet kokį statistinį įvertinimą, galima įtraukti dozės ir atsako sąryšio vertinimą ir tinkamai pakoreguotus bandymo grupių palyginimus (pvz., suporuotų dozavimo grupių palyginimus su lygiagrečiomis VC). Į statistinę analizę gali būti įtraukta, pvz., tiesinė regresija arba Viljamso tyrimas, skirtas dozės ir atsako sąryšio tendencijoms įvertinti, ir suporuotų rezultatų palyginimų Daneto tyrimas. Rinkdamasis tinkamą statistinės analizės metodą tyrėjas turi turėti omenyje galimus variantiškumus ir kitas susijusias problemas, dėl kurių gali prireikti duomenų transformacijos ar neparametrinės statistinės analizės. Bet kuriuo atveju tyrėjui gali tekti atlikti SI skaičiavimus ir statistinę analizę su tam tikrais duomenų taškais (kartais vadinamais „riktais“) ir be jų.

▼M3

DUOMENYS IR ATASKAITŲ TEIKIMAS

Duomenys

36. Duomenys turi būti suvesti į lenteles. Kai taikomas atskirų gyvūnų metodas, pateikiamos atskirų gyvūnų DPM vertės, DPM/gyvūnui grupės vidurkis, atitinkamas paklaidos rodiklis (pvz., SD, SEM) ir kiekvienos dozės grupės vidutinis SI, palygintas su lygiagrečios VC grupės rodikliu. Kai taikomas jungtinių poveikio grupių metodas, pateikiama vidutinė DPM vertė / mediana ir kiekvienos dozės grupės vidutinis SI, palygintas su lygiagrečios VC grupės rodikliu.

Bandymo ataskaita

37. Bandymo ataskaitoje pateikiama ši informacija:

Bandomoji ir kontrolinė medžiagos:

— tapatumo duomenys (pvz., CAS ir EB numeriai, jei yra; šaltinis; grynumas; žinomos priemaišos; partijos numeris),

— fizikinė būsena ir fizikinės bei cheminės savybės (pvz., lakumas, stabilumas, tirpumas),

— jei tai mišinys – jo sudėtis ir komponentų procentinė dalis.

Tirpiklis / nešiklis:

— tapatumo duomenys (grynumas; koncentracija (jei tinka); naudojamas tūris),

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas.

Bandymo gyvūnai:

— CBA pelių šaltinis;

— gyvūnų mikrobiologinė būsena, jei žinoma,

— gyvūnų skaičius ir amžius,

— gyvūnų šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.

Bandymo sąlygos:

— išsami informacija apie bandomosios medžiagos ruošimą ir užtepimą,

— dozės pasirinkimo pagrindimas (įskaitant atrankinio bandymo rezultatus, jei jis buvo daromas),

— naudotos nešiklio ir bandomosios medžiagos koncentracijos vertės, suminis užteptos medžiagos kiekis,

— išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę (įskaitant pašaro tipą ar šaltinį, vandens šaltinį),

— poveikio medžiaga ir mėginių ėmimo tvarkaraščiai,

— toksiškumo matavimo metodai,

— tyrimo rezultatų vertinimo kaip teigiami arba neigiami kriterijai,

— išsami informacija apie bet kokius nukrypimus nuo protokolo ir paaiškinimas, kaip tas nukrypimas paveikia tyrimo sistemą ir rezultatus.

Patikimumo tikrinimas:

— paskutinės patikimumo patikros rezultatų santrauka, įskaitant informaciją apie medžiagą, koncentraciją ir naudojamą nešiklį,

— bandymo laboratorijoje lygiagrečiai ir (arba) anksčiau sukaupti PC ir lygiagrečiai gauti NC duomenys,

▼M3

— jei lygiagreti PC nebuvo naudojama, naujausio periodinio PC bandymo data ir laboratorijos ataskaita ir ataskaita su laboratorijos anksčiau sukauptais PC duomenimis, pagrindžiančiais lygiagrečios PC nenaudojimą.

Rezultatai:

— atskirų pelių masė dozės gavimo ir numatyto numarinimo dieną; taip pat kiekvienos poveikio grupės vidurkis ir atitinkamas paklaidos rodiklis (pvz., SD, SEM),

— toksinio poveikio atsiradimo laikas ir požymiai, įskaitant kiekvieno gyvūno odos dirginimą medžiagos užtepimo vietoje, jei yra,

— kiekvienos poveikio grupės atskiros pelės (atskirų gyvūnų metodas) DPM ir SI verčių arba vidurkių / medianų (jungtinių poveikio grupių metodas) lentelės,

— kiekvienos poveikio grupės DPM/pelei vidurkis ir atitinkamas paklaidos rodiklis (pvz., SD, SEM) ir kiekvienos poveikio grupės riktų analizės rezultatai, kai taikomas atskirų gyvūnų metodas,

— apskaičiuotas SI ir atitinkamas variantiškumo matas, kuriuo atsižvelgiama į atskirų gyvūnų rezultatų variantiškumą tiek bandomosios medžiagos, tiek kontrolinėje grupėse, kai taikomas atskirų gyvūnų metodas,

— dozės ir atsako sąryšis,

— statistinė analizė, jei taikoma.

Rezultatų aptarimas:

— trumpas rezultatų, dozės ir atsako sąryšio analizės ir statistinės analizės, jei taikoma, paaiškinimas, padarant išvadą, ar bandomoji medžiaga laikytina odą jautrinančia medžiaga.

NUORODOS

(1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol*., 30, 165–169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol*., 93, 13–31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health,* 53, 563–79.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol*., 34, 999–1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 34, 985–997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 36, 327–33.

▼M3

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol*., 146, 49–59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol,* 34: 258–273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol,* 34, 274–286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol,* 34: 249–257.

(12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09–7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and SAFEty Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol*., 18, 281–284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181–185.

(17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Available at: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]

(18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09–6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99–4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

▼M3

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896–1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90–96.

(22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10–7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71–89.

(25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Available at: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195–206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83–94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth*., 8, 245–256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491–506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60–68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721–728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, 1023–1028.

(35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity,* OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical SAFEty Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in SAFEty Evaluation,* Environmental Health and SAFEty Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

1 priedėlis

Naudojimo charakteristikų standartai, skirti įvertinti siūlomus panašius ar pakeistus LLNA bandymo metodus odos jautrinimui nustatyti

ĮVADAS

1. Naudojimo charakteristikų standartų (angl. *Performance Standards*, PS) paskirtis – pateikti pagrindą, kuriuo remiantis būtų galima nustatyti, ar nauji bandymo metodai, tiek patentuoti (t. y. saugomi autoriaus teisių, turintys prekės ženklą, registruoti), tiek nepatentuoti, pasižymi pakankamu tikslumu ir patikimumu konkretiems bandymo tikslams. Šie PS, pagrįsti patvirtinto tinkamumo ir pripažintais bandymo metodais gali būti taikomi kitų panašių metodų (paprastai vadinamų „aš irgi“ (angl. *me-too*) bandymais), kurie grindžiami panašiais moksliniais principais ir kuriais matuojamas ar prognozuojamas tas pats biologinis ar toksinis poveikis, patikimumui ir tikslumui įvertinti (14).

2. Prieš naudojant modifikuotus metodus (t. y. pasiūlytus galimus patvirtino bandymo metodo patobulinimus), turi būti atliktas įvertinimas, skirtas nustatyti siūlomų pokyčių poveikį bandymo naudojimo charakteristikoms ir kaip smarkiai tokie pokyčiai paveiks turimą informaciją, skirtą kitiems tinkamumo patvirtinimo proceso komponentams. Atsižvelgiant į siūlomų pokyčių skaičių ir pobūdį, gautus duomenis ir tuos pakyčius remiančius dokumentus, modifikuotiems metodams taikomas toks pat tinkamumo patvirtinimo procesas kaip ir aprašytas naujam bandymui arba, jei tinka, ribotas patikimumo ir tinkamumo įvertinimas taikant nustatytus PS (14).

3. Panašūs ar modifikuoti metodai, siūlomi taikyti pagal šį BM, turi būti įvertinti, kad būtų nustatytas jų patikimumas ir tikslumas, naudojant chemines medžiagas, kuriomis aprėpiamas visas LLNA įverčių intervalas. Siekiant išvengti nepageidaujamo gyvūnų naudojimo, griežtai rekomenduojama, kad modelių kūrėjai, prieš pradėdami tinkamumo patvirtinimo tyrimus pagal PS ir šiame BM pateiktas gaires, pasikonsultuotų su atitinkamomis institucijomis.

4. Šie PS pagrįsti US-ICCVAM, EC-ECVAM ir Japonijos JaCVAM suderintais PS (12), skirtais panašių ar modifikuotų LLNA versijų tinkamumui įvertinti. PS sudaro esminiai bandymo metodo komponentai, rekomenduojamos etaloninės medžiagos ir tikslumo bei patikimumo standartai, kuriuos siūlomas metodas turi atitikti arba viršyti.

I. **Esminiai bandymo metodo komponentai**

5. Siekiant užtikrinti, kad panašus ar modifikuotas LLNA metodas būtų funkciškai ir mechanistiškai analogiškas LLNA ir jį taikant būtų išmatuojamas tas pats biologinis poveikis, į bandymo metodo protokolą įtraukiami šie komponentai:

— bandomoji medžiaga iš viršaus užtepama ant abiejų pelės ausų,

— limfocitų proliferacija matuojama bandomosios medžiagos poveikio vietą drenuojančiame limfmazgyje,

— limfocitų proliferacija matuojama odos jautrinimo indukcinio etapo metu,

▼M3

— didžiausia parenkama bandomosios medžiagos dozė yra didžiausioji koncentracija, kuri pelėms nesukelia sisteminio toksiškumo ir (arba) per didelio vietinio odos dirginimo. Didžiausia teigiamų rezultatų etaloninių cheminių medžiagų dozė turi būti ne mažesnė kaip atitinkamų etaloninių cheminių medžiagų LLNA EC3 vertės (žr. 1 lentelę), nesukeliant pelėms sisteminio toksiškumo ir (arba) per didelio vietinio odos dirginimo,

— į kiekvieną tyrimą įtraukiama lygiavertė VC ir, jei tinka, lygiavertė PC,

— naudojami ne mažiau kaip keturi gyvūnai vienai dozės grupei,

— galima rinkti atskirų gyvūnų arba jungtinius gyvūnų grupių duomenis.

Jei kurių nors kriterijų nesilaikoma, šie PS negali būti taikomi panašaus ar modifikuoto metodo tinkamumui patvirtinti.

II. **Minimalus etaloninių cheminių medžiagų sąrašas**

6. US-ICCVAM, EC-ECVAM ir Japonijos JaCVAM suderintuose PS (12) nustatyta 18 būtinųjų etaloninių cheminių medžiagų, kurios turi būti naudojamos, ir keturios pasirinktinės etaloninės medžiagos (t. y. medžiagos, su kurios atliekant LLNA buvo gauti klaidingi teigiami arba klaidingi neigiami rezultatai, palyginti su bandymų su žmonėmis ar jūrų kiaulytėmis rezultatais (B.6 arba OECD bandymų metodika 406) (13), ir todėl jos suteikia galimybę įrodyti LLNA lygiavertes ar geresnes naudojimo charakteristikas), įtrauktos į LLNA PS. Šių cheminių medžiagų nustatymo kriterijai:

— į etaloninių cheminių medžiagų sąrašą buvo įtrauktos tų tipų medžiagos, kurių odos jautrinimo potencialas ir atsakų, kuriuos galima išmatuoti ar numatyti LLNA, intervalas paprastai būdavo bandomas,

— medžiagos yra aiškiai apibrėžtos cheminės struktūros,

— apie kiekvieną medžiagą turėta LLNA duomenų iš bandymų su jūrų kiaulytėmis (t. y. B.6; OECD bandymų metodika 406) (13) ir (kai įmanoma) iš žmonių, ir

— medžiagas lengva gauti iš komercinių šaltinių.

Rekomenduojamos etaloninės cheminės medžiagos išvardytos 1 lentelėje. Tyrimuose, kuriuose naudojamos siūlomos etaloninės cheminės medžiagos, turi būti naudojami nešikliai, su kuriais jos išvardytos 1 lentelėje. Tais atvejais, kai nurodytos medžiagos negalima gauti, pateikus pakankamą pagrindimą, galima naudoti kitas medžiagas, kurios atitinka išvardytus atrankos kriterijus.

▼M3

1 lentelė

LLNA PS rekomenduojamos etaloninės cheminės medžiagos

Nr.	Cheminės medžiagos (1)	CAS Nr.	Pavidalas	Neš. (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x - 2,0x EC3	Tikrasis EC3 intervalas	LLNA vs. GP	LLNA vs. žmonės
1	5-chlor-2-metil-4-izotiazolin-3-onas (CMI)/ 2-metil-4-izotiazolin-3-onas (MI) (5)	26172–55–4/2682–20–4	SKK.	DMF	0,009	1	0,0045–0,018	NA	+/+	+/+
2	DNCB	97–00–7	Kiet.	AOO	0,049	15	0,025–0,099	0,02–0,094	+/+	+/+
3	4-fenilenediaminas	106–50–3	Kiet.	AOO	0,11	6	0,055–0,22	0,07–0,16	+/+	+/+
4	Kobalto chloridas	7646–79–9	Kiet.	DMSO	0,6	2	0,3–1,2	0,4–0,8	+/+	+/+
5	Izoeugenolis	97–54–1	SKK.	AOO	1,5	47	0,77–3,1	0,5–3,3	+/+	+/+
6	2-merkaptobenzotiazolas	149–30–4	Kiet.	DMF	1,7	1	0,85–3,4	NA	+/+	+/+
7	Citralas	5392–40–5	SKK.	AOO	9,2	6	4,6–18,3	5,1–13	+/+	+/+
8	HCA	101–86–0	SKK.	AOO	9,7	21	4,8–19,5	4,4–14,7	+/+	+/+
9	Eugenolis	97–53–0	SKK.	AOO	10,1	11	5,05–20,2	4,9–15	+/+	+/+
10	Fenilo benzoatas	93–99–2	Kiet.	AOO	13,6	3	6,8–27,2	1,2–20	+/+	+/+
11	Cinamilo alkoholis (stirolis)	104–54–1	Kiet.	AOO	21	1	10,5–42	NA	+/+	+/+
12	Imidazolidinilo šlapalas	39236–46–9	Kiet.	DMF	24	1	12–48	NA	+/+	+/+
13	Metilo metakrilatas	80–62–6	SKK.	AOO	90	1	45–100	NA	+/+	+/+
14	Chlorobenzenas	108–90–7	SKK.	AOO	25	1	NT	NT	–/–	–/ (*)
15	Izopropanolis	67–63–0	SKK.	AOO	50	1	NT	NT	–/–	–/+

▼M3

Nr.	Cheminės medžiagos (1)	CAS Nr.	Pavidalas	Neš. (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x - 2,0x EC3	Tikrasis EC3 intervalas	LLNA vs. GP	LLNA vs. žmonės
16	Pieno rūgštis	50–21–5	SKK.	DMSO	25	1	NT	NT	–/–	–/ (*)
17	Metilo salicilatas	119–36–8	SKK.	AOO	20	9	NT	NT	–/–	–/–
18	Salicilo rūgštis	69–72–7	Kiet.	AOO	25	1	NT	NT	–/–	–/–
Pasirinktinės medžiagos, skirtos geresnėms naudojimo charakteristikoms, palyginti su LLNA, įrodyti										
19	Natrio laurilo sulfatas	151–21–3	Kiet.	DMF	8,1	5	4,05–16,2	1,5–17,1	+/–	+/–
20	Etilenglikolio dimetakrilatas	97–90–5	SKK.	MEK	28	1	14–56	NA	+/–	+/+
21	Ksilolas	1330–20–7	SKK.	AOO	95,8	1	47,9–100	NA	+/ (**)	+/–
22	Nikelio chloridas	7718–54–9	Kiet.	DMSO	5	2	NT	NT	–/+	–/+

Santrumpos: AOO = acetono ir alyvų aliejaus mišinys (4:1, tūrio dalys); CAS Nr. = Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos numeris; DMF = *N,N*-dimetilformamidas; DMSO = dimetilsulfoksidas; DNCB = 2,4-dinitrochlorbenzenas; EC3 = numatyta koncentracija, reikalinga dirginimo rodikliui 3 pasiekti; GP = bandymo su jūrų kiaulytėmis rezultatas (t. y. B. 6 arba OECD bandymų metodika 406) (13); HCA = heksilcinamono aldehidas; SKK. = skystis; LLNA = pelių Vietinio limfmazgio bandymo rezultatas (t. y. B. 42 arba OECD bandymų metodika 429) (1); MEK = metiletilketonas; NT = netaikoma, nes dirginimo rodiklis < 3; NA = neapskaičiuota, nes duomenys gauti iš vieno tyrimo; Kiet. = kietoji medžiaga; Neš. = bandymo nešiklis.

(*) Laikoma, kad tai nėra jautrinanti medžiaga žmonėms, remiantis tuo, kad nėra gauta jokių klinikinių odos lopo mėginio rezultatų, jos nėra tarp odos lopo bandymų rinkinio alergenų ir nėra gauta pranešimų apie žmonių jautrinimą.

(**) GP duomenų neturima/.

(1) Cheminės medžiagos paruošiamos kasdien, nebent stabilumo duomenys rodo, kad jas galima laikyti ilgesnį laiką.

(2) Dėl galimo skirtingų nešiklių poveikio LLNA naudojimo charakteristikoms, turi būti naudojamas kiekvienai etaloninei cheminei medžiagai rekomenduojamas nešiklis (24)(32).

(3) Vidutinė vertė, jei turima daugiau kaip viena EC3 vertė. Neigiamo rezultato medžiagoms (t. y. kurių dirginimo rodiklis < 3), pateikta didžiausia išbandyta koncentracija.

(4) LLNA tyrimų, kurių duomenys gauti, skaičius.

(5) Prekyboje žinomas kaip „Kathon CG“ (CAS Nr. 55965–84–9), kuris yra CMI ir MI mišinys santykiu 3:1. Kiekvieno komponento santykinės koncentracijos įvairuoja nuo 1,1 % iki 1,25 % (CMI) ir nuo 0,3 % iki 0,45 % (MI). Neaktyviosios medžiagos yra magnio druskos (nuo 21,5 % iki 24 %) ir vario nitratas (nuo 0,15 % iki 0,17 %), o likusią preparato dalį sudaro vanduo (nuo 74 % iki 77 %). „Kathon CG“ tiekia „Sigma-Aldrich“ ir „Rohm and Haas“ (dabar – „Dow Chemical Corporation“).

▼M3

III. **Nustatyti patikimumo ir tikslumo standartai**

7. Panašaus arba modifikuoto LLNA metodo tikslumas turi būti toks pat kaip LLNA PS arba jį viršyti; vertinama naudojant 18 būtinųjų etaloninių cheminių medžiagų, kurios turi būti naudojamos. Taikant naują arba modifikuotą metodą turi būti teisingai klasifikuojama, pagal sprendimą „taip“ arba „ne“. Vis dėlto, taikant naują arba modifikuotą metodą gali būti tiksliai klasifikuojamos ne visos iš būtinųjų etaloninių cheminių medžiagų, kurios turi būti naudojamos. Jei, pvz., vienas iš silpnų jautriklių klasifikuojamas neteisingai, galima būtų atsižvelgti į neteisingo klasifikavimo loginį pagrindą ir atitinkamus papildomus duomenis (pvz., bandymo rezultatus, pagal kuriuos teisingai klasifikuojamos kitos medžiagos, kurių fizinės, cheminės ir jautrinančiosios savybės yra panašios į neteisingai klasifikuotos cheminės medžiagos savybes), kad būtų įrodytos lygiavertės naudojimo charakteristikos. Tokiais atvejais naujo ar modifikuoto LLNA bandymo metodo tinkamumo patvirtinimo išvada būtų vertinama kiekvienu konkrečiu atveju.

Atkuriamumas laboratorijoje

8. Siekiant nustatyti atkuriamumą laboratorijoje, naujas arba modifikuotas LLNA metodas įvertinamas naudojant jautrinančią medžiagą, kuri tinkamai apibūdinama taikant LLNA. Todėl LLNA PS grindžiami heksilcinamono aldehido (HCA) kartotinių bandymų rezultatų variantiškumu. Siekiant įvertinti variantiškumą laboratorijoje, keturiais atskirais bandymais, tarp kurių turi praeiti ne mažiau kaip savaitė, gaunamos numatytosios slenkstinės koncentracijos (angl. *threshold estimated concentration*, ECt) vertės. Priimtinas atkuriamumas laboratorijoje nusakomas laboratorijos gebėjimu, atliekant kiekvieną HCA bandymą, gauti ECt vertes nuo 5 % ir 20 %, kas atitinka 0,5–2,0 kartų vidutinės EC3 vertės, nustatytos HCA (10 %), taikant LLNA (žr. 1 lentelę), intervalą.

Atkuriamumas tarp laboratorijų

9. Naujo arba modifikuoto LLNA metodo atkuriamumas tarp laboratorijų įvertinamas naudojant dvi jautrinančias medžiagas, kurios tinkamai apibūdinamos taikant LLNA. LLNA PS grindžiami skirtingose laboratorijose atliktų HCA ir 2,4-dinitrochlorbenzeno (DNCB) bandymų rezultatų variantiškumu. ECt vertės turi būti gautos nepriklausomai, vienu tyrimu, atliktu ne mažiau kaip trijose skirtingose laboratorijose. Norint įrodyti priimtiną atkuriamumą tarp laboratorijų, kiekviena laboratorija turi gauti HCA ECt vertes nuo 5 % iki 20 % ir DNCB vertes nuo 0,025 % iki 0,1 %, kas atitinka 0,5–2,0 kartų vidutinės EC3 vertės, nustatytos atitinkamai HCA (10 %) ir DNCB (0,05 %), taikant LLNA (žr. 1 lentelę), intervalą.

▼M3

2 priedėlis

Apibrėžtys

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių artumas. Tikslumas yra bandymo metodo naudojimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo metodo rezultatų dalį (14).

Palyginamoji medžiaga – jautrinanti arba nejautrinanti medžiaga, naudojama kaip bandomosios medžiagos palyginimo standartas. Palyginamoji medžiaga turi pasižymėti tokiomis savybėmis: i) pastoviu (-iais) ir patikimu (-ais) šaltiniu (-iais), ii) struktūriniu ir funkciniu panašumu į bandomų medžiagų klasę, iii) žinomomis fizikinėmis ir cheminėmis charakteristikomis, iv) patvirtinančiais duomenimis apie žinomus poveikius ir v) žinomu potencialu norimų atsakų intervale.

Numatytasis koncentracijos slenkstis (ECt) – numatyta bandomosios medžiagos koncentracija, reikalinga, kad būtų pasiektas dirginimo rodiklis, rodantis teigiamą atsaką.

Numatytoji koncentracija Nr. 3 (EC3) – numatyta bandomosios medžiagos koncentracija, reikalinga, kad būtų pasiektas dirginimo rodiklis, lygus trims.

Klaidingai neigiamas rezultatas – bandymo metodu bandomoji medžiaga neteisingai įvertinta kaip neigiama arba neaktyvi, nors iš tiesų yra teigiama arba aktyvi.

Klaidingai teigiamas rezultatas – bandymu bandomoji medžiaga neteisingai įvertinta kaip teigiama arba aktyvi, nors iš tiesų yra neigiama arba neaktyvi.

Pavojus – neigiamo poveikio sveikatai arba ekologijai galimybė. Neigiamas poveikis pasireiškia tik tada, jei veikimas medžiaga yra pakankamo lygio.

Atkuriamumas tarp laboratorijų – laipsnio, kuriuo skirtingos kvalifikuotos laboratorijos, taikydamos tą patį protokolą ir bandančios tas pačias bandomąsias medžiagas, gali gauti kokybiškai ir kiekybiškai panašius rezultatus, matas. Atkuriamumas tarp laboratorijų nustatomas atliekant pradinio tinkamumo patvirtinimo ir tinkamumo pavirtinimo procesus ir rodo laipsnį, kuriuo bandymą galima sėkmingai perkelti tarp laboratorijų; tai dar vadinama tarplaboratoriniu atkuriamumu (14).

Atkuriamumas laboratorijoje – laipsnio, kuriuo kvalifikuoti darbuotojai toje pačioje laboratorijoje gali sėkmingai atkartoti rezultatus, taikydami konkretų protokolą skirtingu metu, matas. Dar vadinamas laboratoriniu atkuriamumu (14).

„Aš irgi“ (angl. me-too) bandymas – šnekamosios kalbos pasakymas, kuriuo vadinamas bandymo metodas, struktūriškai ir funkciškai panašus į patvirtinto tinkamumo ir pripažintą pamatinį bandymo metodą. Toks bandymo metodas gali būti taikomas palyginamajam tinkamumo patvirtinimui. Taikomas pakaičiui su panašiu bandymo metodu (14).

Riktas – pastebėjimas, kad vertė labai skiriasi nuo kitų atsitiktinio populiacijos ėminio verčių.

Naudojimo charakteristikų standartai (angl. PS) – standartai, pagrįsti patvirtinto tinkamumo bandymo metodu, sudarantys pagrindą įvertinti siūlomo funkciškai ir mechanistiškai panašaus bandymo metodo palyginamumą. Įtraukiami šie dalykai: i) esminiai bandymo metodo komponentai, ii) būtinasis sąrašas etaloninių cheminių medžiagų, parinktų iš tų medžiagų, kurios naudojamos patvirtinto tinkamumo bandymo metodo priimtinoms naudojimo charakteristikoms įrodyti, ir iii) panašus tikslumo ir patikimumo lygis, atsižvelgiant į pasiekiamąjį patvirtinto tinkamumo bandymo metodu, kurį siūlomas bandymo metodas turi turėti vertinamas pagal būtinąjį etaloninių cheminių medžiagų sąrašą (14).

Patentuotas bandymo metodas – bandymo metodas, su kuriuo susijusi gamyba ir platinimas yra ribojami patentais, autoriaus teisėmis, prekės ženklais ir kt.

▼**M3**

Kokybės užtikrinimas – valdymo procesas, per kurį asmenys, nepriklausomi nuo atliekančiųjų bandymus, įvertina, kaip laboratorija laikosi bandymo standartų, reikalavimų ir užrašų saugojimo procedūrų bei duomenų perdavimo tikslumo.

Etaloninės cheminės medžiagos – cheminės medžiagos, kurios yra pasirinktos naudoti tinkamumo patvirtinimo procese ir kurių atveju atsakas *in vitro* arba *in vivo* etaloninėje bandymo sistemoje arba dominančių rūšių atsakas jau žinomas. Šios cheminės medžiagos turi būti tipinės cheminių medžiagų klasėms, kurioms numatyta taikyti bandymo metodą, ir turi perteikti visus atsakus, kurių tikimasi iš cheminių medžiagų, kurioms gali būti taikomas metodas – tiek stiprius, tiek silpnus, tiek neigiamus. Skirtingais tinkamumo patvirtinimo proceso etapais ir skirtingiems bandymo metodams bei paskirtims gali prireikti skirtingų etaloninių cheminių medžiagų rinkinių (14).

Tinkamumas – bandymo ir dominančio poveikio sąryšio ir bandymo prasmingumo bei naudingumo konkrečiam tikslui apibūdinimas. Tai yra matas, kiek tiksliai bandymu išmatuojamas ar numanomas dominantis biologinis poveikis. Tinkamumas apima bandymo metodo tikslumo (sutapimo) aspektą (14).

Patikimumas – juo įvertinamas laipsnis, kuriuo bandymo metodas gali būti ilgainiui atkartojamai atliekamas vienoje ir skirtingose laboratorijose, taikant tą patį protokolą. Jis įvertinamas skaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų (14).

Odos jautrinimas – imunologinis procesas, vykstantis paveikų individą išoriškai paveikus cheminiu alergenu, kuris sukelia odos imuninį atsaką, dėl kurio gali atsirasti kontaktinis jautrinimas.

Dirginimo rodiklis (angl. SI) – vertė, apskaičiuojama bandomosios medžiagos jautrinimo potencialui įvertinti – tai yra paveiktų grupių proliferacijos sąryšio su lygiagrečios nešiklio kontrolinės grupės proliferacija koeficientas.

Bandomoji medžiaga (dar vadinama bandomąja chemine medžiaga) – bet kuri medžiaga ar mišinys, bandomi taikant šį bandymų metodą.

Patvirtinto tinkamumo bandymo metodas – bandymo metodas, kurio tinkamumo patvirtinimo tyrimai atlikti, nustatant tinkamumą (įskaitant tikslumą) ir patikimumą konkrečiam tikslui. Svarbu pažymėti, kad patvirtinto tinkamumo bandymo metodas gali būti nepakankamų naudojimo charakteristikų tikslumo ir patikimumo prasme, kad būtų pripažintas tinkamu siūlomam tikslui (14).

▼C1

B.43. NEUROTOKSIŠKUMO GRAUŽIKAMS BANDYMAS

1. METODAS

Šis metodas atitinka OECD TG 424 (1997).

Šis bandymo metodas buvo sukurtas gauti informacijai, kuri yra būtina norint patvirtinti arba papildomai apibūdinti galimą cheminių medžiagų neurotoksinį poveikį suaugusiems gyvūnams. Šį metodą galima derinti su egzistuojančiais bandymo metodais, darant kartotinės dozės toksiškumo bandymus, arba daryti atskirą bandymą. Rekomenduojama susipažinti su OECD neurotoksiškumo bandymo strategijos ir metodų vadovu (1), kuris padėtų planuoti bandymus, pagrįstus šiuo bandymo metodu. Šis vadovas yra ypač reikalingas, kai rengiamasi daryti šiame metode rekomenduotų įprastų stebėjimų ir bandymo metodikų pakeitimus. Vadovas buvo parengtas norint palengvinti kitų bandymo metodikų, taikytinų konkrečiomis aplinkybėmis, pasirinkimą.

Šis metodas neskirtas įvertinti neurotoksiškumą vystymuisi.

1.3.4. ĮVADAS

Vertinant cheminių medžiagų toksines savybes, svarbu atsižvelgti į neurotoksiškumo galimybę. Jau kartotinės dozės bandymų metode sisteminiam toksiniam poveikiui nustatyti vykdomi galimo neurotoksiškumo stebėjimai. Šis bandymo metodas gali būti taikomas planuojant bandymą, kuris leistų gauti papildomos informacijos arba patvirtinti neurotoksinį poveikį, pastebėtą kartotinės dozės sisteminio toksiškumo bandymuose. Tačiau nagrinėjant galimą tam tikrų cheminių medžiagų klasių neurotoksiškumą, gali būti prieita prie išvados, kad šios medžiagos galėtų būti tinkamiau įvertintos taikant šį metodą, kai neturima išankstinių duomenų apie galimą neurotoksiškumą, kurie būtų gauti vykdant kartotinės dozės sisteminio toksiškumo bandymus. Tai galėtų būti, pvz.:

— neurologinių požymių arba neuropatologinių pažeidimų stebėjimas, darant kitus nei kartotinės dozės sisteminio toksiškumo bandymus; arba

— struktūros panašumų buvimas arba kita informacija, kuri leistų medžiagas susieti su kitomis neurotoksiškomis medžiagomis.

Be to, gali būti kitų pavyzdžių, kai galėtų tikti šis bandymų metodas; daugiau informacijos pateikiama nuorodoje (1).

Šis metodas buvo kuriamas taip, kad jį būtų galima pritaikyti konkretiems poreikiams, norint patvirtinti specifinį cheminės medžiagos histopatologinį neurotoksiškumą ir jos neurotoksiškumą, veikiantį elgseną, be to, apibūdinti ir kiekybiškai įvertinti neurotoksinį poveikį.

▼C1

Anksčiau neurotoksiškumas buvo prilyginamas neuropatijai, esant neuropatologiniams pažeidimams arba neurologinių funkcijų sutrikimams, pvz., konvulsijos, paralyžius arba drebulys. Nors neuropatija yra svarbus neurotoksiškumo pasireiškimas, dabar paaiškėjo, kad yra daug kitų toksinio poveikio nervų sistemai požymių (pvz., motorinės koordinacijos netekimas, jutimo trūkumai, mokymosi ir atminties sutrikimai), kurių galima nepastebėti darant neuropatologinius arba kitų tipų bandymus.

Šis neurotoksiškumo bandymo metodas skirtas nustatyti pagrindinį neurobihevioristinį ir neuropatologinį poveikį suaugusiems graužikams. Nors poveikis elgesiui gali rodyti neigiamą įtaką organizmui ir tuo atveju, kai morfologinių pakitimų nėra, ne visi elgesio pakitimai yra būdingi nervų sistemai. Taigi visus pastebėtus pakitimus reikėtų įvertinti kartu su susijusiais histopatologiniais, hematologiniais arba biocheminiais duomenimis ir kitų sisteminio toksinio poveikio tipų duomenimis. Šiam metodui numatytus bandymus neurotoksiniam poveikiui apibūdinti ir kiekybiškai įvertinti sudaro specifinės histopatologinio ir elgesio įvertinimo metodikos, kurias papildomai gali patvirtinti elektrofiziologiniai ir (arba) biocheminiai tyrimai (1) (2) (3) (4).

Neurotoksinės medžiagos gali veikti įvairias nervų sistemos vietas ir įvairiais veikimo mechanizmais. Kadangi jokiu vienu bandymų rinkiniu negalima išsamiai įvertinti visų medžiagų neurotoksiškumo, gali tekti taikyti kitus *in vivo* arba *in vitro* bandymus, atitinkančius pastebėtą arba numatomą neurotoksiškumo tipą.

Be to, šis bandymo metodas gali būti taikomas atsižvelgiant į rekomendacijas, pateiktas OECD neurotoksiškumo bandymo strategijos ir metodų vadove (1), siekiant parengti bandymus, skirtus papildomai apibūdinti dozės ir reakcijos santykį arba padidinti jo kiekybinio įvertinimo jautrumą, kad būtų galima geriau įvertinti nepastebėto neigiamo poveikio ribą arba pateikti neginčijamų įrodymų apie žinomus arba spėjamus cheminėsmedžiagos keliamus pavojus. Pvz., galima parengti bandymus neurotoksiškumo mechanizmui (-ams) identifikuoti ir įvertinti arba papildyti duomenis, kurie jau buvo gauti taikant bazines elgesio ir neuropatologinių stebėjimų metodikas. Darant tokius bandymus nereikia pakartotinai gauti duomenų, kurie gaunami taikant šiame metode rekomenduotas etalonines metodikas, jei tokie duomenys jau yra ir nėra laikomi būtinais tyrimo rezultatams aiškinti.

Šis neurotoksiškumo bandymas, daromas atskirai arba kartu su kitais bandymais, suteikia informacijos, kuri leidžia:

— nustatyti, ar nervų sistema yra visam laikui arba grįžtamai paveikta bandomąja chemine medžiaga;

— papildomai apibūdinti nervų sistemos pakitimus, susijusius su cheminės medžiagos veikimu, ir suprasti veikiančio mechanizmo esmę;

▼C1

— nustatyti dozės ir reakcijos bei laiko ir reakcijos santykius, kad būtų galima įvertinti nepastebėto neigiamo poveikio ribą (kuri gali būti naudojama nustatant cheminės medžiagos saugos kriterijus).

Taikant šį bandymo metodą, bandomoji medžiaga duodama per viršinamąjį traktą. Kiti medžiagos davimo būdai (pvz., per odą arba per kvėpavimo takus) gali būti tinkamesni ir gali tekti keisti rekomenduojamas metodikas. Davimo būdo pasirinkimas priklauso nuo žmonių sąlyčio su medžiaga aplinkybių ir turimos informacijos apie toksikologiją ir kinetiką.

1.2. APIBRĖŽTYS

Neigiamas poveikis – bet koks su veikimu medžiaga susijęs pakitimas, palyginti su pamatine verte, mažinantis organizmo gebą išgyventi, daugintis arba prisitaikyti prie aplinkos.

Dozė – skirtas bandomosios medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama bandomosios medžiagos mase bandomojo gyvūno masės vienetui (pvz., mg/kg) arba kaip pastovios koncentracijos pašare vertės (ppm).

Dozavimas – bendrasis terminas dozei, jos davimo dažnumui ir trukmei apibūdinti.

Neurotoksiškumas – nervų sistemos struktūros arba funkcijos neigiamas pakitimas dėl veikimo chemine, biologine arba fizikine medžiaga.

Neurotoksiška medžiaga – bet kuri cheminė, biologinė arba fizikinė medžiaga, galinti sukelti neurotoksinį poveikį.

NOAEL – nepastebėto neigiamo poveikio ribos santrumpa, tai yra didžiausia dozė, nesukelianti su veikimu susieto neigiamo poveikio.

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandomoji cheminė medžiaga duodama kelioms laboratorinių graužikų grupėms per viršinamąjį traktą, naudojant kelias dozės koncentracijos vertes. Paprastai tenka duoti kartotines dozes ir dozavimo režimas gali būti 28 parų, pusiau lėtinis (90 parų) arba lėtinis (1 metai arba ilgiau). Be to, šiam bandymo metodui parengtos metodikos gali būti taikomos darant ūmaus neurotoksiškumo bandymą. Gyvūnai bandomi siekiant aptikti arba apibūdinti elgesio ir (arba) neurologines anomalijas. Kiekvienu stebėjimo laikotarpiu įvertinami įvairūs elgesio, kuriam neurotoksiškos medžiagos galėtų daryti įtaką, aspektai. Pasibaigus bandymui, kiekvienos grupės kiekvienos lyties gyvūnų pogrupio gyvūnams daroma perfuzija *in situ* ir ruošiami bei tiriami galvos bei stuburo smegenų ir periferiniai nervų preparatai.

Kai daromas atskiras (stand-alone) bandymas neurotoksiškumui aptikti arba neurotoksiniam poveikiui apibūdinti, kiekvienos grupės gyvūnai, kurie nebuvo panaudoti perfuzijai ir vėlesniam histopatologiniam tyrimui (žr. 1 lentelę), gali būti naudojami darant specialius elgesio bandymo, neuropatologinius, neurocheminius arba elektrofiziologinius bandymus, kuriais galima būtų papildyti duomenis, gautus darant šiame bandymo metode numatytus tipinius bandymus (1). Šie papildomi bandymai gali būti ypač naudingi, kai praktiniai stebėjimai arba numatomas poveikis rodo specifinį cheminės medžiagos neurotoksiškumo tipą arba veikiamą organą. Be to, likusieji gyvūnai gali būti naudojami darant vertinimus, kurie yra numatyti taikant graužikų kartotinės dozės toksiškumo bandymų metodus.

▼C1

Kai šis bandymo metodas vykdomas kartu su kitais bandymo metodais, reikia turėti pakankamą gyvūnų skaičių norint vykdyti abiem bandymams reikalingus stebėjimus.

1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.4.1. **Gyvūnų rūšies pasirinkimas**

Tinkamiausia graužikų rūšis yra žiurkės, nors galima naudoti kitas graužikų rūšis, jei toks naudojimas būtų pagrįstas. Paprastai naudojamos laboratorinės jaunų, suaugusių ir sveikų gyvūnų veislės. Patelės turi būti neturėjusios palikuonių ir neapvaisintos. Dozė paprastai pradedama duoti kiek įmanoma greičiau po atjunkymo, ir būtų gerai, kad gyvūnui būtų ne daugiau kaip šešios savaitės, tačiau bet kuriuo atveju anksčiau nei gyvūnas sulaukia devynių savaičių. Vis dėlto, kai bandymas daromas kartu su kitais bandymais, šį amžiaus reikalavimą gali tekti keisti. Naudojamų gyvūnų masė ir vidutinė kiekvienos lyties masė bandymo pradžioje neturi skirtis daugiau kaip ± 20 %. Kai prieš ilgalaikį bandymą daromas trumpalaikis kartotinės dozės bandymas, abiem bandymams turi būti naudojami tos pačios veislės ir šaltinio gyvūnai.

1.4.2. **Laikymo ir šėrimo sąlygos**

Eksperimentinių gyvūnų patalpos temperatūra turėtų būti 22 °C (± 3 °C). Nors santykinė oro drėgmė turėtų būti mažiausiai 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikėtų užtikrinti 50–60 %. Apšvietimas turi būti dirbtinis, esant 12 h šviesos ir 12 h tamsos sekai. Reikia kiek įmanoma sumažinti didelį neištisinį triukšmą. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, neribojant geriamo vandens kiekio. Pašaro pasirinkimui gali turėti įtakos būtinybė tinkamai įmaišyti bandomąją medžiagą, duodant ją šiuo būdu. Gyvūnai narveliuose gali būti laikomi atskirai arba mažomis tos pačios lyties grupėmis.

1.4.3. **Gyvūnų ruošimas**

Sveiki ir jauni gyvūnai atsitiktinai suskirstomi į bandomąją ir kontrolinę grupes. Narveliai išdėstomi taip, kad būtų kiek įmanoma sumažintas bet koks galimas poveikis dėl narvelio vietos. Gyvūnai paženklinami, kad juos būtų įmanoma identifikuoti, ir laikomi narveliuose mažiausiai penkias (5) paras prieš bandymo pradžią, kad galėtų priprasti prie laboratorinių sąlygų.

1.4.4. **Davimo būdas ir dozių ruošimas**

Taikant šį bandymo metodą, bandomoji medžiaga duodama per virškinamąjį traktą. Duoti per virškinamąjį traktą galima naudojant zondą, su pašaru, su geriamuoju vandeniu arba duodant kapsules. Galima naudoti kitus davimo būdus (pvz., per odą arba per kvėpavimo takus), bet tada gali tekti keisti rekomenduojamas metodikas. Davimo būdo pasirinkimas priklauso nuo žmogaus sąlyčio su medžiaga ypatybių ir turimos informacijos apie toksikologiją ar kinetiką. Reikia pagrįsti davimo būdo pasirinkimą ir nurodyti dėl to daromus šio bandymo metodo procedūrų pakeitimus.

▼C1

Prireikus bandomoji medžiaga ištirpinama arba suspenduojama tinkamame nešiklyje. Rekomenduojama iš pradžių apsvarstyti galimybę naudoti vandeninį tirpalą ar suspensiją, vėliau tirpalą ar emulsiją aliejuje (pvz., kukurūzų aliejuje) ir tik tuomet galimybę tirpinti kitame nešiklyje. Turi būti žinomos nešiklio toksinės savybės. Be to, reikėtų atsižvelgti į šias nešiklio charakteristikas: poveikį absorbcijai, pasiskirstymui, medžiagų apykaitai ir bandomosios medžiagos sulaikymui, dėl ko gali keistis bandomosios medžiagos cheminės savybės; poveikį maisto ar vandens suvartojimui arba gyvūnų įmitimui.

1.5. BANDYMO EIGA

1.5.1. **Gyvūnų skaičius ir lytis**

Darant atskirą bandymą kiekvienos dozės grupei ir kontrolinei grupei turi būti naudojama mažiausiai 20 gyvūnų (10 patelių ir 10 patinų) norint išsamiai įvertinti klinikinių ir funkcinių stebėjimų rezultatus. Baigus bandymą mažiausiai penkiems patinams ir penkioms patelėms iš šių 10 patinų ir 10 patelių daroma perfuzija *in situ* ir jie naudojami išsamiam neurohistopatologiniam tyrimui. Tais atvejais, kai neurotoksiškumo požymiai pasireiškia tik ribotam tam tikros dozės grupės gyvūnų skaičiui, reikėtų numatyti šiuos gyvūnus įtraukti į pasirinktųjų perfuzijai gyvūnų skaičių. Kai bandymas daromas kartu su kartotinės dozės toksiškumo bandymu, abiejų bandymų tikslams pasiekti turi būti naudojamas atitinkamas gyvūnų skaičius. Įvairiems bandymų deriniams reikalingas mažiausias gyvūnų skaičius grupėje pateiktas 1 lentelėje. Jei numatomi tarpiniai numarinimai arba planuojama sudaryti grupes poveikio grįžtamumui, jo išsilaikymui arba po apdorojimo vėluojančiam toksiniam poveikiui stebėti, arba kai numatoma daryti papildomus stebėjimus, gyvūnų skaičius turėtų būti padidintas siekiant užtikrinti, kad būtų gyvūnų, reikalingų stebėjimams ir histopatologiniam tyrimui.

1.5.2. **Bandomosios ir kontrolinė grupės**

Paprastai turi būti naudojamos mažiausiai trys skirtingų dozių grupės ir kontrolinė grupė, tačiau, jei įvertinus kitus duomenis nelaukiama poveikio esant kartotinei 1 000 mg/kg kūno masės/parą dozei, galima daryti ribinį bandymą. Jei atitinkamų duomenų nėra, galima daryti intervalo nustatymo bandymą, siekiant palengvinti naudojamos dozės pasirinkimo kelią. Kontrolinės grupės gyvūnai prižiūrimi kaip ir medžiagą gaunančių grupių gyvūnai, išskyrus tai, kad jie neveikiami bandomąja medžiaga. Jei duodant bandomąją medžiagą naudojamas nešiklis, kontrolinė grupė turi gauti didžiausią naudojamą nešiklio tūrį.

1.5.3. **Patikimumo tikrinimas**

Bandymą daranti laboratorija turi pateikti duomenis, įrodančius jos kompetenciją atlikti bandymą ir naudojamų metodikų jautrumą. Tokie duomenys turi patvirtinti įrodymus dėl sugebėjimo rasti ir prireikus kiekybiškai įvertinti skirtingų stebimų parametrų pakitimus, pvz., autonominių požymių, jutiminio aktyvumo, grybšnio jėgos ir motorinio aktyvumo. Informacija apie chemines medžiagas, kurios sukelia įvairių tipų neurotoksinį poveikį ir kurios galėtų būti naudojamos kaip teigiamo poveikio kontrolinės medžiagos, pateikta 2–9 nuorodose. Galima naudoti anksčiau gautus duomenis, jei nebus keičiami esminiai bandymo metodikų aspektai. Rekomenduojama periodiškai atnaujinti anksčiau gautus duomenis. Kiekvieną kartą, kai bandymus daranti laboratorija keičia kurį nors bandymo arba jo metodikų esminį elementą, reikėtų gauti naujų duomenų, kurie rodytų nekintamą metodikų jautrumą.

▼C1

1.5.4. **Dozės pasirinkimas**

Dozės koncentracijos vertes reikėtų pasirinkti atsižvelgiant į visus anksčiau gautus toksiškumo ir kinetinius duomenis apie bandomąją medžiagą arba gimininga medžiagas. Didžiausia dozė turėtų būti pasirinkta siekiant sukelti neurotoksinį poveikį arba aiškų sisteminį toksinį poveikį. Vėliau turėtų būti pasirinkta mažėjanti dozės koncentracijos seka siekiant parodyti kiekvieną su dozės dydžiu susietą reakciją ir nepastebėto neigiamo poveikio ribą (NOAEL), atitinkantį mažiausią dozę. Iš esmės turėtų būti nustatyti tokių dozių dydžiai, kad būtų įmanoma atskirti pirminį toksinį poveikį nervų sistemai ir su sisteminiu toksiškumu susietą poveikį. Paprastai pakanka nuo dviejų iki trijų dozių intervalų, ir dažnai gerai būtų naudoti ketvirtą bandymo grupę, norint naudoti labai didelius intervalus tarp dozių (pvz., daugiklis didesnis kaip 10). Jei yra patikimų duomenų apie žmogaus sąlytį su medžiaga, į juos irgi reikia atsižvelgti.

1.5.5. **Ribinis bandymas**

Jei darant bandymą pagal šiame bandyme aprašytas metodikas su viena mažiausiai 1 000 mg/kg kūno masės/parą doze neurotoksinis poveikis nepastebimas arba jei toksinio poveikio nelaukiama, atsižvelgiant į turimus duomenis apie gimininges struktūros junginius, nėra nebūtina daryti visą bandymą, naudojant tris dozių koncentracijas. Atsižvelgiant į numatomą žmogaus sąlytį su medžiaga gali tekti naudoti didesnes per virškinamąjį traktą duodamas ribinio bandymo dozes. Kalbant apie kitus davimo būdus, pvz., per kvėpavimo takus arba veikimą per odą, bandomosios medžiagos fizikinės ir cheminės savybės dažnai gali apibrėžti didžiausią pasiekiamą veikimo koncentraciją. Darant ūmaus poveikio per virškinamąjį traktą bandymą ribinio bandymo dozė turi būti mažiausiai 2 000 mg/kg.

1.5.6. **Dozavimas**

Gyvūnai gauna bandomosios medžiagos dozę kasdien, septynias dienas per savaitę, ne trumpiau kaip 28 paras; penkių parų dozės režimas arba trumpesnė veikimo trukmė turi būti pagrįsti. Kai bandomoji medžiaga duodama per zondą, naudojamas skrandžio zondas arba tinkamas intubacinis vamzdelis. Didžiausias gyvūnui duodamas vienkartinis skysčio tūris priklauso nuo bandomo gyvūno dydžio. Tūris neturėtų būti didesnis kaip 1 ml/100 g kūno masės. Tačiau vandeninių tirpalų atveju galima duoti 2 ml/100 g kūno masės. Išskyrus dirginančias arba ėsdinančias medžiagas, kurios esant didesnei koncentracijai turi sunkesnį poveikį, bandomojo tirpalo tūrio nepastovumas turi būti kiek įmanoma sumažintas, keičiant koncentraciją taip, kad visų dozių tūris būtų pastovus.

Jei medžiagos duodamos su pašaru arba geriamuoju vandeniu, svarbu užtikrinti, kad naudojami bandomosios medžiagos kiekiai netrukdytų įprastai mitybai arba vandens pusiausvyrai. Kai bandomoji medžiaga duodama su pašaru, galima naudoti pastovią koncentraciją (ppm) arba pastovią dozę pagal gyvūno kūno masę; naudotas variantas turi būti nurodytas. Jei medžiaga duodama per zondą, dozė turėtų būti duodama kiekvieną dieną panašiu laiku ir reguliuojama pastoviam dozės ir gyvūno kūno masės santykiui užtikrinti. Jei prieš ilgalaikį bandymą daromas kartotinės dozės bandymas, darant abu bandymus turi būti naudojamas panašus pašaras. Jei darant ūmaus toksiškumo bandymus neįmanoma duoti vienkartinę dozę, ji gali būti duodama mažesnėmis dalimis ne ilgiau kaip per 24 h.

▼C1

1.6. STEBĖJIMAI

1.6.1. **Stebėjimų ir tyrimų dažnumas**

Darant kartotinės dozės bandymus, stebėjimo laikotarpis turi atitikti dozavimo laikotarpį. Darant ūmaus toksiškumo bandymus, stebima 14 parų po medžiagos davimo. Pagalbinių grupių gyvūnai, kurie negauna bandomosios medžiagos pasibaigus veikimo laikotarpiui, irgi turi būti stebimi tokį laikotarpį.

Stebėjimai turi būti daromi pakankamu dažniu siekiant kiek įmanoma padidinti tikimybę aptikti bet kokį elgesio nukrypimą ir (arba) neurologines anomalijas. Reikėtų stebėti kasdien vienodu laiku, atsižvelgiant į didžiausio laukiamo poveikio pasireiškimo laiką po medžiagos davimo. Klinikinių stebėjimų ir funkcinių tyrimų dažnis apibendrintas 2 lentelėje. Jei ankstesniuose bandymuose gauti kinetiniai duomenys rodo, kad stebėjimų, tyrimų arba stebėjimų po tyrimų laikas turi būti kitas, reikėtų patvirtinti kitą laiko grafiką didžiausiam informacijos kiekiui gauti. Padaryti grafiko pakeitimai turi būti pagrįsti.

1.6.1.1. *Bendrosios sveikatos būklės ir gaištamumo ar liguistumo stebėjimas*

Visi gyvūnai turi būti bent kartą per dieną apžiūrėti jų sveikatos būklei nustatyti ir bent du kartus per dieną liguistumui ir gaištamumui nustatyti.

1.6.1.2. *Išsamūs klinikiniai stebėjimai*

Nuodugniai turi būti apžiūrimi visi šiam tikslui atrinkti gyvūnai (žr. 1 lentelę) – kartą prieš pirmą veikimą medžiaga (kad būtų galima daryti to paties gyvūno palyginimus) ir vėliau skirtingais intervalais, atsižvelgiant į bandymo trukmę (žr. 2 lentelę). Pagalbinių sveikstančių gyvūnų grupių nuodugni klinikinė apžiūra turi būti daroma baigiantis pasveikimo laikotarpiui. Nuodugni klinikinė apžiūra daroma ne narvelyje, bet standartiškai įrengtoje vietoje. Stebėjimų rezultatai turi būti kruopščiai užrašyti, naudojant įvertinimo balais sistemas, kurias sudaro kiekvienos apžiūros matavimų kriterijai arba įvertinimo balais skalės. Bandymų laboratorija turi aiškiai apibrėžti taikomus kriterijus arba balų skales. Reikia stengtis užtikrinti, kad bandymo sąlygų skirtumai būtų kiek įmanoma mažesni (išskyrus pagal metodiką susietas su apdorojimu) ir apžiūras darytų patyrę specialistai, kurie nežinotų apie faktinį apdorojimą.

Rekomenduojama apžiūras daryti struktūriniu būdu, kai darant kiekvieną apžiūrą kiekvienam gyvūnui sistemingai taikomi aiškiai apibrėžti kriterijai (įskaitant normalaus „intervalo“ apibrėžimą). „Normalus intervalas“ turi būti tinkamai dokumentuojamas. Turi būti užrašyti visi pastebėti požymiai. Be to, visais įmanomais atvejais turi būti užrašytas pasireiškiančių požymių mastas. Klinikiniai stebėjimai turi apimti odos, kailio, akių, gleivinių, sekrecijų ir ekskrecijų dažnį ir autonominį aktyvumą (pvz., ašarojimą, plaukų pašiaušimą, vyzdžių dydį, neįprastą kvėpavimą ir (arba) kvėpavimą per burną, visus neįprastus šlapinimosi arba tuštinimosi požymius, šlapimo išblukimą), tačiau neapsiriboti vien tuo.

▼C1

Turi būti pažymėta bet kokia neįprasta reakcija, susijusi su kūno padėtimi, aktyvumo lygiu (pvz., naudojimosi tipiniu plotu sumažėjimas arba padidėjimas) ir judesių koordinacija. Užrašomi eisenos (pvz., krypuojanti eisena, ataksija), laikysenos (pvz., kuprojimasis) ir reakcijos į priežiūrą, apgyvendinimą arba kitus aplinkos dirgiklius pakitimai, taip pat kloninių arba toninių judesių, traukulių arba drebulio buvimas, stereotipinis elgesys (per dažnas kūno prisižiūrėjimas, neįprasti galvos judesiai, nuolatinis sukimasis ratu) arba keistas elgesys (pvz., kandžiojimasis arba per didelis laižymasis, savęs žalojimas, vaikščiojimas atbulomis, vokalizacija) arba agresija.

1.6.1.3. *Funkciniai bandymai*

Visiems šiam tikslui atrinktiems gyvūnams dar daromi į nuodugnius klinikinius stebėjimus panašūs funkciniai bandymai vieną kartą prieš paveikimą bandomąja medžiaga ir dažnai vėliau (žr. 1 lentelę). Be to, funkcinių bandymų dažnumas priklauso nuo bandymo trukmės (žr. 2 lentelę). Be 2 lentelėje nustatytų stebėjimo laikotarpių, turėtų būti daromi funkciniai pagalbinių grupių sveikimo stebėjimai kiek įmanoma prieš pat numatytą numarinimą. Funkcinius bandymus turi sudaryti jutiminio aktyvumo bandymai įvairių dirgiklių atžvilgiu [pvz., garsinių, regėjimo ir proprioceptinių dirgiklių (5) (6) (7)], galūnių grybšnio jėgos įvertinimas (8) ir motorinio aktyvumo įvertinimas (9). Motorinis aktyvumas matuojamas naudojant mechanizuotą įtaisą, kuriuo galima nustatyti aktyvumo didėjimą ir mažėjimą. Jei naudojama kita apibrėžta sistema, ji turi būti kiekybinio įvertinimo sistema ir turi būti įrodytas jos jautrumas ir patikimumas. Kiekvienas įtaisas tikrinamas siekiant užtikrinti jų patikimumą bėgant laikui ir įtaisų tarpusavio suderinamumą. Papildomos išsamios informacijos apie metodus pateikta atitinkamose nuorodose. Jei nėra duomenų (pvz., informacijos apie struktūros ir aktyvumo santykį, epidemiologinių duomenų, kitų toksikologinių tyrimų), kurie rodytų galimą neurotoksiškumą, reikėtų numatyti įtraukti labiau specializuotus jutiminės ir motorinės funkcijos arba mokymosi ir atminties tyrimus šiam poveikiui išsamiau ištirti. Daugiau informacijos apie specializuotus tyrimus pateikta (1).

Išimtiniais atvejais funkcinių tyrimų su gyvūnais galima nedaryti, jei gyvūnams pasireiškia tokio laipsnio toksiškumo požymiai, kad tai labai trukdytų atlikti funkcinį tyrimą. Sprendimas neįtraukti gyvūnų į funkcinį tyrimą turi būti pagrįstas.

1.6.2. **Kūno masė ir pašaro ar vandens suvartojimas**

Jei bandymai vyksta mažiau kaip 90 parų, visi gyvūnai turi būti sveriami mažiausiai kartą per savaitę, be to, mažiausiai kas savaitę matuojamas pašaro suvartojimas (vandens suvartojimas, kai bandomoji medžiaga duodama su vandeniu). Darant ilgalaikius bandymus, visi gyvūnai sveriami mažiausiai kartą per savaitę pirmąsias 13 savaičių ir vėliau mažiausiai kas 4 savaites. Pašaro suvartojimas matuojamas (vandens suvartojimas, kai bandomoji medžiaga duodama su vandeniu) mažiausiai kartą per savaitę pirmąsias 13 savaičių ir vėliau maždaug kas tris mėnesius, išskyrus kai sveikatos būklė arba kūno masės kitimas reikalauja daryti kitaip.

▼C1

1.6.3. **Oftalmologiniai tyrimai**

Jei bandymas trunka ilgiau kaip 28 paras, prieš bandomosios medžiagos davimą ir pasibaigus bandymui būtina ištirti visų gyvūnų arba bent vieno didelės dozės grupės ir kontrolinės grupės gyvūno akis, naudojant oftalmoskopą arba lygiavertį tinkamą prietaisą. Jei nustatomi akių pakitimai arba jei klinikiniai požymiai rodo oftalmologinio tyrimo būtinumą, turi būti ištirti visi gyvūnai. Darant ilgalaikius bandymus, akys tiriamos po 13 savaičių. Oftalmologinių tyrimų daryti nebūtina, jei šie duomenys yra gauti darant kitus panašios trukmės ir panašaus dydžio dozių bandymus.

1.6.4. **Hematologiniai ir klinikiniai biocheminiai tyrimai**

Kai neurotoksiškumo bandymas daromas kartu su kartotinės dozės sisteminio toksiškumo bandymu, hematologiniai tyrimai ir klinikiniai biocheminės analizės daromos taip, kaip nurodyta atitinkamame sisteminio toksiškumo bandymo metode. Ėminius reikia imti taip, kad būtų kiek įmanoma sumažintas bet koks neurologinis poveikis elgesiui.

1.6.5. **Histopatologiniai tyrimai**

Turi būti planuojamas neuropatologinis tyrimas, siekiant papildyti ir išplėsti stebėjimų rezultatus, gautus bandymo *in vivo* stadijoje. Mažiausiai 5 kiekvienos lyties ar grupės gyvūnai (žr. 1 lentelę ir kitą pastraipą) fiksuojami *in situ*, taikant visuotinai pripažintus perfuzijos ir fiksavimo metodus (žr. 3 nuorodos 5 skyrių ir 4 nuorodos 50 skyrių). Turi būti užrašyti visi pastebėti dideli pakitimai. Kai bandymas daromas kaip atskiras bandymas neutoksiškoms medžiagoms atrinkti arba neurotoksiniam poveikiui apibūdinti, likusieji gyvūnai gali būti panaudoti specifiniams neurologinio elgesio (10) (11), neuropatologiniams (10) (11) (12) (13), neurocheminiams (10) (11) (14) (15) arba elektrofiziologiniams tyrimams (10) (11) (16) (17), kurie gali papildyti čia aprašytas metodikas ir tyrimus, arba padidinti histopatologiniuose tyrimuose naudojamų gyvūnų skaičių. Šie papildomi tyrimai yra ypač naudingi, kai praktiniai stebėjimai arba numatomas poveikis rodo specifinį neurotoksiškumo tipą arba veikiamą organą (2) (3). Be to, likusieji gyvūnai gali būti panaudoti įprastiems patologiniams įvertinimams, kaip aprašyta kartotinių dozių bandymų metode.

Visi į parafiną įlieti audinio mėginiai dažomi įprastu būdu, pvz., hematoksilinu ir eozinu (H&E), ir daromas mikroskopinis tyrimas. Jei pasireiškia arba įtariami periferinės neuropatijos požymiai, tiriami į plastiką įlieti periferinių nervų audinio ėminiai. Be to, klinikiniai požymiai gali nurodyti papildomas bandymo vietas arba poreikį naudoti specialias dažymo metodikas. Papildomos vietos, kurias reikėtų ištirti, aprašytos nuorodose (3) (4). Be to, konkretiems patologinių pakitimų tipams parodyti gali būti naudojami atitinkami specialūs dažai (18).

▼C1

Tipiniai centrinės ir periferinės nervų sistemos pjūviai tiriami histologiškai (žr. 3 nuorodos 5 skyrių ir 4 nuorodos 50 skyrių). Tiriamas vietas paprastai sudaro: priekinės smegenys, didžiųjų smegenų pusrutulių vidurys, įskaitant hipokampo pjūvį, viduriniosios smegenys, smegenėlės, tiltas, pailgosios smegenys, akis su regos nervu ir tinklaine, stuburo smegenys kaklo ir juosmens sustorėjimų vietose, užpakalinės nugaros smegenų šaknelės mazgai, užpakalinės ir priekinės nugaros smegenų šaknelės pluoštai, proksimalinis sėdmens nervas, proksimalinis blauzdikaulio nervas (prie kelio) ir blauzdikaulio nervo šakos į blauzdos raumenį. Daromas stuburo smegenų ir periferinių nervų skersinis arba įstrižas ir išilginis pjūvis. Reikia atkreipti dėmesį į nervų sistemos vaskuliarizaciją. Be to, turi būti tiriamas raumenų ėminys, visų pirma, blauzdos raumuo. Ypatingą dėmesį reikia kreipti į centrinės ir periferinės nervų sistemų vietas su ląsteline ir pluoštine struktūra, kurios yra žinomos kaip ypač veikiamos neurotoksiškomis medžiagomis.

Informacija apie neuropatologinius pakitimus, paprastai atsirandančius dėl veikimo toksiškomis medžiagomis, pateikta nuorodose (3) (4). Rekomenduojamas audinio ėminių tyrimas etapais, kai iš pradžių lyginami didelės dozės ir kontrolinės grupės gyvūnų audinių pjūviai. Jei lyginant šias grupes neuropatologinių pakitimų nenustatoma, toliau analizuoti nereikia. Jei didelės dozės grupėje pastebimi neuropatologiniai pakitimai, reikia koduoti ir nuosekliai tirti visų galbūt paveiktų audinių ėminius, gautus tarpinės ir mažos dozės grupėms.

Jei kokie nors neuropatologinių pakitimų įrodymai gaunami darant kokybinį tyrimą, daromas antras visų pakitimus turinčių nervų sistemos sričių tyrimas. Visų dozių grupių galimai paveiktų sričių pjūviai koduojami ir atsitiktinai paskiriami tirti, nenurodant kodo. Turi būti užrašytas kiekvieno pažeidimo dažnumas ir sunkumas. Įvertinus visas visų dozių grupių sritis, kodą galima atskleisti ir daroma statistinė analizė dozės ir reakcijos santykiui įvertinti. Turi būti aprašyti kiekvieno pažeidimo įvairaus sunkumo laipsnio pavyzdžiai.

Neuropatologinių tyrimų rezultatai įvertinami atsižvelgiant į elgesio stebėjimus ir matavimus, be to, į duomenis, gautus darant ankstesnius ir lygiagrečius bandomosios medžiagos sisteminio toksiškumo bandymus.

2. DUOMENYS

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Pateikiami atskirų gyvūnų duomenys. Papildomai visi duomenys apibendrinami ir suvedami į lenteles, kuriose kiekvienai bandymo arba kontrolinei grupei nurodomas gyvūnų skaičius, darant bandymą nugaišusių arba dėl gyvūnų gerovės priežasčių numarintų gyvūnų skaičius, toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičius, stebimų toksiškumo požymių aprašymas, įskaitant bet kokio toksinio poveikio pradžios laiką, trukmę, tipą ir sunkumą, pažeidimų turinčių gyvūnų skaičius, įskaitant pažeidimo (-ų) tipą ir sunkumą.

▼C1

2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Bandymo rezultatai įvertinami kaip neuropatologinio poveikio ir poveikio elgesiui (be to, neurocheminio arba elektrofiziologinio poveikio, jei vykdomi papildomi tyrimai) dažnumas, sunkumas ir jų koreliacija ir bet koks kitas pastebimas neigiamas poveikis. Jei įmanoma, skaitmeniniai rezultatai įvertinami taikant tinkamą ir visuotinai priimtą statistinį metodą. Statistiniai metodai pasirenkami rengiant bandymo planą.

3. **ATASKAITOS RENGIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

— fizinė būsena (įskaitant izomerizavimą, grynumą ir fizikines ir chemines savybes);

— tapatumo duomenys.

Nešiklis (jei naudojamas):

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas.

Bandomieji gyvūnai:

— naudota rūšis ir veislė;

— gyvūnų skaičius, amžius ir lytis;

— šaltinis, laikymo sąlygos, aklimatizavimas, maistas ir t. t.;

— kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje.

Bandymo sąlygos:

— išsami informacija apie bandomosios medžiagos ar preparato ruošimą, jo dėjimą į maistą, gautą koncentraciją, preparato stabilumą ir vienalytiškumą;

— duodamos dozės specifikacija, įskaitant išsamią informaciją apie nešiklį, duodamos medžiagos turį ir fizikinį pavidalą;

— informacija apie bandomosios medžiagos davimo būdą;

— pasirinkto dozės dydžio pagrindimas;

— veikimo būdo ir trukmės pasirinkimo pagrindimas;

— bandomosios medžiagos koncentracijos pašare ar geriamajame vandenyje (ppm) perskaičiavimas į tikrąją dozę (mg/kg kūno masės/parą), jei tinka;

— išsami informacija apie maisto ir vandens kokybę.

Stebėjimo ir bandymo metodikos:

— išsami informacija apie kiekvienos grupės gyvūnų atranką į pogrupį perfuzijai daryti;

— išsami informacija apie vertinimo balais sistemas, įskaitant kiekvieno matavimo vykdant nuodugnius klinikinius stebėjimus kriterijus ir balų skales;

— išsami informacija apie funkcinius bandymus nustatant jutiminį aktyvumą įvairių dirgiklių atžvilgiu (pvz., garsinių, regėjimo ir proprioceptinių dirgiklių); galūnių grybšnio jėgos įvertinimo, motorinio aktyvumo įvertinimo (įskaitant išsamią informaciją apie aktyvumui nustatyti naudojamus automatizuotus įtaisus) ir kitos taikytos metodikos;

▼C1

— išsami informacija apie oftalmologinius tyrimus ir, jei tinka, hematologiniai tyrimai ir klinikinės biochemijos bandymai, nurodant atitinkamas etalonines vertes;

— išsami informacija apie specifinius elgesio, neuropatologinių, neurocheminių arba elektrofiziologinių tyrimų metodikas.

Rezultatai:

— kūno masė ar kūno masės pokyčiai, įskaitant kūno masę numarinant;

— maisto ir vandens suvartojimas, jei tinka;

— reakcijos į toksinį poveikį duomenys pagal lytį ir dozės dydį, įskaitant toksiškumo požymius arba gaištamumą;

— nuoduginių klinikinių stebėjimų tipas, sunkumas ir trukmė (pradžios laikas ir vėlesnė eiga) (nurodyti grįžtamumą arba negrįžtamumą);

— visų funkcinio bandymo rezultatų išsamus aprašymas;

— nekroskopijos rezultatai;

— išsamus visų turimų elgesio, neuropatologinių, neurocheminių arba elektrofiziologinių rezultatų aprašymas;

— absorbcijos ir medžiagos apykaitos duomenys, jei yra;

— statistinis rezultatų apdorojimas, jei daromas.

Rezultatų aptarimas:

— informacija apie dozės ir reakcijos santykį;

— ryšys su bet kokiu kitu toksišku poveikiu ir išvada apie bandomosios cheminės medžiagos neurotoksiškumą;

— nestebimo neigiamo poveikio lygis.

Išvados:

— prašoma pateikti bandomosios cheminės medžiagos bendrojo neurotoksiškumo įvertinimą.

4. **NUORODOS**

1) OECD Giudance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, In Preparation.

2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.

3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

4) Spencer, P.S. and Schaumburg, h.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, h.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

▼C1

5) Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, p. 999–1003.

6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, p. 691–704.

7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, p. 267–283.

8) Meyer, O.A., Tilson, h.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, p. 233–236.

9) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, h.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, p. 599–609.

10) Tilson, h.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

11) Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

12) Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, p. 689–695.

13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl. Toxicol., 18, p. 343–352.

14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, p. 445–452.

15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, p. 368–378.

16) Fox. D.A., Lowndes, h.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, p. 299–335.

17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, h.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, p. 726–742.

18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼C1

1 lentelė

Mažiausias gyvūnų skaičius vienoje grupėje darant neurotoksiškumo bandymą atskirai arba kartu su kitais bandymais

	NEUROTOKSIŠKUMO BANDYMAS, DARYTAS KAIP:			
	atskiras bandymas	bandymas, daromas kartu su 28 parų bandymu	bandymas, daromas kartu su 90 parų bandymu	bandymas, daromas kartu su lėtinio toksiškumo bandymu
Bendras gyvūnų skaičius grupėje	10 patinų ir 10 patelių	10 patinų ir 10 patelių	15 patinų ir 15 patelių	25 patinai ir 25 patelės
Gyvūnų, atrinktų funkciniam tyrimui, įskaitant nuodugnius klinikinius stebėjimus, skaičius	10 patinų ir 10 patelių	10 patinų ir 10 patelių	10 patinų ir 10 patelių	10 patinų ir 10 patelių
Gyvūnų, atrinktų perfuzijai *in situ* ir neurohistopatologiniam tyrimui, skaičius	5 patinai ir 5 patelės	5 patinai ir 5 patelės	5 patinai ir 5 patelės	5 patinai ir 5 patelės
Gyvūnų, atrinktų kartotinės dozės/pusiau lėtinio/lėtinio toksiškumo stebėjimui, hematologiniam, klinikiniam biocheminiam, histopatologiniam ir t. t. tyrimui, kaip nurodyta atitinkamose rekomendacijose, skaičius		5 patinai ir 5 patelės	10 patinų ([1]) ir 10 patelių ([1])	20 patinų ([1]) ir 20 patelių ([1])
Papildomi stebėjimai, jei reikia	5 patinai ir 5 patelės			

([1]) Įskaitant penkis gyvūnus, atrinktus funkciniam bandymui ir nuodugniems klinikiniams stebėjimams, kurie yra neurotoksiškumo tyrimo dalis.

▼C1

2 lentelė

Klinikinių stebėjimų ir funkcinių tyrimų dažnumas

Stebėjimų tipas		Bandymo trukmė			
		ūmus	28 parų	90 parų	lėtinis
Visi gyvūnai	Bendroji sveikatos būklė	kasdien	kasdien	kasdien	kasdien
	Gaištamumas/ liguistumas	du kartus per dieną	du kartus per dieną	du kartus per dieną	du kartus per dieną
Gyvūnai, atrinkti funkciniams stebėjimams	Nuodugnūs klinikiniai stebėjimai	— prieš pirmą veikimą — po 8 h nuo dozės davimo, didžiausio numatomo poveikio momentu — 7 ir 14 parą po dozės davimo	— prieš pirmą veikimą — vėliau kartą per savaitę	— prieš pirmą veikimą — kartą per pirmą arba antrą savaitę po veikimo — vėliau kas mėnesį	— prieš pirmą veikimą — kartą, pasibaigus pirmam mėnesiui po veikimo — vėliau kas tris mėnesius
	Funkciniai tyrimai	— prieš pirmą veikimą — po 8 h nuo dozės davimo, didžiausio numatomo poveikio momentu — 7 ir 14 parą po dozės davimo	— prieš pirmą veikimą — ketvirtą apdorojimo savaitę, kuo arčiau veikimo laikotarpio pabaigos	— prieš pirmą veikimą — kartą per pirmą arba antrą savaitę po veikimo — vėliau kas mėnesį	— prieš pirmą veikimą — kartą, pasibaigus pirmam mėnesiui po veikimo — vėliau kas tris mėnesius

▼C1

B.44. **SUGERTIS PER ODĄ. *IN VIVO* METODAS**

1. **METODAS**

Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 427 (2004).

1.1. ĮVADAS

Sąlytis su daugeliu cheminių medžiagų įvyksta iš esmės per odą, o atliekant didesnę dalį toksikologinių bandymų su laboratoriniais gyvūnais, medžiagos dozė duodama per virškinamąjį traktą. Šioje rekomendacijoje aprašytas *in vivo* sugerties per odą bandymas užtikrina sąsają, kuri yra būtina bandymų per virškinamąjį traktą duomenims ekstrapoliuoti, kai daromi sąlyčio per odą saugos įvertinimai.

Medžiaga prieš pasiekdama apytaką turi kirsti daug odos ląstelių sluoksnių. Daugelio medžiagų greitį lemia iš negyvų ląstelių sudarytas *stratum corneum*. Skvarba per odą priklauso nuo cheminės medžiagos lipofiliškumo ir epidermio išorinio sluoksnio storio, be to, nuo kitų veiksnių, pavyzdžiui, medžiagos molekulinės masės ir koncentracijos. Apskritai, žiurkių ir triušių oda yra pralaidesnė palyginti su žmogaus oda, o jūrų kiaulyčių ir beždžionių odos pralaidumas yra panašesnis į žmogaus odos pralaidumą.

Sugerties per odą matavimo metodai gali būti suskirstyti į dvi kategorijas; *in vivo* ir *in vitro*. *In vivo* metodu galima gauti naudingos informacijos apie įvairių laboratorinių rūšių sugertį per odą. Neseniai buvo sukurti *in vitro* metodai. Juose taikoma medžiagos pernaša per visą gyvūnų arba žmogaus odos sluoksnio storį arba jo dalį į indą su skysčiu. *In vitro* metodas yra aprašytas kaip atskiras bandymo metodas (1). Rekomenduojama naudotis OECD rekomendaciniu dokumentu dėl sugerties per odą bandymų vykdymo (2), kuris padėtų pasirinkti konkrečiam atvejui tinkamiausią metodą, kadangi šiame dokumente pateikta daugiau informacijos apie abiejų *in vivo* ir *in vitro* metodų tinkamumą.

Šiame dokumente aprašytu *in vivo* metodu galima nustatyti bandomosios medžiagos skvarbą per odą į sisteminę dalį. Metodas yra plačiai taikomas daug metų (3) (4) (5) (6) (7). Nors daugeliu atveju gali tikti *in vitro* sugerties per odą bandymai, būna atvejų, kai reikiamus duomenis galima gauti tik atliekant *in vivo* bandymą.

Prie *in vivo* metodo pranašumų reikėtų priskirti tai, kad jame naudojama fiziologiniu ir medžiagų apykaitos požiūriu vientisa sistema, naudojamos daugumai toksiškumo bandymų įprastos rūšys, be to, metodą galima modifikuoti pritaikant jį kitoms rūšims. Trūkumai: gyvų gyvūnų naudojimas, būtinybė naudoti žymėtąsias medžiagas, kad rezultatai būtų patikimi, sunkumai nustatant ankstyvąjį sugerties tarpsnį ir rekomenduojamos rūšies (žiurkės) bei žmogaus odos pralaidumo skirtumai. Gyvūnų oda paprastai yra pralaidesnė, todėl sugertis per žmogaus odą gali būti pervertinta (6) (8) (9). Šarminių (ardančių) medžiagų nereikėtų tirti su gyvais gyvūnais.

▼C1

1.2. APIBRĖŽTYS

Nesugertoji dozė – atitinka dozę, nuplaunamą po veikimo nuo odos paviršiaus, ir visą dozę, esančią ant nesandaraus apdangalo, įskaitant visą dozę, kuri, kaip įrodoma, išgaravo nuo odos paviršiaus veikimo laikotarpiu.

Sugertoji dozė (*in vivo*) – sudaro šlapime, narvelio plovimo vandenyje, išmatose, iškvėptame ore (jei matuojamas), kraujyje, audiniuose (jei imami) ir likusioje kūno dalyje esanti dozė, pašalinus uždėjimo vietos odą.

Sugeriamoji dozė – atitinka ant odos arba odoje po plovimo esančią dozę.

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Viena arba kelios tinkamo dydžio bandomosios medžiagos (geriausia su žymėtaisiais atomais) dozės dedamos ant nuskustos gyvūnų odos tokiu pavidalu, kuris atitiktų tipinį preparato naudojimą. Nustatytą laiką bandomasis preparatas laikomas ant odos, uždengtas tinkamu apdangalu (nesandariu, pusiau sandariu arba sandariu), kad būtų išvengta bandomojo preparato nurijimo. Pasibaigus veikimo laikui, apdangalas nuimamas, oda plaunama atitinkamu plovikliu, apdangalas bei plovimo medžiagos paliekamos analizei ir uždedamas naujas apdangalas. Gyvūnai prieš veikimą, veikimo metu ir jam pasibaigus laikomi atskiruose medžiagų apykaitai matuoti skirtuose narveliuose ir visą šį laiką analizei renkamos išskyros ir iškvėptas oras. Iškvėpto oro galima nerinkti, kai yra pakankamai informacijos, kad lakiųjų radioaktyviųjų apytakos produktų susidaro mažai arba jų nesusidaro. Kiekviename bandyme paprastai naudojamos kelios gyvūnų grupės, veikiamos bandomuoju preparatu. Viena grupė numarinama pasibaigus veikimo laikotarpiui. Kitos grupės numarinamos vėliau pagal nustatytą grafiką (2). Pasibaigus bandinių ėmimo laikui, numarinami likusieji gyvūnai, analizei surenkamas kraujas, medžiagos uždėjimo vieta išpjaunama analizei atlikti, o kūnas analizuojamas bet kokiai neišsiskyrusiai medžiagai nustatyti. Bandiniai tiriami tinkamais būdais ir įvertinamas sugerties per odą laipsnis (6) (8) (9).

1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.4.1. **Gyvūnų rūšies parinkimas**

Dažniausiai naudojama gyvūnų rūšis yra žiurkės, tačiau galima naudoti beplaukes veisles ir rūšis, kurių sugerties per odą greitis būtų panašūs į sugerties per žmogaus odą greitį (3) (6) (7) (8) (9). Naudojami gerai žinomų laboratorinių rūšių sveiki jauni subrendę vienos lyties (paprastai vyriškos) gyvūnai. Bandymo pradžioje kiekvieno gyvūno masė neturi nukrypti daugiau kaip 20 % nuo vidutinės masės. Pvz., tinka vyriškos lyties 200–250 g masės žiurkės, ypač tos, kurių masė atitinka viršutinę šio intervalo dalį.

▼C1

1.4.2. **Gyvūnų skaičius ir lytis**

Kiekvienas bandomasis preparatas tam tikrą nustatytą laikotarpį bandomas su atskira bent keturių vienos lyties gyvūnų grupe. Kiekviena gyvūnų grupė numarinama, praėjus skirtingam laiko tarpui, pvz., pasibaigus veikimo laikotarpiui (paprastai 6 arba 24 h) ir vėliau (pvz., po 48 ir 72 h). Jei yra duomenų, kad patinų ir patelių TOKSIŠKUMAS PER odą labai skiriasi, pasirenkama jautresnė lytis. Jei tokių duomenų nėra, galima naudoti bet kurią lytį.

1.4.3. **Laikymo ir šėrimo sąlygos**

Patalpos, kurioje bandomi gyvūnai, temperatūra turi būti 22 °C (± 3 °C). Nors santykinis oro drėgnumas turėtų būti bent 30 % ir neviršyti 70 %, reikėtų siekti, kad drėgnumas būtų 50–60 %, išskyrus patalpos plovimo metu. Apšvietimas turi būti dirbtinis – pakaitomis 12 h šviesos ir 12 h tamsos. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, kurio kiekis, kaip ir geriamo vandens kiekis, neribojamas. Bandymo ir, patartina, aklimatizavimo laikotarpiu gyvūnai turėtų būti laikomi atskiruose medžiagų apytakai tirti skirtuose narveliuose. Kadangi išbarstytas pašaras ir išlaistytas vanduo iškreiptų rezultatus, tokia tikimybė turi būti kiek įmanoma sumažinta.

1.4.4. **Gyvūnų ruošimas**

Gyvūnai ženklinami, kad kiekvieną iš jų būtų įmanoma atskirai identifikuoti, ir prieš bandymo pradžią laikomi narveliuose mažiausiai penkias paras, per kurias jie galėtų aklimatizuotis laboratorinėmis sąlygomis.

Pasibaigus aklimatizavimui ir maždaug 24 h iki dozavimo nuskutama visų gyvūnų oda pečių ir nugaros srityje. Pažeistos odos ir sveikos odos pralaidumo savybės skiriasi, todėl reikia stengtis nenutrinti odos. Po nuskutimo ir likus maždaug 24 h iki medžiagos uždėjimo ant odos (žr. 1.4.7 skirsnį) odos paviršius nuskustame plote plaunamas acetonu odos riebalams pašalinti. Papildomai plauti muilu ir vandeniu nerekomenduojama, kadangi bet koks muilo likutis galėtų skatinti bandomosios medžiagos sugertį. Plotas turi būti pakankamai didelis, kad būtų įmanoma patikimai apskaičiuoti sugertą bandomosios medžiagos kiekį vienam cm^2 odos, pageidautina ne mažesnis kaip 10 cm^2. Tokį plotą įmanoma paruošti 200–250 g masės žiurkėms. Po paruošimo gyvūnai grąžinami į apykaitos matavimo narvelius.

1.4.5. **Bandomoji medžiaga**

Bandomoji medžiaga – objektas, kurio skvarbos charakteristikas reikia tirti. Geriausia būtų naudoti bandomąją medžiagą su žymėtaisiais atomais.

1.4.6. **Bandomasis preparatas**

Bandomosios medžiagos preparatas (pvz., grynas, skiestas arba bandomosios cheminės medžiagos turintis preparatas, kuris bus dedamas ant odos) turi atitikti preparatą (arba būti tikroviškas jo pakaitalas), su kuriuo gali įvykti žmonių arba kitų galimų tikslinių rūšių sąlytis. Visi nukrypimai nuo tikroviškų preparato naudojimo sąlygų turi būti pagrįsti. Prireikus bandomoji medžiaga tirpinama arba suspenduojama tinkamame tirpiklyje. Jei tirpiklis – ne vanduo, turi būti žinomos jo sugerties charakteristikos ir sąveika su bandomąja medžiaga.

▼C1

1.4.7. **Uždėjimas ant odos**

Odos paviršiuje apibrėžiama tam tikro paviršiaus ploto vieta medžiagai uždėti. Tuomet toje vietoje tolygiai uždedamas žinomas bandomo preparato kiekis. Šis kiekis paprastai turėtų būti panašus į kiekį, kurį žmonės gali gauti pe sąlytį su medžiaga, dažniausiai 1–5 mg/cm^2 kietosios medžiagos arba mažiau kaip 10 $\mu l/cm^2$ skysčio. Visas kitas dozes reikia pagrįsti numatomomis naudojimo sąlygomis, bandymo tikslais arba bandomojo preparato fizikinėmis charakteristikomis. Po uždėjimo apdorota vieta turi būti apsaugota nuo laižymo. Tipinio įtaiso pavyzdys pavaizduotas 1 paveiksle. Paprastai uždėjimo vieta apsaugoma nesandariu apdangalu (pvz., pralaidžiu nailono marlės apdangalu). Tačiau neribotų dozių taikymo atvejais uždėjimo vieta turėtų būti sandarinama. Jei dėl pusiau lakių medžiagų garavimo nepriimtinai sumažėja regeneravimo laipsnis (žr. dar 1.4.10 skirsnio pirmą pastraipą), garuojančią medžiagą būtina sugauti uždėjimo įtaisą dengiančiu medžio anglių filtru (žr.1 paveikslą). Svarbu, kad nei vienas įtaisas nekenktų odai, nesugertų bandomojo preparato ir nereaguotu su juo. Gyvūnai grąžinami atgal į atskirus medžiagų apykaitos matavimo narvelius, kad būtų galima toliau rinkti jų išskyras.

1.4.8. **Veikimo trukmė ir bandinių ėmimas**

Veikimo trukmė – laiko tarpas nuo bandomojo preparato uždėjimo iki jo pašalinimo nuplaunant odą. Veikimo trukmė turėtų būti tinkama (paprastai 6 arba 24 h), pagrįsta numatoma žmonių sąlyčio su medžiaga trukme. Pasibaigus veikimo laikotarpiui, gyvūnai laikomi medžiagų apykaitos matavimo narveliuose iki jie numarinami pagal grafiką. Visą bandymo laikotarpį gyvūnai turi būti reguliariai stebimi siekiant nustatyti toksiškumo požymius ir (arba) neįprastas reakcijas. Pasibaigus veikimo laikotarpiui, apdorotoji oda turi būti apžiūrima siekiant nustatyti matomus dirginimo požymius.

Visą bandymo laikotarpį turi būti įmanoma medžiagų apykaitos matavimo narveliuose atskirai rinkti susikaupiančius šlapimą ir išmatas. Be to, turi būti įmanoma rinkti ^{14}C žymėtą anglies dioksidą ir lakiuosius ^{14}C žymėtus anglies junginius, kurie turi būti analizuojami, jei susidaro didelis jų kiekis (> 5 %). Šlapimas, išmatos ir sugerčiai (pvz., ^{14}C žymėto anglies dioksido ir lakiųjų ^{14}C junginių) naudoti skysčiai turėtų būti renkami atskirai iš kiekvienos grupės kiekvienu mėginio ėmimo laiku. Jei yra pakankamai informacijos apie tai, kad lakiųjų apykaitos produktų susidaro mažai arba jie išvis nesusidaro, galima naudoti atvirus narvelius.

Išmatos renkamos visą veikimo laikotarpį, iki 24 h nuo pradinio sąlyčio su oda ir vėliau kasdien iki eksperimento pabaigos. Nors paprastai pakanka trijų išmatų rinkimo laikotarpių, atsižvelgiant į numatytą bandomojo preparato paskirtį arba į turimus kinetinius duomenis, tyrimui gali būti numatyti tinkamesni arba papildomi laiko taškai.

Pasibaigus veikimo laikotarpiui, apsauginis įtaisas nuimamas nuo kiekvieno gyvūno ir laikomas atskirai analizei. Visų gyvūnų apdorotoji oda turi būti plaunama bent tris kartus plovimo priemone, naudojant tinkamus tamponus. Reikia stengtis neužteršti kitų kūno dalių. Plovimo priemonė turi atitikti įprastą higienai naudojamą priemonę, pvz., naudojamas vandeninis muilo tirpalas. Galiausiai oda išdžiovinama. Visi tamponai ir plovimo vandenys turi būti paliekami analizei. Prieš grąžinant gyvūnus, kurie priklauso grupėms, laikomoms vėlesniems bandymo etapams, į atskirus narvelius, ant jų apdorotos vietos uždedamas naujas jai apsaugoti skirtas apdangalas.

▼C1

1.4.9. **Baigiamosios procedūros**

Atskiri kiekvienos grupės gyvūnai numarinami pagal grafiką numatytu laiku, jų kraujas surenkamas analizei. Analizei nuimamas apsauginis įtaisas arba apdangalas. Atskirai analizei pašalinama oda preparato uždėjimo vietoje ir panaši dozės nepaveikta nuskustos odos dalis. Uždėjimo vieta gali būti dalijama į sluoksnius ir *stratum corneum* atskiriamas nuo apačioje esančio epidermio, siekiant gauti daugiau informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos pasiskirstymą. Šios medžiagos pasiskirstymas bėgant laikui nuo veikimo laikotarpio pabaigos turėtų suteikti duomenų apie tai, kaip bet kuri bandomoji medžiaga įsiskverbia į *stratum corneum*. Odos dalijimui palengvinti (po paskutinio odos plovimo ir gyvūno numarinimo) nuimami visi apsauginiai apdangalai. Žiurkės oda uždėjimo vietoje ir aplink ją esančios odos žiedas išpjaunamas ir prismeigiamas prie lentos. Lengvai spaudžiant ant odos paviršiaus uždedamas lipniosios juostos gabaliukas, kuris vėliau nuimamas kartu su *stratum corneum* dalimi. Kiti juostos gabaliukai dedami tol, kol juosta nustoja lipti prie odos paviršiaus, kai pašalinamas visas *stratum corneum*. Kiekvieno gyvūno visi juostų gabaliukai sudedami į vieną indą, į kurį pridedama audinio tirpinimo priemonės *stratum corneum* ištirpinti. Prieš pradedant analizuoti visą likusią kūno dalį jo sugertai dozei nustatyti, galima pašalinti visus paveiktus audinius atskiriems matavimams atlikti. Atskirų gyvūnų kūnai paliekami analizei. Paprastai pakanka nustatyti suminį kiekį. Gali būti pašalinti konkretūs organai atskirai analizei (jei to reikia kitiems tyrimams). Šlapimas, rastas pūslėje po numarinimo pagal grafiką, turi būti supilamas kartu su anksčiau surinktu šlapimu. Iš medžiagų apykaitos tyrimo narvelių surinkus išmatas po planinio numarinimo, narvelius ir jų gaudykles reikia išplauti atitinkamu tirpikliu. Panašiu būdu turi būti analizuojama kita potencialiai užteršta įranga.

1.4.10. **Analizė**

Visuose bandymuose turi būti pasiektas atitinkamas regeneravimo laipsnis (t. y. vidutiniškai 100 ± 10 % radioaktyvumo). Turi būti pagrįsti šio intervalo neatitinkantys regeneravimo laipsniai. Duodamos dozės kiekis kiekviename mėginyje turi būti analizuojamas taikant patvirtintas procedūras.

Į statistinę analizę turi būti įtrauktas kiekvieno medžiagos uždėjimo kartotinių bandymų dispersijos įvertinimas.

2. **DUOMENYS**

Kiekvieną kartą imant bandomosios medžiagos ir (arba) apykaitos produktų mėginius, kiekvienam gyvūnui atliekami toliau išvardyti matavimai. Be atskirų duomenų reikia pateikti pagal mėginio ėmimo laiką sugrupuotas vidutines vertes.

— kiekis, susijęs su apsauginėmis priemonėmis;

— kiekis, kuris gali būti pašalintas nuo odos;

— kiekis odoje (ant odos), kurio neįmanoma nuplauti nuo odos;

▼C1

— kiekis kraujo mėginyje;

— kiekis išskyrose ir iškvėptame ore (jei matuojamas);

— kiekis, likęs kūne ir visuose atskirai analizei pašalintuose organuose.

Bandomosios medžiagos ir (arba) apykaitos produktų kiekis išskyrose, iškvėptame ore, kraujyje ir kūne leis nustatyti suminį sugertos medžiagos kiekį kiekvienu laiko momentu. Be to, galima apskaičiuoti bandomosios cheminės medžiagos kiekį, kuris įsigėrė veikimo laikotarpiu kiekviename cm^2 bandomąja medžiaga veikiamos odos.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Į bandymo ataskaitą turi būti įtraukti protokole nustatyti reikalavimai, įskaitant naudotos sistemos pagrindimą, ir ją turi sudaryti šie punktai:

Bandomoji medžiaga:

— tapatumas [pvz., CAS numeris, jei žinomas; šaltinis; grynumas (radiocheminis grynumas); žinomos priemaišos; siuntos numeris];

— fizikinė būsena ir fizikinės bei cheminės savybės (pvz., pH, lakumas, tirpumas, stabilumas, molekulinė masė ir log P_{ov}.

Bandomasis preparatas:

— sudėtis ir naudojimo pagrindimas;

— išsami informacija apie bandomąjį preparatą, uždedamas kiekis, koncentracija, tirpiklis, stabilumas ir vienalytiškumas.

Bandomieji gyvūnai:

— naudota rūšis/veislė;

— skaičius, amžius ir lytis;

— šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.;

— atskirų gyvūnų kūno masė bandymo pradžioje.

Bandymo sąlygos:

— informacija apie bandomojo preparato uždėjimą (uždėjimo vieta, mėginių ėmimo metodai, sandarus/nesandarus apdangalas, tūris, ekstrahavimas, aptikimas);

— išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę.

Rezultatai:

— visi toksiškumo požymiai;

— sugerties duomenys (išreikšti kaip greitis, kiekis arba procentinė dalis), pateikiami lentelėse;

▼C1

— suminiai per bandymą regeneruoti kiekiai;

— rezultatų aiškinimas, lyginimas su visais turimais bandomojo junginio sugerties per odą duomenimis.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

4. **NUORODOS**

1) Testing Method B.45. Skin Absorption: *In vitro* Method.

2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3) ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

4) Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol*. 8(5), p. 829–835.

5) Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

6) EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

7) EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870–7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

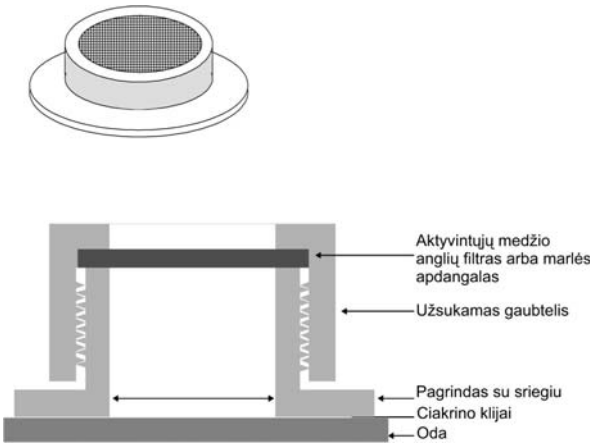
8) Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic*. 28, p. 369–373.

9) Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol*. 54, p. 399–404.

▼C1

1 paveikslas

Tipinio įtaiso, naudojamo uždėjimo ant odos vietai apibrėžti ir apsaugoti, atliekant *in vivo* sugerties per odą bandymus, konstrukcijos pavyzdys



▼C1

B.45. **SUGERTIS PER ODĄ. *IN VITRO* METODAS**

1. **METODAS**

Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 428 (2004).

1.1. ĮVADAS

Šis metodas skirtas informacijai apie bandomosios medžiagos, uždėtos ant išpjautos odos, sugertį gauti. Jį galima derinti su sugerties per odą *in vivo* metodu (1) arba taikyti atskirai. Rekomenduojama naudotis OECD rekomendaciniu dokumentu dėl sugerties per odą bandymų vykdymo (2), kuris padėtų planuoti šiuo metodu pagrįstus bandymus. Rekomendacinis dokumentas yra parengtas siekiant padėti pasirinkti tinkamas *in vitro* procedūras, skirtas taikyti konkrečiomis aplinkybėmis, kad būtų galima užtikrinti šiuo metodu gautų rezultatų patikimumą.

Metodai sugerčiai ir pernašai per odą matuoti gali būti suskirstyti į dvi kategorijas: *in vivo* ir *in vitro*. *In vivo* sugerties per odą metodai yra gerai žinomi ir farmakokinetinė informacija gaunama įvairioms gyvūnų rūšims. *In vivo* metodas yra atskirai aprašytas 1 nuorodoje. Be to, *in vitro* metodai daug metų yra naudojami sugerčiai per odą matuoti. Nors oficialūs šiame bandymo metode aprašytų *in vitro* metodų tinkamumo patvirtinimo bandymai nebuvo atlikti, 1999 m. OECD ekspertai sutarė, kad yra pakankamas kiekis įvertintų duomenų *in vitro* metodui patvirtinti (3). Papildomų išsamių duomenų, kurie konkrečiai pagrįstų šį patvirtinimą, įskaitant didelį tiesioginių *in vitro* ir *in vivo* metodų palyginamųjų duomenų skaičių, pateikta rekomendaciniame dokumente (2). Yra keletas monografijų, kuriose ši tema apžvelgiama ir išsamiai pagrindžiamas *in vitro* metodas (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). *In vitro* metodais matuojama cheminių medžiagų difuzija į odą ir per odą į indą su skysčiu, kai galima naudoti negyvą odą tik difuzijai matuoti arba naudoti ką tik paruoštą, medžiagų apykaitos požiūriu veiklią odą difuzijai per odą ir medžiagų apykaitai matuoti. Tokie metodai visų pirma imti taikyti kaip atrankos metodai lyginant skirtinguose preparatuose esančių cheminių medžiagų tiekimą į odą ir per odą, be to, juos galima taikyti kaip naudingus modelius sugerčiai per žmonių odą įvertinti.

In vitro metodas gali tikti ne visuomet ir ne visoms cheminių medžiagų klasėms. Galbūt *in vitro* bandymo metodas tiktų pradiniam kokybiniam skverbties per odą įvertinimui. Tam tikrais atvejais gali tekti papildyti bandymą *in vivo* duomenimis. Reikėtų ieškoti informacijos rekomendaciniame dokumente (2) toliau tikslinti aplinkybes, kuriomis tiktų *in vitro* metodas. Papildomos išsamios informacijos sprendimui paremti pateikta (3).

Šiame metode pateikti bendrieji principai, kaip matuoti cheminės medžiagos sugertį ir pernašą per išpjautą odą. Galima naudoti daugelio žinduolių rūšių odą, įskaitant žmonių. Odos pralaidumo savybės nepakinta išpjovus ją iš kūno, kadangi pagrindinis difuzijos užtvaras yra negyvas *stratum corneum*; aktyvi cheminių medžiagų pernaša per odą nėra nustatyta. Yra įrodyta, kad, vykstant sugerčiai per odą, oda gali dalyvauti kai kurių cheminių medžiagų apykaitoje (6), tačiau šis procesas neapriboja faktinės sugertos dozės įsiskverbimo greičio, nors jis gali turėti įtakos į kraujo apytaką patenkančios medžiagos savybėms.

▼C1

1.2. APIBRĖŽTYS

Nesugertoji dozė – atitinka dozę, nuplaunamą po veikimo nuo odos paviršiaus, ir visą dozę, esančią ant nesandaraus apdangalo, įskaitant visą dozę, kuri, kaip įrodoma, išgaravo nuo odos paviršiaus veikimo laikotarpiu.

Sugertoji dozė (*in vitro*) – bandomosios medžiagos, per apibrėžtą laikotarpį pasiekusios rinktuvo skystį arba didįjį kraujo apytakos ratą masė.

Sugeriamoji dozė (*in vitro*) – atitinka dozę, po plovimo esančią ant odos arba odoje.

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandomoji medžiaga, kurioje gali būti žymėtųjų atomų, uždedama ant odos bandinio, skiriančio du difuzijos kameros skyrius, paviršiaus. Esant apibrėžtoms sąlygoms cheminė medžiaga laikoma ant odos apibrėžtą laiką ir vėliau nuplaunama taikant atitinkamą plovimo procedūrą. Visą bandymą tam tikrais laiko tarpais imami rinktuvo skysčio mėginiai ir analizuojami cheminei medžiagai ir (arba) jos medžiagų apykaitos produktams nustatyti.

Kai naudojamos medžiagų apykaitos požiūriu aktyvios sistemos, bandomosios cheminės medžiagos medžiagų apykaitos produktai gali būti analizuojami taikant atitinkamus metodus. Prireikus po bandymo kiekybiškai nustatomas bandomosios cheminės medžiagos ir jos medžiagų apykaitos produktų pasiskirstymas.

Atitinkamomis sąlygomis, aprašytomis šiame metode ir rekomendaciniame dokumente (2), nustatytą laikotarpį matuojama bandomosios medžiagos sugertis, atliekant rinktuvo skysčio ir apdorotos odos analizę. Odoje likusi bandomoji medžiaga turi būti laikoma sugerta, išskyrus atvejus, kai galima įrodyti, kad sugertį galima nustatyti vien tik pagal rinktuvo skysčio vertes. Kitų sudėtinių dalių (nuo odos nuplautos ir odos sluoksnių viduje likusios medžiagos) analizė leidžia išsamiau įvertinti duomenis, įskaitant bandomosios medžiagos pasiskirstymą ir regeneravimo laipsnį.

Norint įrodyti bandymų laboratorijoje naudojamos bandymo sistemos veikimą ir patikimumą, reikia turėti su atitinkamomis etaloninėmis medžiagomis gautus rezultatus, kurie atitiktų literatūroje paskelbtus taikomo metodo rezultatus. Šį reikalavimą galima įvykdyti lygiagrečiai bandant atitinkamą etaloninę medžiagą (geriau tokią, kurios lipofilinės savybės mažai skiriasi nuo bandomosios medžiagos savybių) ir bandomąją medžiagą arba gauti anksčiau sukauptus tinkamus duomenis apie kelias skirtingų lipofilinių savybių etalonines medžiagas (pvz., kofeiną, benzenkarboksirūgštį ir testosteroną).

1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.4.1. **Difuzijos kameros**

Difuzijos kamerą sudaro tiektuvo ir rinktuvo skyriai, tarp kurių dedama oda (tipinės konstrukcijos pavyzdys pateiktas 1 paveiksle). Kameroje oda turi būti įtvirtinama sandariai, turi būti užtikrinamos tinkamos sąlygos su odos apačia susiliečiančio rinktuvo tirpalui maišyti, imti jo mėginius ir kontroliuoti kameros bei jos turinio temperatūrą. Tinka nepratekamojo ir pratekamojo tipo difuzijos kameros. Paprastai tiektuvo skyriai ne sandarinami, jei naudojama ribota bandomojo preparato dozė. Tačiau naudojant neribotas dozes ir pagal tam tikrus ribotų dozių naudojimo scenarijus tiektuvo skyriai gali būti sandarinami.

▼C1

1.4.2. **Rinktuvo skystis**

Pirmenybė teikiama fiziologiniu požiūriu palankiam rinktuvo skysčiui, nors galima naudoti ir kitus skysčius, jei jų naudojimas būtų pagrįstas. Turi būti pateikta tiksli rinktuvo skysčio sudėtis. Turi būti įrodyta, kad bandomosios cheminės medžiagos tirpumas rinktuvo skystyje yra pakankamas, todėl šis veiksnys nebus kliūtis sugerčiai. Be to, rinktuvo skystis neturi daryti įtakos odos preparato vientisumui. Pratekamojo tirpalo sistemoje srautas turi nesudaryti kliūčių bandomajai medžiagai patekti į rinktuvo skystį. Skystis nepratekamojo tipo kameroje turi būti nepertraukiamai maišomas ir reguliariai imami jo mėginiai. Jei tiriama medžiagų apykaita, rinktuvo skystis turi užtikrinti odos gyvybingumą visą bandymo laiką.

1.4.3. **Odos preparatai**

Galima naudoti žmonių arba gyvūnų odą. Pripažįstama, kad naudojant žmonių odą būtina atsižvelgti į nacionalinius ir tarptautinius etinius aspektus bei sąlygas. Nors labiau tinka gyva oda, galima naudoti negyvą oda, jei galima įrodyti, kad oda yra nepažeista. Tinka epiderminės membranos (atskirtos fermentiniu, šiluminiu arba cheminiu būdu) arba į sluoksnius padalyta oda (paprastai 200–400 μm storio), paruošta dermatomu. Galima naudoti viso storio odą, tačiau reikėtų vengti per didelio storio (*ca.* > 1 mm), išskyrus kai specialiai reikia nustatyti bandomąją cheminę medžiagą odos sluoksniuose. Turi būti pagrįstas rūšies pasirinkimas, anatominė vieta ir paruošimo metodas. Vienam bandomajam preparatui reikia pateikti bent keturių kartotinių bandymų priimtinus duomenis.

1.4.4. **ODOS PREPARATŲ VIENTISUMAS**

Svarbu tinkamai paruošti odą. Netinkamai ruošiant galima pažeisti *stratum corneum*, todėl turi būti tikrinamas paruoštos odos vientisumas. Kai tiriama odos medžiagų apykaita, ką tik išpjauta oda turi būti naudojama kuo greičiau ir esant sąlygoms, apie kurias būtų žinoma, kad jos užtikrina medžiagų apykaitos aktyvumą. Pagal bendrai priimtas taisykles ką tik išpjauta oda turi būti panaudota per 24 h, tačiau priimtinas laikymo laikotarpis gali skirtis, atsižvelgiant į medžiagų apykaitoje dalyvaujančių fermentų sistemą ir laikymo temperatūrą (13). Kai odos preparatai naudojami ne iš karto, turi būti pateikti duomenys, kurie rodytų barjerinės funkcijos išsaugojimą.

1.4.5. **Bandomoji medžiaga**

Bandomoji medžiaga – objektas, kurio skvarbos charakteristikas reikia tirti. Geriausia būtų naudoti bandomąją medžiagą su žymėtaisiais atomais.

1.4.6. **Bandomasis preparatas**

Bandomosios medžiagos preparatas (pvz., grynas, skiestas arba bandomąją cheminę medžiagą turintis preparatas, dedamas ant odos) turi atitikti (arba būti tikrovišku pakaitalu) preparatą, su kuriuo gali įvykti žmonių arba kitų galimų tikslinių rūšių sąlytis. Visi nukrypimai nuo tikroviškų preparato naudojimo sąlygų turi būti pagrįsti.

▼C1

1.4.7. **Bandomųjų medžiagų koncentracijos vertės ir preparatai**

Paprastai naudojamos kelios bandomosios medžiagos koncentracijos vertės, į kurių diapazoną patenka viršutinės galimo žmonių sąlyčio su medžiaga vertės. Be to, reikėtų numatyti tipinės sudėties preparatų bandymą.

1.4.8. **Uždėjimas ant odos**

Paprastai ant žmonių odos patenka ribotos cheminių medžiagų dozės. Todėl naudojamas kiekis paprastai turėtų atkartoti galimo žmonių sąlyčio su medžiaga kiekį, dažniausiai 1–5 mg/cm^2 kietosios medžiagos arba mažiau kaip 10 $\mu l/cm^2$ skysčio. Kiekį reikia pagrįsti numatomomis naudojimo sąlygomis, bandymo tikslais arba bandomojo preparato fizikinėmis charakteristikomis. Pvz., dedamas ant odos kiekis gali būti neribotas, jei ploto vienetui tenka dideli kiekiai.

1.4.9. **Temperatūra**

Temperatūra daro įtaką cheminių medžiagų pasyviajai difuzijai (taigi jų sugerčiai per odą). Difuzijos skyriaus ir odos temperatūra turi būti stabili ir maždaug atitikti kūno temperatūrą 32 ± 1 °C. Skirtingos konstrukcijos kameroms reikalinga nevienoda vandens vonios arba kaitinamo bloko temperatūra, siekiant užtikrinti, kad rinktuvo/odos temperatūra atitiktų fiziologinę normą. Pageidautina, kad santykinė drėgmė būtų 30–70 %

1.4.10. **Veikimo trukmė ir mėginių ėmimas**

Oda gali būti veikiama bandomuoju preparatu visą bandymo trukmę arba trumpiau (t. y. kartoti konkretų žmonių sąlyčio su medžiaga būdą). Bandomojo preparato perteklius nuplaunamas atitinkama plovimo priemone, o plovimo skysčiai surenkami analizei. Bandomojo preparato šalinimo procedūra priklausys nuo numatomų naudojimo sąlygų ir turi būti pagrįsta. Paprastai reikalingas 24 h mėginių ėmimo laikotarpis sugerties kreivei tinkamai apibūdinti. Kadangi odos vientisumas gali pradėti blogėti anksčiau nei po 24 h, mėginių ėmimo trukmė paprastai neturi būti didesnė kaip 24 h. Jei bandomosios medžiagos skverbiasi per odą greitai, ši sąlyga gali būti nereikalinga, tačiau lėtai prasiskverbiančias medžiagas gali tekti bandyti ilgiau. Rinktuvo skysčio mėginių ėmimo dažnumas turi būti toks, kad būtų įmanoma gauti bandomosios medžiagos sugerties kreivės grafinį vaizdą.

1.4.11. **Baigiamosios procedūros**

Turi būti analizuojami visi bandymo sistemos komponentai ir nustatytas regeneravimo laipsnis. Šiuos komponentus sudaro tiektuvo skyrius, odos paviršiaus plovimo skysčiai, odos preparatas ir rinktuvo skystis ir skyrius. Kai kuriais atvejais oda gali būti padalyta į medžiagos veikiamą odos plotą ir į odą po kameros junge, bei į *stratum corneum*, epidermį ir odą atskirai analizei atlikti.

1.4.12. **Analizė**

Visuose bandymuose turi būti pasiektas atitinkamas regeneravimo laipsnis (t. y. reikėtų siekti 100 ± 10 % radioaktyvumo vidurkio, o nukrypimai turi būti pagrįsti). Bandomosios medžiagos kiekis rinktuvo skystyje, odos preparate, odos paviršiaus ir aparatūros plovimo skysčiuose turi būti nustatytas, taikant tinkamą metodą.

▼C1

2. **DUOMENYS**

Turi būti pateikta rinktuvo skysčio analizė, bandomosios cheminės medžiagos pasiskirstymas bandymo sistemoje ir sugerties kaip laiko funkcijos kreivė. Kai oda veikiama ribota doze, turi būti apskaičiuojamas nuo odos nuplautas kiekis, odoje likęs kiekis (ir skirtingose odos sluoksniuose, jei daroma analizė) ir rinktuvo skystyje esantis kiekis (greitis ir naudotos dozės kiekis arba procentinė dalis). Kartais sugertį per odą galima išreikšti naudojant tik apie rinktuvo skystį gautus duomenis. Tačiau, kai pasibaigus bandymui bandomoji medžiaga lieka odoje, šį kiekį gali tekti įtraukti į suminį sugertos medžiagos kiekį (žr. 3 nuorodos 66 pastraipą). Kai oda veikiama neribota doze, duomenų gali pakakti skvarbos konstantai (Kp) apskaičiuoti. Esant šioms sąlygoms, absorbuotos medžiagos procentinė dalis nėra svarbi.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikiami protokole nustatyti reikalavimai, įskaitant naudotos sistemos pagrindimą, ir joje turi būti nurodoma tokia informacija:

Bandomoji medžiaga:

— fizinė būsena, fizikinės ir cheminės savybės (bent molekulinė masė ir log P_{ov}), grynumas (radiocheminis grynumas);

— identifikavimo informacija (pvz., siuntos numeris);

— tirpumas rinktuvo skystyje.

Bandomasis preparatas:

— sudėtis ir naudojimo pagrindimas;

— vienalytiškumas.

Bandymo sąlygos:

— odos šaltiniai ir vieta, paruošimo metodas, laikymo prieš bandymą sąlygos, bet koks pradinis apdorojimas (plovimas, apdorojimas antibiotikais ir t. t.), odos vientisumo matavimai, medžiagų apykaitos būsena, naudojimo pagrindimas;

— kameros konstrukcija, rinktuvo skysčio sudėtis, rinktuvo skysčio srautas arba mėginių ėmimo laikas ir procedūros;

— informacija apie bandomojo preparato uždėjimą ir naudotos dozės kiekybinis nustatymas;

— veikimo trukmė;

— išsami informacija apie bandomojo preparato šalinimą nuo odos, pvz., odos plovimas;

— išsami odos analizė ir visos taikytos odos dalijimo procedūros siekiant parodyti pasiskirstymą odoje;

▼C1

— kameros ir įrangos plovimo procedūros;

— mėginių ėmimo metodai, ekstrahavimo metodai, aptikimo ribinės vertės ir analizės metodo tinkamumo patvirtinimas.

Rezultatai:

— atliekant bandymą regeneruoti suminiai kiekiai (taikyta dozė = odos plovimo skysčiai + oda + rinktuvo skystis + kameros plovimo skysčiai);

— į lenteles surašyti regeneravimo atskirų kamerų kiekvienoje sekcijoje laipsniai;

— sugerties kreivė;

— lentelėse pateikti sugerties duomenys (išreikšti kaip sugerties greitis, kiekis arba procentinė dalis).

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

4. **NUORODOS**

1) Testing Method B.44. Skin Absorption: *In vivo* Method.

2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD. Paris.

3) OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

4) Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5) Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, p. 237–241.

6) Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*. CRC Press, Boca Raton.

7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

8) Diembeck W, Beck h, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Loveli W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, p. 191–205.

9) Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

10) Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et al*. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼C1

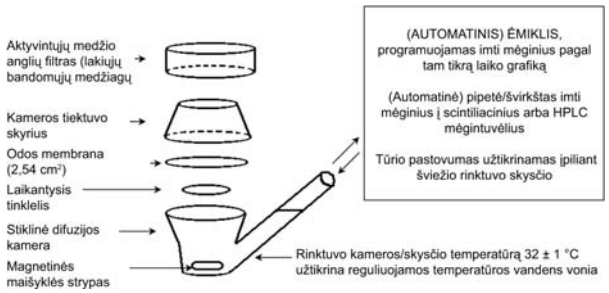
11) Schaefer h and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

12) Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13) Jewell, C, Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: p. 356–365.

1 paveikslas

Nepratekamojo tipo difuzijos kameros *in vitro* sugerties per odą bandymams atlikti konstrukcijos pavyzdys



▼M3

B.46. *IN VITRO* ODOS DIRGINIMAS. REKONSTRUOTO ŽMOGAUS EPIDERMIO BANDYMO METODAS

ĮVADAS

1. Odos dirginimu vadinama grįžtamoji odos pažaida po bandomosios medžiagos užtepimo ne ilgiau kaip 4 valandoms [kaip apibrėžta Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemoje (angl. GHS)] ir 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamente (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo (KŽP) (1)(3)]. Šis bandymo metodas (BM) apima *in vitro* procedūrą, pagal kurią galima nustatyti dirginančiųjų cheminių medžiagų (ir mišinių) pavojų pagal JT GHS ir ES KŽP 2-ąją kategoriją (1) (2) (3). ES ir kituose regionuose, kuriuose netaikoma papildomoji JT GHS 3-ioji kategorija (švelnūs dirgikliai), šis BM taip pat gali būti taikomas neklasifikuojamoms cheminėms medžiagoms, t. y. priskirtoms JT GHS ir ES KŽP grupei „nėra kategorijos“, identifikuoti (1)(3). Šis BM gali būti taikomas cheminių medžiagų galimybei dirginti odą nustatyti, kaip atskiras pakaitinis bandymas, skirtas *in vivo* odos dirginimui bandyti pagal nuosekliųjų bandymų strategiją (4 ir šio priedo B.4 skyrius).

2. Odos dirginimas paprastai buvo vertinamas naudojant laboratorinius gyvūnus [OECD bandymų metodika 404; šio priedo B.4 skyrius](4). Rūpinantis gyvūnų gerove, B.4 metodu (pakeistu 2004 m.) galima nustatyti ėsdinamąjį ar dirginamąjį poveikį odai pagal nuosekliųjų bandymų strategiją, taikant patvirtinto tinkamumo *in vitro* ir *ex vivo* metodus ir taip apsaugant gyvūnus nuo skausmo ir kančių. Nuosekliosios bandymų strategijos B.4 arba OECD bandymų metodikos 404 (4) ėsdinimo bandymams tinka trys patvirtinto tinkamumo *in vitro* bandymų metodai, priimti kaip OECD bandymų metodikos 430, 431 bei 435 (5) (6) (7), o du iš jų – kaip šio priedo B.40 ir B.40a skyriai.

3. Šis BM skirtas odos dirginimui pagal žmogaus sveikatos įvertį. Jis pagrįstas rekonstruoto žmogaus epidermio (angl. *reconstructed human epidermis*, RhE) modeliu, kurio bendroji schema (kaip ląstelių šaltinis naudojami žmogaus epidermio keratinocitai, reprezentatyvusis audinys ir citoarchitektonika) labai artima žmogaus odos paviršinio sluoksnio, t. y. epidermio biocheminėms ir fiziologinėms savybėms. Be to, į šį BM įtrauktas naudojimo charakteristikų standartų (angl. PS) rinkinys (2 priedėlis), skirtas įvertinti panašius ir modifikuotus RhE pagrįstus bandymo metodus, kuriuos EC-ECVAM (8) parengė pagal OECD metodikos dokumentą Nr. 34 (9).

4. Yra trys patvirtinto tinkamumo metodai, atitinkantys šį BM. Buvo atlikti dviejų *in vitro* bandymo metodų (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), kurių komercinis pavadinimas „EpiSkin™“ (patvirtinto tinkamumo pamatinis metodas, angl. *Validated Reference Method*, VRM), pradinio tinkamumo patvirtinimo, optimizavimo ir tinkamumo patvirtinimo tyrimai, naudojant RhE modelį. Remiantis PS pagrįstų tinkamumo patvirtinimu (21), dviejų kitų komercinių *in vitro* odos dirginimo RhE metodų rezultatai yra panašūs VRM: „EpiDerm™“ SIT (EPI-200) ir „SkinEthic™“ RHE metodai (22).

▼M3

5. Prieš taikant siūlomą panašų arba modifikuotą *in vitro* RhE metodą, kuris nėra VRM, „EpiDerm™“ SIT (EPI-200) arba „SkinEthic™“ RHE, reglamentavimo tikslais reikia nustatyti jo patikimumą, tinkamumą (tikslumą) ir siūlomo naudojimo apribojimus, siekiant užtikrinti jo panašumą į VRM, pagal šiame BM nustatytus PS (2 priedėlis) Be to, prieš kuriant panašų ar modifikuotą *in vitro* RhE metodą, tvirtinant jo tinkamumą ir pateikiant oficialiai patvirtinti, rekomenduojama laikytis OECD aiškinamojo pagrindų dokumento, skirto *in vitro* odos dirginimo bandymams (23).

APIBRĖŽTYS

6. Vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

7. Šio BM apribojimas, kurį rodo tinkamumo patvirtinimo tyrimas (16), yra tai, kad pagal jį cheminių medžiagų negalima priskirti papildomai JT GHS 3-iajai kategorijai (švelnūs dirgikliai) (1). Kai taikomas kaip dalinis pakaitinis bandymas, gali prireikti paskesnio *in vivo* bandymo, kad būtų visiškai apibūdintas odos dirginimo potencialas (4 ir šio priedo B.4 skyrius). Pripažįstama, kad žmogaus odos bandymams taikomi nacionaliniai ir tarptautiniai etikos principai ir sąlygos.

8. Šis BM skirtas odos korozijos/dirginimo nuosekliųjų bandymų strategijos B.4 (OECD bandymų metodika 404) *in vitro* odos dirginimo komponentui (4). Nors taikant šį BM negaunama pakankamos informacijos apie odos koroziją, reikia pažymėti, kad odos korozijai skirtas B.40a (OECD bandymų metodika 431) yra pagrįstas ta pačia RhE bandymo sistema, tačiau taikomas kitas protokolas (B.40a skyrius). Šis metodas pagrįstas RhE modeliais, pagal kuriuos naudojami žmogaus keratinocitai, kurie dėl to *in vitro* atitinka dominančios rūšies tikslinį organą. Be to, jis tiesiogiai apima pradinį veikiančios uždegiminės kaskados / mechanizmo (ląstelės ir audinio pažeidimą, dėl kurio patiriama vietinė trauma) etapą, įvykstantį dirginant *in vivo*. Atliekant šiam BM skirtą tinkamumo patvirtinimą buvo išbandyta daug cheminių medžiagų ir į empirinę tinkamumo patvirtinimo tyrimo duomenų bazę iš viso įtrauktos 58 cheminės medžiagos (16) (18) (23). Tai yra kietosios medžiagos, skysčiai, pusiau kietosios medžiagos ir vaškai. Skysčiai gali būti vandeniniai ir nevandeniniai; kietosios medžiagos gali būti tirpios ir netirpios vandenyje. Kai įmanoma, kietosios medžiagos prieš užtepimą sumalamos iki smulkių miltelių; niekaip kitaip mėginio apdoroti nereikia. Dujos ir purškalai tinkamumo patvirtinimo tyrimu kol kas įvertinti nebuvo (24). Nors šias medžiagas įmanoma bandyti pagal RhE metodiką, pagal šį BM dujų ir purškalų bandyti negalima. Taip pat reikia pažymėti, kad labai spalvingos cheminės medžiagos gali trukdyti atlikti ląstelių gyvybingumo matavimus ir pataisoms būtina naudoti pritaikytas kontrolines medžiagas (žr. 24–26 skirsnius).

9. Jei klasifikacija neabejotina, bandomajai cheminei medžiagai turi pakakti vienos bandymų serijos su trimis kartotiniais audiniais. Tačiau, jei rezultatai ribiniai, pvz., kartotinių matavimų rezultatai nesutampa ir (arba) vidutinė procentinė gyvybingumo vertė lygi 50 ± 5 %, turi būti apsvarstyta, ar nereikia antrosios serijos ir trečiosios, jei pirmųjų dviejų serijų rezultatai išsiskirtų.

▼M3

BANDYMO PRINCIPAS

10. Bandomoji cheminė medžiaga užtepama ant trimačio RhE modelio, sudaryto iš normalių žmogaus odos keratinocitų, kurie buvo kultivuojami, kad galėtų būti gautas daugiasluoksnis labai gerai diferencijuotas žmogaus *epidermio* modelis. Jį sudaro suformuoti pamatinis, dygliuotasis ir grūdėtasis sluoksniai ir daugiasluoksnis *stratum corneum*, turintis tarpląstelinių žvynelių pavidalo lipidų sluoksnių, kurių struktūra yra analogiška *in vivo* nustatytai struktūrai.

11. Cheminių medžiagų sukeltas odos dirginimas, pasireiškiantis eritema ir edema, yra įvykių kaskados, prasidedančios prasiskverbimu pro *stratum corneum* ir po juo esančių keratinocitų sluoksnių pažeidimu, padarinys. Žūvantys keratinocitai išleidžia mediatorius, kurie pradeda uždegiminę kaskadą, veikiančią *dermio* ląsteles, pirmiausia stromos ir endotelio ląsteles. Matomą eritemą ir edemą sukelia būtent endotelio ląstelių išsiplėtimas ir padidėjęs pralaidumas (24). RhE grindžiamais metodais matuojami kaskadą sukeliantys įvykiai.

12. Ląstelių gyvybingumas RhE modeliuose matuojamas pagal gyvybinio dažiklio MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido (tiazolilio mėlio), CAS Nr. 298–93–1, fermentinę konversiją į mėlyną formazano druską, kurios kiekis išmatuojamas išskyrus iš audinių (25). Dirginančios cheminės medžiagos identifikuojamos pagal jų gebą sumažinti ląstelių gyvybingumą iki mažesnio nei nustatyto slenkstinio lygio (t. y. ≤ 50 % JT GHS/ES KŽP 2-ajai kategorijai). Atsižvelgiant į reglamentavimo sistemą, kurioje naudojami šio BM rezultatai, cheminės medžiagos, po kurių poveikio ląstelių gyvybingumas viršija nustatytą slenkstinį lygį, gali būti laikomos nedirginančiomis (t. y. > 50 %, „nėra kategorijos“).

KVALIFIKACIJOS ĮRODYMAS

13. Prieš pradėdamos įprastu būdu taikyti bet kurį iš trijų patvirtinto tinkamumo metodų, kurie atitinka šį BM, laboratorijos turi įrodyti techninę kvalifikaciją, naudodamos dešimt etaloninių cheminių medžiagų, išvardytų 1 lentelėje. Taikant panašius metodus, parengtus pagal šį BM, arba pakeitus bet kurį iš trijų patvirtinto tinkamumo metodų, turi būti laikomasi šio BM 2 priedėlyje aprašytų PS reikalavimų, kad metodas galėtų būti taikomas reglamentuojamiems bandymams.

14. Rekomenduojama, kad, įrodydamas kvalifikaciją, naudotojas patikrintų gautų audinių apsaugines savybes, nurodytas RhE modelio gamintojo. Tai ypač svarbu, jei audiniai vežami ilgus nuotolius ar laiko tarpą. Kai metodas sėkmingai patvirtintas ir įrodyta jo taikymo kvalifikacija, vėliau tokio tikrinimo pastoviai daryti nebūtina. Tačiau, jei metodas taikomas pastoviai, rekomenduojama ir toliau reguliariai vertinti audinių apsaugines savybes.

1 lentelė

Etaloninės cheminės medžiagos ([1])

Cheminės medžiaga	CAS Nr.	*In vivo* įvertis ([2])	Fizikinė būsena	JT GHS/ES KŽP kategorija
naftalenacto rūgštis	86–87–3	0	Kieta m.	Be kat.
izopropanolis	67–63–0	0,3	Skystis	Be kat.

▼M3

Cheminės medžiaga	CAS Nr.	*In vivo* įvertis ([2])	Fizikinė būsena	JT GHS/ES KŽP kategorija
metilstearatas	112–61–8	1	Kieta m.	Be kat.
heptilbutiratas	5877–93–9	1,7	Skystis	Be kat. (*3-ioji papildomoji kategorija*) ([3]), ([4])
heksilsalicilatas	6255–76–3	2	Skystis	Be kat. (*3-ioji papildomoji kategorija*) ([3]), ([4])
ciklamenaldehidas	103–95–7	2,3	Skystis	2 kat.
1-bromheksanas	111–25–1	2,7	Skystis	2 kat.
kalio hidroksidas (5 % vand.)	1311–58–3	3	Skystis	2 kat.
1-metil-3-fenil-1-piperazinas	5277–27–2	3,3	Kieta m.	2 kat.
Heptanalis	111–71–7	3,4	Skystis	2 kat.

([1]) Šios etaloninės cheminės medžiagos yra tinkamumo patvirtinimo tyrime naudojamų etaloninių cheminių medžiagų poaibis.
([2]) *In vivo* įvertis pagal B.4 ir OECD bandymų metodiką 404 (4).
([3]) Pagal šią bandymo metodą, JT GHS 3-ioji papildomoji kategorija (švelnūs dirgikliai) (1) prilyginama „nėra kategorijos“.
([4]) JT GHS 3-ioji papildomoji kategorija netaikoma pagal ES KŽP.

BANDYMO EIGA

15. Toliau aprašomi odos dirginimui įvertinti naudojamo RhE metodo komponentai ir procedūros. RhE modelis gali būti atkurtas, paruoštas vietoje arba įsigytas. Galimos standartinės taikymo procedūros (angl. *Standard Operating Procedures*, SOP): „EpiSkin™“, „EpiDerm™“ SIT (EPI-200) ir „SkinEthic™“ RHE) (26) (27) (28). Bandymai turi būti atliekami kaip nurodyta toliau:

RhE Bandymo Metodo Komponentai

Bendrosios sąlygos

16. Epiteliui atkurti turi būti naudojami normalūs žmogaus odos keratinocitai. Po funkciniu *stratum corneum* turi būti keli gyvybingų epitelio ląstelių sluoksniai (pamatinis sluoksnis, dygliuotasis (*stratum spinosum*), grūdėtasis (*stratum granulosum*)). *Stratum corneum* turi būti daugiasluoksnis ir turėti pagrindinius lipidų sluoksnius, kad būtų gautas patvarus funkcinis barjeras, kuris būtų atsparus cheminių citotoksinių žymeklių, pvz., natrio dodecilsulfato (SDS) arba „Triton X-100“, greitam prasiskverbimui. Apsauginė funkcija gali būti įvertinta nustatant koncentraciją, kuriai esant cheminis žymeklis, praėjus nustatytam poveikio laikui, sumažina audinių gyvybingumą 50 % (IC_{50}) arba nustatant tam tikros pastovios koncentracijos cheminio žymeklio poveikio trukmę, per kurią ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % (ET_{50}). Modelis turi turėti sulaikymo savybes, kurios apsaugotų nuo medžiagos patekimo į gyvąjį audinį apeinant *stratum corneum*, dėl ko būtų blogai modeliuojamas odos veikimas medžiaga. RhE modelis turi būti neužterštas bakterijomis, virusais, mikoplazma ar grybeliais.

▼M3

Funkcinės sąlygos

Gyvybingumas

17. Gyvybingumo dydžiui nustatyti taikomas MTT bandymas (25). Naudojantieji RhE modelį turi užtikrinti, kad kiekviena RhE modelio partija atitiktų apibrėžtus neigiamo poveikio kontrolinės medžiagos (angl. NC) kriterijus. Paties ekstrahavimo tirpalo optinis tankis (angl. *optical density*, OD) turi būti pakankamai mažas, t. y. OD < 0,1. Neigiamo poveikio kontrolinės medžiagos OD verčių (odos dirginimo bandymo metodo sąlygomis) priimtinumo intervalą (viršutinę ir apatinę ribas) nustato hE modelio gamintojas/-tiekėjas, o 3-ų patvirtinto tinkamumo metodų priimtinumo intervalai nurodyti 2 lentelėje. Reikia patvirtinti dokumentais, kad NC paveiktas audinys yra stabilus kultūroje (gaunami panašūs gyvybingumo matavimo rezultatai) visą veikimo medžiaga laikotarpį.

2 lentelė

Neigiamo poveikio kontrolinės medžiagos OD verčių priimtinumo intervalai

	Apatinė priimtinumo riba	Viršutinė priimtinumo riba
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Apsauginė funkcija

18. *Stratum corneum* ir jo lipidų sudėtis turi būti pakankama, kad jie būtų atsparūs greitam cheminių citotoksinių žymeklių, pvz., SDS arba Triton X-100, prasiskverbimui, įvertintam matuojant IC_{50} arba ET_{50} (3 lentelė).

Morfologija

19. Turi būti atliktas RhE modelio histologinis tyrimas, siekiant įrodyti, kad ji turi į žmogaus *epidermį* panašią struktūrą (įskaitant daugiasluoksnį *stratum corneum*).

Atkuriamumas

20. Reikia įrodyti bandymo metodo rezultatų, gautų naudojant teigiamo poveikio kontrolinę cheminę medžiagą (PC) ir neigiamo poveikio kontrolines medžiagas (NC), ilgalaikį atkuriamumą.

Kokybės kontrolė (angl. *quality control*, QC)

21. RhE modelio gamintojas/tiekėjas turi užtikrinti ir įrodyti, kad kiekviena naudojama RhE modelio partija atitinka nustatytus produkcijos išleidimo kriterijus, iš kurių svarbiausi yra *gyvybingumo* (17), *apsauginės funkcijos* (18 skirsnis) ir *morfologijos* (19 skirsnis) kriterijai. Šie duomenys turi būti pateikti taikantiesiems metodą, kad jie galėtų įtraukti šią informaciją į bandymo ataskaitą. IC_{50} arba ET_{50} priimtinumo intervalą (viršutinę ir apatinę ribas) turi nustatyti RhE modelio gamintojas/tiekėjas (arba tyrėjas, kai naudojamas vietinis modelis). Tik su kokybiškais audiniais gauti rezultatai gali būti laikomi patikimais prognozuojant dirginimo klasifikaciją. 3 lentelėje pateikti patvirtinto tinkamumo trijų metodų priimtinumo intervalų pavyzdžiai.

▼M3

3 lentelė

QC partijos išleidimo kriterijų pavyzdžiai

	Apatinė priimtinumo riba	Viršutinė priimtinumo riba
EpiSkin™ (SM) (18 valandų apdorojimas naudojant SDS)(26)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % „Triton X-100“)(27)	ET_{50} = 4,8 val.	ET_{50} = 8,7 val.
SkinEthic™ RHE (1 % „Triton X-100“)(28)	ET_{50} = 4,0 val.	ET_{50} = 9,0 val.

Bandomosios ir kontrolinės cheminių medžiagų užtepimas

22. Kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai ir kontrolinei medžiagai kiekvienoje bandymo serijoje turi būti naudojami bent trys kartotiniai bandiniai. Tiriant skystąsias ir kietąsias medžiagas, naudojamos bandomosios cheminės medžiagos kiekis turi būti pakankamas, kad *epidermio* paviršius būtų tolygiai padengtas medžiaga, bet vengiama neribotos dozės, t. y. naudotinas minimalus kiekis turi būti 25 µl/cm^2 arba 25 mg/cm^2. Jei bandomos kietosios medžiagos, prieš jų užtepimą *epidermio* paviršių reikia suvilgyti dejonizuotu arba distiliuotu vandeniu, kad būtų užtikrintas geras bandomosios cheminės medžiagos sąlytis su *epidermio* paviršiumi. Jei įmanoma, kietąsias medžiagas reikia bandyti smulkių miltelių pavidalu. Pasibaigus veikimo medžiaga laikotarpiui, bandomoji medžiaga turi būti kruopščiai nuplauta nuo *epidermio* paviršiaus vandeniniu buferiniu tirpalu arba 0,9 % NaCl. Atsižvelgiant į tai, kuris iš trijų patvirtinto tinkamumo RhE metodas taikomas, poveikio trukmė gali būti nuo 15 iki 60 min, o inkubavimo temperatūra – nuo 20 °C iki 37 °C. Šios poveikio trukmės ir temperatūros optimizuojamos kiekvienam RhE metodui ir išreiškia skirtingas būdingąsias šių metodų savybes; išsamiau žr. šių metodų standartines taikymo procedūras (SOP) (26) (27) (28).

23. Kiekvienoje bandymų serijoje lygiagrečiai turi būti naudojamos NC ir PC, siekiant įrodyti, kad gyvybingumas (su NC), apsauginė funkcija ir pasireiškęs audinių jautrumas (su PC) atitinka anksčiau sukauptų duomenų priimtinumo intervalą. Siūloma PC yra 5 % vandeninis SDS. Siūlomos NC cheminės medžiagos yra vanduo arba fiziologinis tirpalas fosfatiniame buferyje (angl. *phosphate buffered saline*, PBS).

Ląstelių gyvybingumo matavimai

24. Svarbiausias bandymo procedūros elementas yra tai, kad gyvybingumas matuojamas ne iš karto, kai baigiama veikti bandomąja chemine medžiaga, bet praėjus pakankamai ilgam inkubaciniam laikotarpiui po veikimo ir audinių plovimo šviežia terpe. Per šį laikotarpį sudaromos sąlygos atsigauti po silpno dirginimo poveikio ir atsirasti aiškiam citotoksiniam poveikiui. Bandymo optimizavimo tarpsniu (11) (12) (13) (14) (15) buvo nustatyta, kad optimali inkubacinio laikotarpio po apdorojimo trukmė lygi 42 h.

25. MTT bandymas yra patvirtinto tinkamumo kiekybinis metodas, kuris turi būti taikomas ląstelių gyvybingumui pagal šį BM matuoti. Jis yra suderinamas su trimačiu audinio modeliu. Audinio ėminys 3 valandas laikomas reikiamos koncentracijos MTT tirpale (pvz., 0,3–1 mg/ml). Mėlynos spalvos formazano junginio nuosėdos ekstrahuojamos iš audinio tirpikliu (pvz., izopropanoliu, parūgštintu izopropanoliu), o formazano koncentracija matuojama nustatant OD esant 570 nm bangų ilgiui ir ne didesniam kaip ± 30 nm filtro juostos pločiui.

▼M3

26. Bandomosios cheminės medžiagos optinės savybės arba jos cheminis poveikis MTT gali trukdyti atliekant tyrimą ir taip gali būti gautas klaidingas gyvybingumo įvertis (nes bandomoji medžiaga gali trukdyti atsirasti spalvai, leisti jai išnykti arba sukelti spalvos atsiradimą). Tai gali įvykti, kai tam tikra bandomoji medžiaga nevisiškai pašalinama iš audinio skalaujant arba kai ji prasiskverbia į *epidermį*. Jei bandomoji cheminė medžiaga tiesiogiai veikia MTT (MTT reduktorių), yra iš prigimties spalvota arba nusidažo apdorojant audinį, reikia naudoti papildomas kontrolines medžiagas, kad būtų galima aptikti bandomosios cheminės medžiagos trikdžius taikomam gyvybingumo matavimo metodui ir padaryti pataisą. Išsamų aprašą, kaip taikyti pataisą tiesioginiam MTT redukavimui ir trikdžiams dėl dažalų, galima rasti trijų patvirtinto tinkamumo metodų SOP (26) (27) (28).

Priimtinumo kriterijai

27. Pagal kiekvieną metodą, kai taikomos patvirtinto tinkamumo RhE modelių partijos (žr. 21 skirsnį), turi būti gautos tokios NC paveiktų audinių OD vertės, kurios rodytų visus vežimo bei priėmimo etapus ir visą dirginimo bandymo protokolo procesą praėjusių audinių kokybę. Kontrolinių medžiagų OD vertės neturi būti mažesnės nei pagal anksčiau sukauptus duomenis nustatytos apatinės ribinės vertės. Panašiai, PC, t. y. 5 % vandeniniu SDS, paveikti audiniai turi gebėti atsakyti į dirginančios cheminės medžiagos veikimą BM sąlygomis (26) (27) (28). Reikia nustatyti susijusius ir tinkamus kartotinių audinių kintamumo matus (pvz., jei taikomi standartiniai nuokrypiai (angl. *standard deviation*, SD), jie turi būti iš vienpusio 95 % leidžiamųjų nuokrypų intervalo, apskaičiuoto pagal anksčiau sukauptus duomenis; VRM SD < 18 %).

Rezultatų aiškinimas ir prognozavimo modelis

28. Gautos kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos OD vertės gali būti taikomos nustatant gyvybingumo procentinę dalį, palyginti su NC, kurių gyvybingumas prilyginamas 100 %. Ribinė ląstelių gyvybingumo procentinės dalies vertė, skirianti dirginančias bandomąsias chemines medžiagas nuo neklasifikuojamųjų, ir statistinė (-ės) procedūra (-os), taikyta (-os) rezultatams įvertinti ir dirginančioms cheminėms medžiagoms identifikuoti, turi būti aiškiai apibrėžtos ir patvirtintos dokumentais, taip pat turi būti įrodytas jų tinkamumas. Toliau pateiktos dirginimui prognozuoti naudojamos ribinės vertės:

— laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga yra dirginanti odą pagal JT GHS/ES KŽP 2-ąją kategoriją, jei audinio gyvybingumas po veikimo medžiaga ir paskesnio inkubavimo yra mažesnis arba lygus (≤) 50 %,

— atsižvelgiant į reglamentavimo sistemą, kurioje naudojami šio BM rezultatai, gali būti laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga yra nedirginanti odos pagal JT GHS/ES KŽP „nėra kategorijos“ klasifikaciją, jei audinio gyvybingumas po veikimo medžiaga ir paskesnio inkubavimo yra didesnis kaip (>) 50 %.

DUOMENYS IR ATASKAITŲ TEIKIMAS

Duomenys

29. Lentelėse turi būti pateikti kiekvieno atskiro audinio kartotinio bandinio duomenys (pvz., optinio tankio vertės ir apskaičiuotų ląstelių gyvybingumo procentinių verčių duomenys kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai, įskaitant klasifikavimą), įtraukiant ir pakartotų bandymų, jei reikia, duomenis. Be to, ataskaitoje reikia pateikti kiekvienos bandymų serijos vidutinės vertės ± standartinio nuokrypio duomenis. Ataskaitoje reikia nurodyti pastebėtas spalvotų bandomųjų cheminių medžiagų sąveikas su MTT reagentu.

▼M3

Bandymo ataskaita

30. Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

Bandomoji ir kontrolinė cheminės medžiagos:

— cheminis (-iai) pavadinimas (-ai), pvz., CAS pavadinimas ir CAS numeris, EC pavadinimas ir numeris, jei žinomas,

— grynumas ir sudėtis (masės procentine (-ėmis) dalimi (-is)),

— fizikinės ir cheminės savybės (pvz., fizinė būsena, stabilumas, lakumas, pH ir tirpumas vandenyje, jei žinomas), svarbios atliekamam tyrimui),

— bandomųjų ir (arba) kontrolinių cheminių medžiagų apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas),

— laikymo sąlygos.

RhE modelio ir naudoto protokolo pagrindimas.

Bandymo sąlygos:

— naudota ląstelių sistema,

— visa su konkrečiu RhE modeliu susijusi informacija, įskaitant jo naudojimo charakteristikas. Ją turi sudaryti šie ir kiti duomenys:

  i) gyvybingumas;

  ii) apsauginė funkcija;

  iii) morfologija;

  iv) atkuriamumas ir prognozuojamumas;

  v) kontrolinės medžiagos modelio kokybei nustatyti,

— išsami informacija apie taikytą bandymo procedūrą:

— naudotos bandomosios dozės, veikimo medžiaga trukmė ir inkubacinis laikotarpis po veikimo,

— visų bandymo procedūros pakeitimų aprašymas,

— nuoroda į anksčiau sukauptus modelio duomenis. Ją turi sudaryti šie ir kiti duomenys:

  i) kokybės kontrolės duomenų priimtinumas atsižvelgiant į anksčiau sukauptus partijos duomenis;

  ii) teigiamų ir neigiamų kontrolinių verčių priimtinumas atsižvelgiant į teigiamo ir neigiamo poveikio kontrolinių medžiagų vidurkius ir intervalus,

— taikytų vertinimo kriterijų, įskaitant prognozės modelio ribinio (-ių) taško (-ų) pagrindimo kriterijus, aprašymas,

— nuoroda į anksčiau sukauptus duomenis.

▼M3

Rezultatai:

— atskirų bandomųjų cheminių medžiagų kiekvienos bandymų serijos ir kiekvieno kartotinio matavimo duomenų lentelės,

— su tiesioginiais MTT reduktoriais ir (arba) spalvotomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis naudotų kontrolinių medžiagų nuoroda,

— kitų pastebėtų reiškinių aprašymas.

Rezultatų aptarimas

Išvada

NUORODOS

(1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

(2) EC-ECVAM (2009), Statement on the „Performance under UN GHS of three *in vitro* assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards“, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(3) 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006. OL L 353, 2008 12 31, p. 1.

(4) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(5) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 430, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(6) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 431, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(7) OECD (2006), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) EC-ECVAM (2009), Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE)? Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(9) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment No. 34, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(10) 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. and Botham, P. (2001), A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team, Toxicol. in Vitro 15, 57–93.

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

▼M3

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

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests – An assessment of the performance of the optimised test, ATLA 33, 351–367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005), The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329–349.

(15) 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. and Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109–129.

(16) Spielmann, H., mailto:Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto:Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, ATLA 35, 559–601.

(17) Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1-α. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603–619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (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, 14, 351–358.

(20) EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(22) EC-ECVAM (2008), Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(23) OECD (2010), Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, No. 137, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html]

(24) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004), *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models, Toxicol. in Vitro 18, 231–243.

▼**M3**

(25) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65, 55–63.

(26) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min - 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis, pp 7–18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(30) 2001 m. rugpjūčio 6 d. Komisijos direktyva 2001/59/EB, 28-tą kartą derinanti su technikos pažanga Tarybos direktyvą 67/548/EEB dėl įstatymų ir kitų teisės aktų, reglamentuojančių pavojingų medžiagų klasifikavimą, pakavimą ir ženklinimą etiketėmis, suderinimo, OL L 225, 2001 8 21, p. 1.

(31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. and Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. Contact Dermatitis 51, 1–4.

(32) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. and Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal *in vivo* data, ALTEX, 14, 359–365.

(33) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. and Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, Contact Dermatitis, 62, 109–116.

▼M3

1 priedėlis

Apibrėžtys

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių artumas. Tikslumas yra bandymo metodo naudojimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo metodo rezultatų dalį (9).

Ląstelių gyvybingumas – parametras suminiam ląstelių populiacijos aktyvumui matuoti, pvz., ląstelių mitochondrinių dehidrogenazių geba redukuoti gyvybinį dažiklį MTT ([3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolinio bromidą, tiazolilo mėlį), kuris, atsižvelgiant į galutinį matuojamą dydį ir taikomą bandymo schemą, yra susijęs su suminių ląstelių kiekiu ir (arba) jų gyvybingumu.

Sutapimas – tai yra bandymo metodų, kuriais gaunami vienareikšmiai rezultatai, naudojimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas vartojamas kaip lygiavertis terminui „tikslumas“ ir apibrėžiamas kaip dalis visų išbandytų cheminių medžiagų, kurios tiksliai klasifikuotos kaip teigiamos arba neigiamos (9).

ET_{50} – gali būti įvertintas kaip veikimo trukmė, per kurią ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % jas veikiant tam tikros pastovios koncentracijos cheminiu žymekliu, žr. taip pat IC_{50}.

ES KŽP (2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo) – Europos Sąjungos (ES) įgyvendina JT GHS cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimo sistemą (3).

GHS (Visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema) – sistema, kurioje pateikiama cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikacija pagal standartizuotus fizinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir nagrinėjami atitinkami informaciniai elementai, pvz., piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojaus pareiškimai, įspėjamieji pareiškimai ir saugos duomenų lapai, kad būtų galima informuoti apie medžiagų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbuotojus, darbininkus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likvidatorius) ir aplinką (1).

IC_{50} – gali būti įvertintas kaip cheminio žymeklio koncentracija, kuriai esant ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % (IC_{50}) praėjus nustatytai veikimo trukmei, žr. taip pat ET_{50}.

Neribota dozė – ant *epidermio* tepamas bandomosios medžiagos kiekis, didesnis už kiekį, kurio reikia visiškai ir tolygiai uždengti *epidermio* paviršių.

„Aš irgi“ (angl. me-too) bandymas – šnekamosios kalbos pasakymas, kuriuo vadinamas bandymo metodas, struktūriškai ir funkciškai panašus į patvirtinto tinkamumo ir pripažintą pamatinį bandymo metodą. Toks bandymo metodas gali būti taikomas palyginamajam tinkamumo patvirtinimui. Taikomas pakaičiui su panašiu bandymo metodu (9).

Naudojimo charakteristikų standartai (angl. PS) – standartai, pagrįsti patvirtinto tinkamumo bandymo metodu, sudarantys pagrindą įvertinti siūlomo funkciškai ir mechanistiškai panašaus bandymo metodo palyginamumą. Įtraukiami šie dalykai: i) esminiai bandymo metodo komponentai, ii) būtinasis sąrašas etaloninių cheminių medžiagų, parinktų iš tų medžiagų, kurios naudojamos patvirtinto tinkamumo bandymo metodo priimtinoms naudojimo charakteristikoms įrodyti, ir iii) panašus tikslumo ir patikimumo lygis, atsižvelgiant į pasiekiamąjį patvirtinto tinkamumo bandymo metodu, kurį siūlomas bandymo metodas turi turėti vertinamas pagal būtinąjį etaloninių cheminių medžiagų sąrašą (9).

▼M3

Etaloninės cheminės medžiagos – cheminės medžiagos, kurios yra pasirinktos naudoti tinkamumo patvirtinimo procese ir kurių atveju atsakas *in vitro* arba *in vivo* etaloninėje bandymo sistemoje arba dominančių rūšių atsakas jau žinomas. Šios cheminės medžiagos turi būti tipinės cheminių medžiagų klasėms, kurioms numatyta taikyti bandymo metodą, ir turi perteikti visus atsakus, kurių tikimasi iš cheminių medžiagų, kurioms gali būti taikomas metodas – tiek stiprius, tiek silpnus, tiek neigiamus. Skirtingais tinkamumo patvirtinimo proceso etapais ir skirtingiems bandymo metodams bei paskirtims gali prireikti skirtingų etaloninių cheminių medžiagų rinkinių (9).

Tinkamumas – bandymo ir dominančio poveikio sąryšio ir bandymo prasmingumo bei naudingumo konkrečiam tikslui apibūdinimas. Tai yra matas, kiek tiksliai bandymu išmatuojamas ar numanomas dominantis biologinis poveikis. Tinkamumas apima bandymo metodo tikslumo (sutapimo) aspektą (9).

Patikimumas – juo įvertinamas laipsnis, kuriuo bandymo metodas gali būti ilgainiui atkartojamai atliekamas vienoje ir skirtingose laboratorijose, taikant tą patį protokolą. Jis įvertinamas skaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų (9).

Pakaitinis bandymas – bandymas, skirtas pakeisti bandymą, kuris paprastai naudojamas ir pripažintas tinkamu pavojui nustatyti ir (arba) rizikai įvertinti, ir nustatytas kaip visomis įmanomomis bandymo aplinkybėmis ir naudojant visas galimas cheminės medžiagas užtikrinantis lygiavertę ar geresnę žmonių ar gyvūnų sveikatos arba aplinkos apsaugą (pagal paskirtį), palyginti su pripažintu bandymu (9).

Jautrumas – visų teigiamų (veikliųjų) medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami vienareikšmiai rezultatai, tikslumo matas ir yra svarbus bandymo metodo tinkamumo vertinimo veiksnys (9).

Odos dirginimas – grįžtamosios odos pažaidos gavimas po bandomosios medžiagos užtepimo ne ilgiau kaip 4 valandoms. Odos dirginimas yra vietinis neimunogeninis atsakas, kuris atsiranda netrukus po veikimo medžiaga (29). Jo pagrindinė savybė – grįžtamumas vykstant uždegiminiams atsakams ir esant su uždegiminiu procesu susijusiems būdingiems klinikiniams dirginimo požymiams (eritemai, edemai, niežėjimui ir skausmui).

Specifiškumas – visų neigiamų (neveikliųjų) medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami vienareikšmiai rezultatai, tikslumo matas ir yra svarbus bandymo metodo tinkamumo vertinimo veiksnys (9).

Nuosekliųjų bandymų strategija – bandymai taikant bandymo metodus nuosekliu būdu; kiekvienu paskesniu lygiu bandymo metodai parenkami remiantis ankstesnio bandymo lygio rezultatais (9).

Bandomoji cheminė medžiaga (dar vadinama bandomąja medžiaga) – bet kuri medžiaga ar mišinys, bandomi taikant šį bandymų metodą.

▼M3

2 priedėlis

Naudojimo charakteristikų standartai, skirti įvertinti siūlomus panašius ar pakeistus *in vitro* rekonstruoto žmogaus *epidermio* (RhE) metodus odos jautrinimui nustatyti

ĮVADAS

1. Naudojimo charakteristikų standartų (angl. PS) paskirtis – pateikti pagrindą, kuriuo remiantis būtų galima nustatyti, ar nauji bandymo metodai, tiek patentuoti (t. y. saugomi autoriaus teisių, turintys prekės ženklą, registruoti), tiek nepatentuoti, pasižymi pakankamu tikslumu ir patikimumu konkretiems bandymo tikslams. Šie PS, pagrįsti patvirtinto tinkamumo ir pripažintais metodais, gali būti taikomi kitų panašių metodų (paprastai vadinamų „analogiškais“ bandymais), kurie grindžiami panašiais moksliniais principais ir kuriais matuojamas ar prognozuojamas tas pats biologinis ar toksinis poveikis, patikimumui ir tikslumui įvertinti (9).

2. Prieš naudojant modifikuotus metodus (t. y. pasiūlytus galimus patvirtino bandymo metodo patobulinimus), turi būti atliktas įvertinimas, skirtas nustatyti siūlomų pokyčių poveikį bandymo naudojimo charakteristikoms ir kaip smarkiai tokie pokyčiai paveiks turimą informaciją, skirtą kitiems tinkamumo patvirtinimo proceso komponentams. Atsižvelgiant į siūlomų pokyčių skaičių ir pobūdį, gautus duomenis ir tuos pakyčius remiančius dokumentus, modifikuotiems metodams taikomas toks pat tinkamumo patvirtinimo procesas kaip ir aprašytas naujam bandymui arba, jei tinka, ribotas patikimumo ir tinkamumo įvertinimas taikant nustatytus PS (9).

3. Panašūs („me-too“) arba modifikuoti kurio nors iš trijų patvirtinto tinkamumo metodų [„EpiSkin™“ (patvirtinto tinkamumo pamatinis metodas – VRM), „EpiDerm™“ SIT (EPI-200) ir „SkinEthic™“ RHE] metodai, siūlomi naudoti pagal šį BM, turi būti įvertinti, kad būtų galima nustatyti jų patikimumą ir tikslumą naudojant chemines medžiagas, kurios atitinka visą Draize dirginimo balų intervalą. Kai įvertinama naudojant 20 rekomenduojamų etaloninių cheminių medžiagų (1 lentelė), pasiūlytų panašių ar modifikuotų metodų patikimumo ir tikslumo vertės turi būti panašios ar geresnės už vertes, gautas VRM (2 lentelė) (2) (16). Tikslumo ir patikimumo vertės, kurias reikia pasiekti, pateiktos šio priedėlio 8–12 skirsniuose. Įtrauktos atitinkamas cheminių medžiagų klases atstovaujančios neklasifikuojamos (JT GHS/ES KŽP „nėra kategorijos“) ir klasifikuojamos (JT GHS/ES KŽP 2-osios kategorijos) (1) medžiagos, kad pasiūlyto metodo patikimumą ir tikslumą) būtų galima palyginti su VRM rodikliais. Metodo patikimumas, galimybės juo tinkamai identifikuoti JT GHS/ES KŽP 2-osios kategorijos dirginančias chemines medžiagas ir, atsižvelgiant į reglamentavimo sistemą, pagal kurią gaunami duomenys, galimybės juo tinkamai identifikuoti JT GHS/ES KŽP kategorijos neturinčias chemines medžiagas turi būti nustatyti prieš pradedant jį taikyti naujų medžiagų bandymams.

4. Šie PS yra pagrįsti EC-ECVAM PS (8), atnaujintais pagal JT GHS ir ES KŽP klasifikavimo ir ženklinimo sistemas (1) (3). Pradiniai PS buvo apibrėžti atlikus tinkamumo patvirtinimo tyrimą (21) ir pagrįsti ES klasifikavimo sistema, apibrėžta 2001 m. rugpjūčio 6 d. Komisijos direktyvoje 2001/59/EB, 28-tą kartą derinančioje su technikos pažanga Tarybos direktyvą 67/548/EEB dėl įstatymų ir kitų teisės aktų, reglamentuojančių pavojingų medžiagų klasifikavimą, pakavimą ir ženklinimą etiketėmis, suderinimo ([1]). Dėl JT GHS sistemos patvirtinimo klasifikavimui ir ženklinimui

([1]) OL L 225, 2001 8 21, p. 1.

▼M3

ES (ES KŽP) (3), kas įvyko tarp šio BM tinkamumo patvirtinimo tyrimo užbaigimo ir pabaigimo, PS buvo atnaujinti (8). Šis atnaujinimas daugiausia susijęs su: i) PS etaloninių cheminių medžiagų rinkiniu ir ii) nustatytomis patikimumo ir tikslumo vertėmis (2) (23).

RHE ODOS DIRGINIMO *IN VITRO* BANDYMO METODŲ NAUDOJIMO CHARAKTERISTIKŲ STANDARTAI

5. PS sudaro šie trys elementai (9):

I) Esminiai bandymo metodo komponentai

II) Būtinasis etaloninių cheminių medžiagų sąrašas

III) Nustatytos patikimumo ir tikslumo vertės

I) **Esminiai bandymo metodo komponentai**

6. Juos sudaro patvirtino tinkamumo metodo esminiai struktūriniai, funkciniai ir procedūriniai elementai, kurie turi būti įtraukti į pasiūlyto mechanistiškai ir funkciškai panašaus arba modifikuoto metodo protokolą. Šie komponentai apima unikalias metodo charakteristikas, svarbiausias procedūros detales ir kokybės kontrolės priemones. Esminių bandymo komponentų laikymasis padeda užtikrinti, kad panašus arba modifikuotas siūlomas metodas būtų grindžiamas tomis pačiomis sąvokomis kaip ir atitinkamas VRM (9). Esminiai bandymo metodo komponentai išsamiai aprašyti BM 16–21 skirsniuose, o bandymas turi būti atliekamas laikantis šių dalykų:

— Bendrųjų sąlygų (16 skirsnis)

— Funkcinių sąlygų, kurios apima:

— gyvybingumą (17 skirsnis),

— apsauginę funkciją (18 skirsnis),

— morfologiją (19 skirsnis),

— atkuriamumą (20 skirsnis) ir

— kokybės kontrolę (21 skirsnis).

II) **Būtinasis etaloninių cheminių medžiagų sąrašas**

7. Etaloninės cheminės medžiagos naudojamos nustatyti, ar panašaus arba modifikuoto metodo, kuris įrodyta, kad yra struktūriškai ir funkciškai pakankamai panašus į VRM arba atitinka nedidelį vieno iš trijų patvirtinto tinkamumo metodų pakeitimą, patikimumas ir tikslumas yra panašus ar geresnis už VRM rodiklius (2) (8) (16) (23). 1 lentelėje išvardytos 20 rekomenduojamų etaloninių cheminių medžiagų yra iš skirtingų cheminių medžiagų klasių (t. y. jų kategorijų, pagrįstų funkcinėmis grupėmis) ir atitinka visą Draize dirginimo įverčių intervalą (nuo nedirginančios iki stipriai dirginančios). Į sąrašą įtrauktos cheminės medžiagos yra: 10 JT GHS/ES KŽP 2-osios kategorijos medžiagų ir 10 kategorijos neturinčių medžiagų, iš kurių 3 yra JT GHS 3-iosios papildomosios kategorijos cheminės medžiagos. Pagal šią bandymo metodą, 3-ioji papildomoji kategorija prilyginama „nėra kategorijos“. 1 lentelėje išvardytos cheminės medžiagos parinktos iš medžiagų, naudotų optimizavimo etapu, kuris buvo vykdomas po VRM pradinio tinkamumo patvirtinimo ir tinkamumo patvirtinimo tyrime, tikrinant cheminį funkcionalumą ir fizinį būvį (14) (18). Šios etaloninės cheminės medžiagos

▼M3

yra mažiausias skaičius medžiagų, kurias reikia naudoti siūlomo panašaus ar modifikuoto metodo tikslumui ir patikimui įvertinti, tačiau neturi būti naudojamos kuriant naujus metodus. Tais atvejais, kai sąraše cheminių medžiagų neturima, galima naudoti kitas medžiagas, apie kurias turima pakankamai *in vivo* duomenų, pirmiausia renkantis iš medžiagų, naudotų optimizavimo etapu po VRM pradinio tinkamumo patvirtinimo ir tinkamumo patvirtinimo tyrime. Jei norima, šį būtinąjį etaloninių cheminių medžiagų sąrašą galima papildyti kitomis cheminėmis medžiagomis, apie kurias turima pakankama *in vivo* duomenų, siekiant papildomai įvertinti siūlomo metodo tikslumą.

1 lentelė

Būtinasis etaloninių cheminių medžiagų sąrašas, skirtas panašaus ar modifikuoto RhE odos dirginimo metodo tikslumo ir patikimumo vertėms nustatyti ([1])

Cheminės medžiaga	CAS numeris	Fizikinė būsena	*In vivo* įvertis	VRM *in vitro* kat.	JT GHS/ES KŽP *in vivo* kat.
1-brom-4-chlorbutanas	6940–78–9	Skystis	0	2 kat.	Be kat.
dietilftalatas	84–66–2	Skystis	0	Be kat.	Be kat.
naftalenacto rūgštis	86–87–3	Kieta m.	0	Be kat.	Be kat.
alilfenoksiacetatas	7493–74–5	Skystis	0,3	Be kat.	Be kat.
izopropanolis	67–63–0	Skystis	0,3	Be kat.	Be kat.
4-metiltiobenzaldehidas	3446–89–7	Skystis	1	2 kat.	Be kat.
metilstearatas	112–61–8	Kieta m.	1	Be kat.	Be kat.
heptilbutiratas	5870–93–9	Skystis	1,7	Be kat.	Be kat.
heksilsalicilatas	6259–76–3	Skystis	2	Be kat.	Be kat.
cinamaldehidas	104–55–2	Skystis	2	2 kat.	Be kat. (*3-ioji papildomoji kat.*) ([8])
1-dekanolis ([7])	*112–30–1*	*Skystis*	*2,3*	*2 kat.*	*2 kat.*
ciklamenaldehidas	103–95–7	Skystis	2,3	2 kat.	2 kat.
1-bromheksanas	111–25–1	Skystis	2,7	2 kat.	2 kat.
2-chlormetil-3,5-dimetil-4-metoksipiridino hidrochloridas	86604–75–3	Kieta m.	2,7	2 kat.	2 kat.
di-n-propil disulfidas ([7])	*629–19–6*	*Skystis*	*3*	*Be kat.*	*2 kat.*
kalio hidroksidas (5 % vand.)	1310–58–3	Skystis	3	2 kat.	2 kat.
5–(1,1-dimetiletil)-2-metil benzentiolis	7340–90–1	Skystis	3,3	2 kat.	2 kat.
1-metil-3-fenil-1-piperazinas	5271–27–2	Kieta m.	3,3	2 kat.	2 kat.

▼M3

Cheminės medžiaga	CAS numeris	Fizikinė būsena	*In vivo* įvertis	VRM *in vitro* kat.	JT GHS/ES KŽP *in vivo* kat.
Heptanalis	111–71–7	Skystis	3,4	2 kat.	2 kat.
tetrachloretilenas	127–18–4	Skystis	4	2 kat.	2 kat.

([1]) Cheminių medžiagų atranka pagrįsta šiais kriterijais: i) chemines medžiagas galima nusipirkti, ii) jos atitinka visą Draize dirginimo balų intervalą (nuo nedirginančios iki stipriai dirginančios), iii) jos turi gerai apibrėžtą cheminę struktūrą, iv) jos atitinka tinkamumo patvirtinimo procese taikytą cheminį funkcionalumą ir v) jos nesusijusios su ypač didelio toksiškumo parametrais (pvz., kancerogeniškumu arba toksiškumu reprodukcijos sistemai) ir su labai didelėmis šalinimo išlaidomis.
([2]) Cheminės medžiagos, kurios yra dirginančios triušiui, bet yra patikimų įrodymų, kad jos nėra dirginančios žmonėms (31) (32) (33).
([3]) Pagal JT GHS, nėra ES KŽP.

III) **Nustatytos patikimumo ir tikslumo vertės**

8. Siekiant nustatyti pasiūlytų panašių ar modifikuotų metodų patikimumą ir tinkamumą, kad juos būtų galima taikyti skirtingose laboratorijose, visos 1 lentelėje išvardytos 20 etaloninių cheminių medžiagų turi būti išbandytos bent trijose laboratorijose. Tačiau, jei siūlomas metodas bus taikomas tik vienoje laboratorijoje, tinkamumui patvirtinti bandymai keliose laboratorijose nereikalingi. Vis dėlto svarbu, kad tokius tinkamumo patvirtinimo tyrimus nepriklausomai įvertintų pripažintos tarptautinės tvirtinimo institucijos, laikydamosi tarptautinių rekomendacijų (9). Kiekvienoje laboratorijoje visos 20 etaloninių cheminių medžiagų turi būti išbandytos trimis skirtingomis bandymų serijomis, atliekamomis su skirtingomis audinių partijomis ir per pakankamai ilgą laiko intervalą. Kiekvienos serijos metu turi būti lygiagrečiai išbandyti ne mažiau kaip trys audinių kartotiniai bandiniai, skirti kiekvienai įtrauktai cheminei medžiagai, NC ir PC.

9. Siūlomo metodo patikimumo ir tikslumo vertės turi būti skaičiuojamos atsižvelgiant į visus keturis toliau nurodytus kriterijus, užtikrinant, kad patikimumo ir tinkamumo vertės būtų apskaičiuojamos apibrėžtu ir nuosekliu būdu:

   1. Metodo variantiškumui laboratorijoje bei tarp laboratorijų ir prognozavimo gebai (tikslumui) apskaičiuoti tinka tik iki galo atliktų bandymų serijų duomenys.

   2. Galutinė kiekvienos iš etaloninių cheminių medžiagų klasifikacija kiekvienoje dalyvaujančioje laboratorijoje turi būti gaunama taikant gyvybingumo vidutinę vertę, gautą iš skirtingų visos bandymų serijos bandymų.

   3. Metodo variantiškumui tarp laboratorijų apskaičiuoti tinka tik tie cheminių medžiagų duomenys, kurie gauti iki galo atlikus bandymų serijas visose dalyvaujančiose laboratorijose.

   4. Tikslumo vertės turi būti skaičiuojamos remiantis atskirų laboratorijų prognozėmis, kurias 20-čiai etaloninių cheminių medžiagų gavo skirtingos dalyvaujančios laboratorijos.

   Šiuo aspektu **bandymų seką** sudaro trys nepriklausomos serijos, vienoje laboratorijoje atliekamos su viena bandomąja chemine medžiaga. **Iki galo atlikta seka** – tai vienos bandomosios cheminės medžiagos bandymų serijų seka vienoje laboratorijoje, kurios visų serijų rezultatai galiojantys. Tai reiškia, kad dėl bet kurios negaliojančios serijos tampa netinkami visos trijų serijų sekos rezultatai.

Atkuriamumas laboratorijoje

10. Atlikus atkuriamumo laboratorijoje įvertinimą, klasifikacijų (JT GHS/ES KŽP 2-oji kategorija ir „nėra kategorijos“), nustatytų skirtingomis nepriklausomomis 20 etaloninių cheminių medžiagų bandymų serijomis vienoje laboratorijoje, sutapimas turi būti lygus arba didesnis (≥) kaip 90 %.

▼M3

Tarplaboratorinis atkuriamumas

11. Jei siūlomas metodas bus taikomas tik vienoje laboratorijoje, tarplaboratorinio atkuriamumo įvertinimas nebūtinas. Jei metodai skirti naudoti skirtingose laboratorijose, klasifikacijų (JT GHS/ES KŽP 2-oji kategorija ir „nėra kategorijos“), nustatytų skirtingomis nepriklausomomis 20 etaloninių cheminių medžiagų bandymų serijomis ne mažiau kaip trijose laboratorijose sutapimas turi būti lygus arba didesnis (≥) kaip 80 %.

Prognozavimo geba (tikslumas)

12. Siūlomo panašaus ar modifikuoto metodo tikslumas (jautrumas, specifiškumas ir bendras tikslumas) turi būti panašus ar geresnis už VRM rodiklius, atsižvelgiant į papildomą informaciją, susijusią su dominančios rūšies tinkamumu (2 lentelė). Jautrumas turi būti lygus arba didesnis (≥) kaip 80 % (2) (8) (23). Tačiau papildomas specialus apribojimas taikomas pasiūlyto *in vitro* metodo jautrumui, nes tik *in vivo* 2-osios kategorijos cheminės medžiagos, *1-dekanolis* ir *di-n-propil disulfidas*, gali būti neteisingai klasifikuotos kaip neturinčios kategorijos daugiau kaip vienoje dalyvaujančioje laboratorijoje. Specifiškumas turi būti lygus arba didesnis (≥) kaip 70 % (2) (8) (23). Nėra papildomų apribojimų siūlomo *in vitro* metodo specifiškumui, t. y. bet kuri dalyvaujanti laboratorija gali neteisingai klasifikuoti bet kurią *in vivo* kategorijos neturinčia cheminę medžiagą, jei galutinis bandymo metodo specifiškumas atitinka priimtinas ribas. Bendras tikslumas turi būti lygus arba didesnis (≥) kaip 75 % (2) (8) (23). Nors 1 lentelėje išvardytų 20 etaloninių cheminių medžiagų VRM jautrumas lygus 90 %, apibrėžta mažiausia jautrumo vertė bet kuriam panašiam ar modifikuotam metodui nustatyta 80 %, nes tiek*1-dekanolis* (ribinė cheminė medžiaga), tiek *di-n-propil disulfidas* (klaidingai neigiama VRM medžiaga) žinomos kaip nedirginančios žmonėms (31) (32) (33), nors bandymuose su triušiais nustatytos kaip dirginančios. Kadangi RhE modeliai grindžiami žmogaus kilmės ląstelėmis, jie gali prognozuoti šias chemines medžiagas kaip nedirginančias (JT GHS/ES KŽP „nėra kategorijos“).

2 lentelė

Būtinosios jautrumo, specifiškumo ir bendro tikslumo prognozinės vertės, kad bet kuris panašus ar modifikuotas metodas būtų laikomas galiojančiu

Jautrumas	Specifiškumas	Bendras tikslumas
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Tyrimo priimtinumo kriterijai

13. Gali būti, kad vienas ar keli bandymai, skirti vienai ar kelioms bandomosioms cheminėms medžiagoms, neatitinka bandymo priimtinumo kriterijų, skirtų bandomosioms ir kontrolinėms medžiagoms, arba yra nepriimtini dėl kitų priežasčių. Trūkstamiems duomenims gauti, kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai leidžiama atlikti iki dviejų papildomų bandymų („pakartotinis bandymas“). Tiksliau sakant, kadangi, bandant pakartotinai, reikia lygiagrečiai bandyti ir PC bei NC, kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai leidžiama atlikti iki dviejų papildomų bandymų serijų.

14. Suprantama, kad, net ir atlikus pakartotinius bandymus, mažiausias trijų galiojančių serijų skaičius kiekvienai išbandytai cheminei medžiagai nėra gaunamas su kiekviena etalonine chemine medžiaga kiekvienoje dalyvaujančioje laboratorijoje, todėl duomenų matrica gaunama ne visa. Tokiais atvejais, kad duomenų rinkiniai būtų laikomi priimtinais, turi būti laikomasi visų šių trijų kriterijų:

1. Su visomis 20 etaloninių cheminių medžiagų turi būti iki galo atlikta bent viena visa bandymų serijų seka.

▼**M3**

2. Kiekvienoje iš trijų dalyvaujančių laboratorijų, ne mažiau kaip 85 % serijų sekų turi būti iki galo atliktos (20 cheminių medžiagų; t. y. vienoje laboratorijoje leidžiamos trys negaliojančios bandymų serijų sekos).

3. Turi būti iki galo atlikta ne mažiau kaip 90 % visų galimų serijų sekų bent trijose laboratorijose (kai 20 cheminių medžiagų bandomos 3 laboratorijose; t. y. iš viso leidžiamos 6 negaliojančios bandymų serijų sekos).

▼M7

B.47. GALVIJŲ RAGENOS DRUMSTUMO IR PRALAIDUMO BANDYMO METODAS, SKIRTAS IDENTIFIKUOTI I) CHEMINES MEDŽIAGAS, SUKELIANČIAS SMARKŲ AKIŲ PAŽEIDIMĄ, IR II) CHEMINES MEDŽIAGAS, KURIŲ NEREIKIA KLASIFIKUOTI KAIP DIRGINANČIAS AKIS AR SUKELIANČIAS SMARKŲ AKIŲ PAŽEIDIMĄ

ĮVADAS

Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 437 (2013). Galvijų ragenos drumstumo ir pralaidumo (angl. *Bovine Corneal Opacity and Permeability*, BCOP) bandymo metodą 2006 m. ir 2010 m. įvertino Alternatyvių metodų patvirtinimo tarpžinybinio koordinavimo komitetas (angl. *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, ICCVAM) kartu su Europos alternatyvių metodų patvirtinimo centru (angl. *European Centre for the Validation of Alternative Methods*, ECVAM) ir Japonijos alternatyvių metodų patvirtinimo centru (angl. *Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods*, JaCVAM) (1)(2). Atliekant pirmąjį įvertinimą, buvo tiriama, ar BCOP bandymo metodas tinka nustatant chemines medžiagas (medžiagas ir mišinius), kurios sukelia smarkų akių pažeidimą (1). Atliekant antrąjį įvertinimą, buvo tiriama, ar BCOP bandymų metodas tinka nustatant chemines medžiagas (medžiagas ir mišinius), kurios neklasifikuojamos kaip dirginančios akis ar sukeliančios smarkų akių pažeidimą (2). BCOP tinkamumo patvirtinimo duomenų bazę iš viso sudarė 113 medžiagų ir 100 mišinių (2)(3). Atsižvelgiant į šiuos įvertinimus ir jų ekspertizę buvo padaryta išvada, kad taikant bandymų metodą galima tinkamai identifikuoti chemines medžiagas (medžiagas ir mišinius), sukeliančias smarkų akių pažeidimą (1 kategorijos), taip pat medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti kaip dirginančias akis ar sukeliančias smarkų akių pažeidimą, kaip apibrėžta Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemoje (GHS) (4) ir Reglamente (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo (CLP) ([1]), todėl jis buvo patvirtintas kaip moksliškai tinkamas abiem tikslams. Smarkus akių pažeidimas – tai akies audinio pažeidimas arba smarkus fizinis regėjimo pablogėjimas, ant išorinio akies paviršiaus uždėjus bandomosios cheminės medžiagos, kuris ne visiškai praeina per 21 dieną nuo uždėjimo. Bandomosios cheminės medžiagos, kurios sukelia smarkų akių pažeidimą, pagal JT GHS klasifikuojamos kaip 1 kategorijos medžiagos. Cheminės medžiagos, neklasifikuojamos kaip dirginančios akis ar sukeliančios smarkų akių pažeidimą, apibrėžiamos kaip medžiagos, kurios neatitinka JT GHS 1 ar 2 kategorijos (2A ar 2B) klasifikavimo reikalavimų, t. y. jos nurodomos kaip JT GHS be kategorijos. Į šį bandymų metodą įtrauktas BCOP bandymų metodo rekomenduojamas taikymas ir apribojimai, pagrįsti jo įvertinimo darbais. Pagrindiniai skirtumai tarp EBPO bandymų gairių originalios 2009 m. versijos ir atnaujintos 2013 m. versijos yra susiję su šiais dalykais (tačiau ne tik): BCOP metodo taikymas nustatant chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti pagal JT GHS (2 ir 7 pastraipos); pateikti paaiškinimai dėl BCOP bandymo metodo taikomumo bandant alkoholius, ketonus ir kietąsias medžiagas (6 ir 7 pastraipos) bei medžiagas ir mišinius (8 pastraipa); paaiškinta, kaip reikėtų bandyti paviršinio aktyvumo medžiagas ir jų turinčius mišinius (28 pastraipa); atnaujintas ir paaiškintas teigiamų kontrolinių ėminių naudojimas (39 ir 40 pastraipos); atnaujinti BCOP bandymų metodo sprendimo priėmimo kriterijai (47 pastraipa); atnaujinti tyrimo priimtinumo kriterijai (48 pastraipa); atnaujinti bandymo ataskaitos elementai (49 pastraipa); atnaujintos 1 priedėlio apibrėžtys; papildytas 2 priedėlis dėl BCOP bandymų metodo tinkamumo prognozėms daryti pagal skirtingas klasifikavimo sistemas; atnaujintas 3 priedėlio kvalifikacijai tikrinti naudojamų cheminių medžiagų sąrašas ir atnaujintas 4 priedėlis dėl BCOP ragenos laikiklio (1 pastraipa) ir drumstumo matuoklio (2 ir 3 pastraipos).

([1]) 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353, 2008 12 31.

▼M7

Šiuo metu visuotinai pripažįstama, kad artimiausioje ateityje joks vienas *in vitro* akių dirginimo bandymas negalės pakeisti *Draize* akių bandymo *in vivo* siekiant prognozuoti skirtingų cheminių klasių visą dirginimo gebos intervalą. Tačiau kelių alternatyvių bandymų metodų strateginiai deriniai taikant (nuosekliųjų) bandymų strategiją galėtų pakeisti *Draize* akių bandymą (5). Žemynkryptis metodas (5) skirtas taikyti tada, kai, atsižvelgiant į esamą informaciją, daroma prielaida apie didelę cheminės medžiagos dirginamojo poveikio gebą, o aukštynkryptis metodas (5) skirtas taikyti tada, kai, atsižvelgiant į esamą informaciją, daroma prielaida, kad cheminė medžiaga nepakankamai dirgina akis, kad ją reikėtų klasifikuoti. BCOP bandymų metodas – bandymų metodas *in vitro*, kuris su tam tikrais apribojimais ir tam tikromis aplinkybėmis gali būti taikomas klasifikuoti ir ženklinti cheminėms medžiagoms, keliančioms pavojų akims. Nors kaip atskiras metodas BCOP metodas nelaikomas tinkamu pakeisti triušių akių bandymą *in vivo*, jis rekomenduojamas kaip pirmas bandymų strategijos etapas, pvz., žemynkryptis metodas, pasiūlytas Scott *et al.* (5), be papildomų bandymų nustatant chemines medžiagas, sukeliančias smarkų akių pažeidimą, t. y. chemines medžiagas, kurias reikia klasifikuoti kaip JT GHS 1 kategorijos medžiagas (4). BCOP bandymų metodas taip pat rekomenduojamas, kai reikia identifikuoti chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti kaip dirginančias akis ar sukeliančias smarkų akių pažeidimą, kaip apibrėžta JT GHS (JT GHS be kategorijos) (4), taikant bandymų strategiją, pvz., aukštynkryptį metodą (5). Tačiau cheminė medžiaga, kuri pagal BCOP bandymų metodą nelaikoma galinčia sukelti smarkų akių pažeidimą arba neklasifikuojama dėl akių dirginimo ar smarkaus akių pažeidimo, turėtų būti bandoma papildomai (*in vitro* ir (arba) *in vivo*) galutinei klasifikavimo kategorijai nustatyti.

Šio bandymo metodo tikslas – aprašyti procedūras, taikomas įvertinant bandomosios cheminės medžiagos keliamo pavojaus akims galimybę, matuojant jos gebą sukelti atskirai paimtos galvijo ragenos drumstumą ir padidėjusį pralaidumą. Toksinis poveikis ragenai vertinamas pagal: (i) sumažėjusį šviesos pralaidumą (drumstumą) ir ii) padidėjusią fluoresceino natrio druskos dažiklio skverbtį (pralaidumą). Bandomąja chemine medžiaga paveiktos ragenos drumstumo ir pralaidumo vertinimo rezultatai bendrinami, kad būtų gautas *in vitro* dirginimo balas (angl. *In Vitro Irritancy Score*, IVIS), kuris naudojamas bandomosios cheminės medžiagos dirginimo gebos lygiui klasifikuoti.

Apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

Šis bandymų metodas pagrįstas ICCVAM BCOP bandymo metodo protokolu (6)(7), kuris iš pradžių buvo sukurtas pagal informaciją, gautą iš *In vitro* bandymų metodų instituto (angl. *Institute for* In Vitro *Sciences*, IIVS) protokolo ir iš INVITTOX protokolo Nr. 124 (8). Pastarasis atitinka protokolą (10), kuris buvo naudojamas 1997–1998 m. atliekant Europos bendrijos finansuotą preliminaraus patvirtinimo tyrimą. Abu šie protokolai buvo pagrįsti BCOP bandymų metodu, kurį pirmasis paskelbė Gautheron *et al*. (9).

BCOP bandymų metodas gali būti taikomas nustatant chemines medžiagas, kurios sukelia smarkų akių pažeidimą, kaip apibrėžta JT GHS, t. y. chemines medžiagas, kurias reikia priskirti JT GHS 1 kategorijai (4). Kai taikomas šiuo tikslu, BCOP bandymų metodo visuminis tikslumas – 79 % (150/191), klaidingai teigiamų rezultatų dalis – 25 % (32/126), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – 14 % (9/65), palyginti su triušio akies bandymo metodo *in vivo* duomenimis, klasifikuojamais pagal JT GHS klasifikavimo sistemą (3) (žr. 2 priedėlio 1 lentelę). Kai tam tikrų cheminių (t. y. alkoholių, ketonų) ar fizikinių (t. y. kietųjų medžiagų) klasių bandomosios cheminės medžiagos pašalinamos iš duomenų bazės, BCOP bandymo metodo bendras tikslumas pagal JT GHS klasifikavimo sistemą siekia 85 % (111/131), klaidingai teigiamų rezultatų dalis – 20 % (16/81), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – 8 % (4/50) (3). Galimi BCOP bandymo metodo trūkumai, kai jis taikomas nustatant chemines medžiagas, kurios sukelia smarkų akių pažeidimą (JT GHS 1 kategorijos), susiję su didele klaidingai teigiamų rezultatų dalimi bandant alkoholius bei ketonus

▼M7

ir didele klaidingai neigiamų rezultatų dalimi bandant kietąsias medžiagas, kaip nurodyta tinkamumo patvirtinimo duomenų bazėje (1)(2)(3). Tačiau kadangi taikant BCOP bandymų metodą neteisingai įvertinami ne visi alkoholiai ar ketonai, o kai kurie tiksliai nustatomi kaip JT GHS 1 kategorijos, šios dvi organinės funkcinės grupės nelaikomos nepatenkančiomis į bandymo metodo taikymo sritį. Šio bandymo metodo naudotojas turi nuspręsti, ar galimas alkoholio arba ketono pervertinimas yra priimtinas ar reikia atlikti papildomus bandymus taikant įrodomosios duomenų galios metodą. Kalbant apie klaidingai neigiamų rezultatų dalį, reikėtų pažymėti, kad atliekant kietųjų medžiagų *Draize* akių dirginimo bandymą *in vivo*, gali susidaryti kintamos ir ribinės veikimo sąlygos, todėl gali būti gautos netinkamos jų tikrosios dirginamosios gebos prognozės (10). Taip pat reikėtų pažymėti, kad, identifikuojant chemines medžiagas, sukeliančias smarkų akių pažeidimą (JT GHS 1 kategorijos), nė vienai ICCVAM tinkamumo įvertinimo duomenų bazėje (2)(3) nurodytai klaidingai neigiamai cheminei medžiagai nebuvo gauta IVIS ≤ 3 vertė, kuri naudojama kaip kriterijus cheminę medžiagą identifikuojant kaip JT GHS be kategorijos. Be to, BCOP klaidingai neigiamas rezultatas šiame kontekste esmės nekeičia, nes, priklausomai nuo reglamentavimo reikalavimų, visos bandomosios cheminės medžiagos, kurioms gaunama 3 < IVIS ≤ 55 vertė, vėliau būtų bandomos atliekant tinkamai patvirtintus bandymus *in vitro* arba, blogiausiu atveju, atliekant bandymą su triušiais pagal įrodomosios duomenų galios metodą taikant nuoseklųjų bandymų strategiją. Kadangi taikant BCOP bandymų metodą kai kurios kietosios medžiagos yra tiksliai nustatomos kaip JT GHS 1 kategorijos medžiagos, ši agregatinė būsena taip pat nelaikoma nepatenkančia į bandymo metodo taikymo sritį. Tyrėjai galėtų spręsti, ar taikyti šį bandymų metodą visų tipų cheminėms medžiagoms, o IVIS > 55 turėtų būti priimta kaip smarkų akių pažeidimą sukeliančio atsako rodiklis ir cheminę medžiagą reikėtų klasifikuoti kaip JT GHS 1 kategorijos be papildomų bandymų. Tačiau, kaip buvo nurodyta pirmiau, alkoholiams ar ketonams gautus teigiamus rezultatus dėl galimo pervertinimo reikėtų aiškinti atsargiai.

BCOP bandymo metodą taip pat galima taikyti nustatant chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti kaip dirginančių akis arba sukeliančių smarkų akių pažeidimą pagal JT GHS klasifikavimo sistemą (4). Kai taikomas šiuo tikslu, BCOP bandymų metodo bendras tikslumas – 69 % (135/196), klaidingai teigiamų rezultatų dalis – 69 % (61/89), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – 0 % (0/107) palyginti su triušio akies bandymo metodo *in vivo* duomenimis, klasifikuojamais pagal JT GHS klasifikavimo sistemą (3) (žr. 2 priedėlio 2 lentelę). Gauta klaidingai teigiamų rezultatų dalis (*in vivo* JT GHS be kategorijos cheminės medžiagos, kurių IVIS > 3, žr. 47 pastraipą) yra labai didelė, bet šiame kontekste ji esmės nekeičia, nes, priklausomai nuo reglamentavimo reikalavimų, visos bandomosios cheminės medžiagos, kurioms gaunama 3 < IVIS ≤ 55 vertė, vėliau būtų bandomos atliekant tinkamai patvirtintus bandymus *in vitro* arba, blogiausiu atveju, atliekant bandymą su triušiais, pagal įrodomosios duomenų galios metodą taikant nuoseklųjų bandymų strategiją. BCOP bandymų metodas neturi specifinių trūkumų bandant alkoholius, ketonus ir kietąsias medžiagas, kai tikslas yra identifikuoti chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti kaip dirginančių akis arba sukeliančių smarkų akių pažeidimą (JT GHS be kategorijos) (3). Tyrėjai galėtų pamąstyti apie šio bandymo metodo taikymą visų tipų cheminėms medžiagoms, o neigiamas rezultatas (IVIS ≤ 3) turėtų būti laikomas kaip rodiklis, kad nereikia klasifikuoti (JT GHS *be kategorijos*). Kadangi BCOP bandymų metodu galima tiksliai identifikuoti tik 31 % cheminių medžiagų, kurių nereikia klasifikuoti kaip dirginančių akis arba sukeliančių smarkų akių pažeidimą, šis bandymų metodas neturėtų būti pirmoji pasirinktis pradedant taikyti aukštynkryptį metodą (5), jei yra kitų patvirtintų ir priimtų panašaus didelio jautrumo ir dar didesnio specifiškumo *in vitro* metodų.

▼M7

BCOP tinkamumo patvirtinimo duomenų bazę iš viso sudarė 113 medžiagų ir 100 mišinių (2)(3). Todėl BCOP bandymų metodas laikomas tinkamu bandyti medžiagas ir mišinius.

BCOP bandymų metodas nerekomenduojamas, kai reikia identifikuoti bandomąsias chemines medžiagas, kurias reikėtų klasifikuoti kaip akis dirginančias (JT GHS 2 kategorija ar 2A kategorija), arba bandomąsias chemines medžiagas, kurias reikėtų klasifikuoti kaip akis nestipriai dirginančias (JT GHS 2B kategorija), dėl gana didelio skaičiaus JT GHS 1 kategorijos cheminių medžiagų, klaidingai priskiriamų JT GHS 2, 2A ar 2B kategorijai, ir JT GHS be kategorijos cheminių medžiagų, klaidingai priskiriamų JT GHS 2, 2A ar 2B kategorijai (2)(3). Šiuo tikslu gali prireikti papildomų bandymų taikant kitą tinkamą metodą.

Visos procedūros su galvijų akimis ir galvijų ragenomis turėtų būti atliekamos pagal bandymų laboratorijos taisykles ir procedūras, taikytinas gyvūninės kilmės medžiagoms, įskaitant audinius ir audinių skysčius, bet neapsiribojant tik jais. Rekomenduojama laikytis bendrųjų laboratorijose taikytinų atsargumo priemonių (11).

Nors taikant šį BCOP bandymų metodą neatsižvelgiama į akies junginės ir rainelės pažeidimus, tiriamas poveikis ragenai, kuris yra pagrindinis rodiklis, klasifikuojant *in vivo* pagal JT GHS klasifikavimą. Taikant BCOP bandymų metodą, ragenos pažeidimų grįžtamumas negali būti tiesiogiai įvertintas. Atsižvelgiant į triušio akies tyrimus, buvo pasiūlyta ragenos žaizdos pradinį gylį naudoti kaip galimą būdą kai kuriems negrįžtamo poveikio tipams nustatyti (12). Tačiau reikia turėti papildomų mokslinių duomenų, kad būtų galima suprasti, kaip atsiranda negrįžtamas poveikis, kuris nėra susijęs su dideliu pradinio pažeidimo lygiu. Galiausiai, taikant BCOP bandymų metodą, negalima įvertinti su poveikiu akims susijusio sisteminio toksiškumo galimybės.

Šis bandymų metodas bus periodiškai atnaujinamas, kai tik bus išnagrinėta nauja informacija ir duomenys. Pvz., histopatologija gali būti naudinga, kai reikia išsamiau apibūdinti ragenos pažeidimus. Kaip aprašyta EBPO rekomendaciniame dokumente Nr. 160 (13), naudotojai skatinami konservuoti ragenas ir ruošti histopatologinius bandinius, kuriuos galima naudoti kuriant duomenų bazę ir sprendimo priėmimo kriterijus, galinčius pagerinti šio bandymų metodo tikslumą.

Kiekviena laboratorija, kuri pradėtų taikyti šį bandymo metodą, turėtų naudoti 3 priedėlyje nurodytas kvalifikacijai tikrinti skirtas chemines medžiagas. Laboratorija gali naudoti šias chemines medžiagas, norėdama įrodyti savo techninę kompetenciją taikyti BCOP bandymų metodą, prieš pateikdama BCOP bandymo duomenis teisės aktuose numatytais pavojų klasifikavimo tikslais.

BANDYMO PRINCIPAS

BCOP bandymo metodas yra tipinis konkretaus organo tyrimo modelis, pagal kurį galima išsaugoti normalų trumpalaikį fiziologinį ir biocheminį galvijų ragenos funkcionavimą *in vitro*. Pagal šį bandymo metodą bandomosios cheminės medžiagos sukeltas pažeidimas nustatomas kiekybiškai įvertinant ragenos drumstumo ir pralaidumo pokyčius drumstumo matuokliu ir regimosios šviesos spektrofotometru. Abu matavimai naudojami siekiant apskaičiuoti IVIS, kuri naudojama *in vitro* dirginimo pavojaus klasifikavimo kategorijai nustatyti, kad būtų galima prognozuoti bandomosios cheminės medžiagos gebą dirginti akis *in vivo* (žr. 48 pastraipą *Sprendimo priėmimo kriterijai*).

Pagal BCOP bandymo metodą naudojamos atskirtos ragenos, paimtos iš ką tik paskerstų galvijų akių. Ragenos drumstumas kiekybiškai įvertinamas matuojant ragenos praleidžiamos šviesos kiekį. Ragenos pralaidumas kiekybiškai įvertinamas kaip per visą ragenos storį prasiskverbusio fluoresceino natrio druskos

▼M7

dažiklio kiekis, nustatytas užpakalinės kameros terpėje. Bandomosios cheminės medžiagos uždedamos ant ragenos epitelio paviršiaus jų įdedant į ragenos laikiklio priekinę kamerą. 4 priedėlyje pateiktas ragenos laikiklio, naudojamo taikant BCOP bandymo metodą, aprašymas ir schema. Ragenų laikiklių galima įsigyti iš įvairių šaltinių arba pasidaryti.

Galvijų akių šaltinis bei amžius ir gyvūnų rūšies pasirinkimas

Į skerdyklas atvežti galvijai paprastai skerdžiami žmonių maistui arba kitais komerciniais tikslais. BCOP bandymo metodui skirtų ragenų šaltinis gali būti tik sveiki gyvūnai, kurie laikomi tinkamais naudoti žmonių maisto grandinėje. Kadangi galvijų masės intervalas gana didelis ir priklauso nuo veislės, amžiaus bei lyties, nėra nustatyta rekomenduojama skerdžiamo gyvūno masė.

Ragenų matmenys gali skirtis dėl gyvūnų amžiaus skirtumo. Ragenos, kurių horizontalus skersmuo > 30,5 mm ir ragenos storio per vidurį vertės ≥ 1 100 μm, paprastai gaunamos iš senesnių kaip aštuonerių metų galvijų, o ragenos, kurių horizontalus skersmuo < 28,5 mm ir ragenos storis per vidurį < 900 μm, paprastai gaunamos iš jaunesnių kaip penkerių metų galvijų (14). Dėl šios priežasties senesnių kaip 60 mėnesių galvijų akys paprastai nenaudojamos. Jaunesnių kaip 12 mėnesių galvijų akys paprastai nenaudojamos, nes jos vis dar vystosi, o jų ragenos storis ir skersmuo yra gerokai mažesni nei suaugusių galvijų. Tačiau jaunų gyvūnų (t. y. 6–12 mėnesių) ragenas naudoti leidžiama, nes jų naudojimas turi tam tikrų pranašumų, pvz., jų lengviau gauti, amžiaus intervalas yra nedidelis ir yra mažiau pavojų, susijusių su galimu galvijų spongiforminės encefalopatijos poveikiu darbuotojams (15). Kadangi būtų naudinga papildomai įvertinti ragenos matmenų arba storio įtaką atsako į ėsdinančias ir dirginančias chemines medžiagas jautriui, naudotojai prašomi pateikti duomenis apie gyvūnų, iš kurių gautos per tyrimą naudotos ragenos, apytikrį amžių ir (arba) masę.

Akių paėmimas ir transportavimas į laboratoriją

Akis surenka skerdyklų darbuotojai. Siekiant, kad mechaninis ir kitoks akių pažeidimas būtų kuo mažesnis, jas iš paskersto gyvulio reikėtų išimti kiek įmanoma greičiau, nedelsiant atšaldyti ir atšaldytas vežti. Skerdyklų darbuotojai neturėtų naudoti valiklių gyvulio galvai nuplauti, kad į akis nepatektų galinčių dirginti cheminių medžiagų.

Akis reikėtų visiškai panardinti į atvėsintą Hankso subalansuotą druskos tirpalą (angl. *Hanks' Balanced Salt Solution*, HBSS), supiltą į tinkamo dydžio talpyklą, ir į laboratoriją jos turėtų būti vežamos taip, kad būtų kuo mažiau pažeistos ir (arba) užkrėstos bakterijomis. Kadangi akys imamos skerdžiant, jos gali būti išteptos krauju ir kitomis biologinėmis medžiagomis, įskaitant bakterijas ir kitus mikroorganizmus. Todėl svarbu užtikrinti kuo mažesnį užkrėtimo pavojų (pvz., surenkant ir vežant indą su akimis laikyti ant drėgno ledo ir į joms vežti naudojamą HBSS tirpalą įdėti antibiotikų, pvz., 100 IU/ml penicilino ir 100 μg/ml streptomicino).

Laiko tarpas nuo akių surinkimo iki ragenų panaudojimo taikant BCOP bandymų metodą turėtų būti kuo trumpesnis (paprastai jos surenkamos ir naudojamos tą pačią dieną) ir reikėtų įrodyti, kad dėl to neigiamos įtakos tyrimo rezultatams nepadaryta. Šie rezultatai yra pagrįsti akių atrankos kriterijais ir teigiamų bei neigiamų kontrolinių ėminių atsaku. Visos tyrimui naudojamos akys turėtų būti iš tos pačios tam tikrą dieną surinktų akių grupės.

Taikant BCOP bandymo metodą naudojamų akių atrankos kriterijai

Į laboratoriją atvežtos akys atidžiai apžiūrimos, ar jos neturi defektų, įskaitant padidėjusį drumstumą, įbrėžimus ir neovaskuliarizaciją. Turėtų būti naudojamos tik tokių defektų neturinčių akių ragenos.

▼M7

Be to, kiekvienos ragenos kokybė įvertinama vėlesniais tyrimo etapais. Ragenos, kurių drumstumas po pradinio vienos valandos trukmės pusiausvirinimo laikotarpio yra didesnis kaip septyni drumstumo vienetai arba lygiavertis, naudojant kitą drumstumo matuoklį ir ragenos laikiklį, atmetamos (*PASTABA*. Drumstumo matuoklis turėtų būti kalibruotas pagal drumstumo etalonus, naudojamus drumstumo vienetams nustatyti, žr. 4 priedėlį).

Kiekvieną apdorojimo grupę (bandomosios cheminės medžiagos, vienalaikių neigiamų ir teigiamų kontrolinių ėminių) sudaro ne mažiau kaip trys akys. Taikant BCOP bandymų metodą, neigiamam kontroliniam ėminiui reikėtų naudoti tris ragenas. Kadangi visos ragenos yra išpjaunamos iš viso akies obuolio ir įdedamos į ragenų kameras, dėl tvarkymo veiksmų gali būti ragenų drumstumo ir pralaidumo verčių artefaktų (įskaitant neigiamą kontrolinį ėminį). Be to, drumstumo ir pralaidumo vertės, gautos neigiamų kontrolinių ėminių ragenoms, yra naudojamos bandomąja chemine medžiaga apdorotų ir teigiamų kontrolinių ėminių ragenų drumstumo ir pralaidumo vertėms koreguoti, atliekant IVIS skaičiavimus.

PROCEDŪRA

Akių paruošimas

Stengiantis nepažeisti ragenos epitelio ir endotelio, defektų neturinčios ragenos išpjaunamos kartu su 2–3 mm pločio odenos žiedu, kuris paliekamas tam, kad vėliau būtų patogiau tvarkyti rageną. Atskirtos ragenos įdedamos į specialios konstrukcijos ragenų laikiklius, sudarytus iš priekinės ir užpakalinės kamerų, kurios liečiasi su ragenos epitelio ir endotelio pusėmis. Abi kameros iki viršaus pripildomos pašildyta Eagle'o minimalia pagrindine terpe (angl. *Eagle's Minimum Essential Medium, EMEM*) be fenolio raudonojo (pirmiau užpakalinė kamera) taip, kad nesusidarytų burbulų. Tada ne trumpiau kaip vieną valandą įtaisas pusiausvirinamas 32 ± 1 °C temperatūroje, kad susilygintų ragenų bei terpės temperatūra ir būtų gautas kiek įmanoma normalus metabolinis aktyvumas (apytikrė ragenos paviršiaus temperatūra *in vivo* yra 32 °C).

Pasibaigus pusiausvirinimo laikotarpiui, abi kameros pripildomos naujos pašildytos EMEM be fenolio raudonojo, ir registruojami kiekvienos ragenos pradinio drumstumo rodmenys. Visos ragenos, turinčios makroskopinių audinio pažeidimų (pvz., įbrėžimų, pigmentinių dėmių, neovaskuliarizacijos požymių) arba kurių drumstumas yra didesnis kaip septyni drumstumo vienetai arba lygiavertis, naudojant kitą drumstumo matuoklį ir ragenos laikiklį, atmetamos. Ne mažiau kaip trys ragenos pasirenkamos kaip neigiamo (arba tirpiklio) kontrolinio ėminio ragenos. Likusios ragenos padalijamos į paveikimo bandomąja chemine medžiaga grupę ir teigiamo kontrolinio ėminio grupę.

Kadangi vandens šiluminė talpa didesnė už oro, vanduo užtikrina stabilesnes inkubavimo temperatūros sąlygas. Todėl ragenos laikiklį ir jo turinį rekomenduojama laikyti vandens vonioje, kurioje būtų palaikoma 32 ± 1 °C temperatūra. Tačiau gali būti naudojami ir oro inkubatoriai, jei būtų imtasi priemonių temperatūros stabilumui užtikrinti (pvz., iš anksto pašildant laikiklius ir terpę).

Bandomosios cheminės medžiagos įterpimas

Taikomi du skirtingi apdorojimo protokolai: vienas – skysčiams ir paviršinio aktyvumo medžiagoms (kietosioms medžiagoms arba skysčiams), kitas – kietosioms ne paviršinio aktyvumo medžiagoms.

Skysčiai bandomi neskiesti. Pusiau kietosios medžiagos, tepalai ir vaškai paprastai bandomi kaip skysčiai. Grynos paviršinio aktyvumo medžiagos bandomos naudojant 10 % m/V koncentracijos tirpalą 0,9 % natrio chlorido tirpale, distiliuotame vandenyje arba kitame tirpiklyje, kuris, kaip buvo įrodyta, neturi neigiamo poveikio bandymo sistemai. Reikėtų tinkamai pagrįsti kitas praskiestų tirpalų koncentracijos vertes. Paviršinio aktyvumo medžiagų turinčius

▼M7

mišinius galima bandyti neskiestus arba praskiestus iki reikiamos koncentracijos, atsižvelgiant į atitinkamą veikimo scenarijų *in vivo*. Bandyme naudojamą koncentraciją reikėtų tinkamai pagrįsti. Ragenos veikiamos skysčiais ir paviršinio aktyvumo medžiagomis 10 min. Jei taikoma kitokia veikimo trukmė, ją reikėtų tinkamu būdu moksliškai pagrįsti. Žr. 1 priedėlį, kuriame pateiktos paviršinio aktyvumo medžiagų ir paviršinio aktyvumo medžiagų turinčio mišinio apibrėžtys.

Ne paviršinio aktyvumo kietosios medžiagos paprastai bandomos kaip 20 % m/V koncentracijos tirpalai ar suspensijos 0,9 % natrio chlorido tirpale, distiliuotame vandenyje arba kitame tirpiklyje, kuris, kaip įrodyta, neturi neigiamo poveikio bandymo sistemai. Tam tikromis aplinkybėmis ir pateikus reikiamą mokslinį pagrindimą, kietąsias medžiagas taip pat būtų galima bandyti grynas, jas tiesiogiai uždedant ant ragenos paviršiaus taikant atvirosios kameros metodą (žr. 32 skirsnį). Ragenos veikiamos kietosiomis medžiagomis keturias valandas, tačiau skysčiams ir paviršinio aktyvumo medžiagoms gali būti taikoma kitokia veikimo trukmė, pateikus reikiamą mokslinį pagrindimą.

Atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos fizikinę būseną ir chemines savybes (pvz., kietoji medžiaga, skystis, klampus arba neklampus skystis), galima taikyti įvairius apdorojimo būdus. Pagrindinis veiksnys – užtikrinti, kad bandomoji cheminė medžiaga tinkamai padengtų epitelio paviršių ir būtų gerai pašalinta atliekant plovimo veiksmus. Neklampios ir nedidelės klampos bandomosios cheminės medžiagos paprastai bandomos uždarosios kameros metodu, o pusiau klampios ir klampios skystosios bandomosios cheminės medžiagos bei grynos kietosios medžiagos – atvirosios kameros metodu.

Taikant uždarosios kameros metodą, bandomosios cheminės medžiagos kiekis, kurio pakanka ragenos epitelio paviršiui padengti (750 µl), įterpiamas į priekinę kamerą per jos viršutiniame paviršiuje esančią dozavimo angą, veikimo metu užkemšama kamščiu. Svarbu užtikrinti, kad reikiamą laiko tarpą kiekvieną rageną veiktų bandomoji cheminė medžiaga.

Taikant atvirosios kameros metodą, prieš apdorojimą iš priekinės kameros išimamas lango fiksavimo žiedas ir stiklinis langas. Kontrolinė arba bandomoji cheminė medžiaga (750 µl arba toks bandomosios cheminės medžiagos kiekis, kurio pakaktų visai ragenai padengti) tiesiogiai užlašinama ant ragenos epitelio paviršiaus mikropipete. Jei bandomąją cheminę medžiagą sunku įlašinti pipete, dozavimui palengvinti bandomoji cheminė medžiaga gali būti įšvirkšta į stūmoklinę pipetę. Stūmoklinės pipetės antgalis įstatomas į švirkšto dozavimo galą taip, kad medžiagą būti galima įšvirkšti į stūmoklinės pipetės galą. Švirkšto stūmoklis stumiamas, tuo pat metu pipetės stūmoklis traukiamas į viršų. Jei antgalyje atsiranda oro burbuliukų, bandomoji cheminė medžiaga pašalinama (išstumiama), ir procedūra kartojama tol, kol antgalis užpildomas be oro burbuliukų. Prireikus gali būti naudojamas paprastas švirkštas (be adatos), kadangi jį naudojant galima tiksliai išmatuoti bandomosios cheminės medžiagos kiekį ir lengviau padengti ragenos epitelio paviršių. Baigus dozuoti, stiklinis langas įdedamas atgal į priekinę kamerą, taip vėl atkuriant uždarąją sistemą.

Inkubavimas po paveikimo

Pasibaigus veikimo laikotarpiui, bandomoji cheminė medžiaga, neigiama kontrolinė medžiaga arba teigiama kontrolinė cheminė medžiaga pašalinama iš priekinės kameros, epitelis plaunamas ne mažiau kaip tris kartus (arba kol nelieka matomų bandomosios cheminės medžiagos žymių) naudojant EMEM (kurios sudėtyje yra fenolio raudonojo). Plovimui naudojama terpė su fenolio raudonuoju, nes galima stebėti fenolio raudonojo spalvos kitimą, kad būtų galima nustatyti rūgštinių ar šarminių bandomųjų cheminių medžiagų nuplovimo efektyvumą. Jei fenolio

▼M7

raudonasis vis dar keičia spalvą (į geltoną ar į raudonai violetinę) arba jei bandomoji cheminė medžiaga vis dar yra matoma, ragenos plaunamos daugiau kaip tris kartus. Iš terpės pašalinus bandomąją cheminę medžiagą, ragenos paskutinį kartą plaunamos EMEM (be fenolio raudonojo). Paskutinį kartą plaunama EMEM (be fenolio raudonojo) tam, kad prieš drumstumo matavimą fenolio raudonasis būtų visiškai pašalintas iš priekinės kameros. Tada priekinė kamera iš naujo pripildoma nauja EMEM be fenolio raudonojo.

Jei bandomi skysčiai arba paviršinio aktyvumo medžiagos, nuplautos ragenos dar dvi valandas laikomos 32 ± 1 °C temperatūroje. Tam tikromis aplinkybėmis gali būti naudinga ilgesnė laikymo po paveikimo trukmė ir dėl jos būtų galima spręsti kiekvienu konkrečiu atveju. Pasibaigus keturių valandų veikimo laikotarpiui, kietosiomis medžiagomis apdorotos ragenos kruopščiai nuplaunamos, bet papildomai inkubuoti jų nereikia.

Pasibaigus skysčių ir paviršinio aktyvumo medžiagų inkubaciniam laikotarpiui po veikimo ir keturių valandų trukmės ne paviršinio aktyvumo kietųjų medžiagų veikimo laikotarpiui, matuojamas kiekvienos ragenos drumstumas ir pralaidumas. Be to, kiekviena ragena apžiūrima ir registruojamos susijusios pastabos (pvz., audinio lupimasis, bandomosios cheminės medžiagos likučiai, nevienodo drumstumo vaizdai). Šios pastabos galėtų būti svarbios, nes jos gali paaiškinti drumstumo matuoklio rodmenų svyravimus.

Kontrolinės cheminės medžiagos

Atliekant kiekvieną bandymą, naudojami vienalaikiai neigiami kontroliniai ėminiai arba tirpiklis ar nešiklis ir teigiami kontroliniai ėminiai.

Kai pagal BCOP bandymo metodą bandoma 100 % grynumo skystoji cheminė medžiaga, naudojamas vienalaikis neigiamas kontrolinis ėminys (pvz., 0,9 % natrio chlorido tirpalas arba distiliuotas vanduo), kad bandymo sistemoje būtų galima aptikti netipinius pokyčius ir gauti bandymo vertinamųjų baigčių atskaitos vertę. Taip pat užtikrinama, kad tyrimo sąlygos nesukeltų netinkamo dirginamojo atsako.

Kai bandomas atskiestas skystis, paviršinio aktyvumo arba kietoji cheminė medžiaga, taikant BCOP bandymo metodą, įtraukiama vienalaikių tirpiklio ar nešiklio kontrolinių ėminių grupė, kad būtų galima aptikti nebūdingus bandymo sistemos pokyčius ir gauti bandymo vertinamųjų baigčių atskaitos vertę. Galima naudoti tik tokį tirpiklį ar nešiklį, kurie, kaip buvo įrodyta, neturi neigiamos įtakos bandymo sistemai.

Cheminė medžiaga, kuri žinoma kaip sukelianti teigiamą atsaką, yra įtraukiama į kiekvieną bandymą kaip vienalaikis teigiamas kontrolinis ėminys, kad būtų patikrintas bandymo sistemos vientisumas ir jos tinkamas veikimas. Tačiau siekiant užtikrinti galimybę užtikrinti teigiamo kontrolinio ėminio atsako kintamumą per tam tikrą laiką, atsakas į dirginimą neturėtų būti per stiprus.

Skystųjų bandomųjų cheminių medžiagų teigiamų kontrolinių ėminių pavyzdžiai yra 100 % etanolis ar 100 % dimetilformamidas. Kietųjų bandomųjų cheminių medžiagų teigiamo kontrolinio ėminio pavyzdys yra 20 % m/V imidazolo tirpalas 0,9 % natrio chlorido tirpale.

Palyginamosios cheminės medžiagos yra naudingos, kai reikia įvertinti tam tikros cheminių medžiagų ar produktų klasės nežinomų cheminių medžiagų gebą dirginti akis arba akis dirginančios medžiagos santykinę dirginamąją gebą tam tikrame atsako į dirginimą intervale.

Matuojamos vertinamosios baigtys

Drumstumas nustatomas pagal ragenos praleidžiamą šviesos kiekį. Ragenos drumstumas kiekybiškai matuojamas drumstumo matuokliu, kuriuo gaunamos drumstumo vertės tolydžioje skalėje.

Pralaidumas nustatomas pagal fluoresceino natrio druskos dažiklio kiekį, prasiskverbusį per visus ragenos ląstelių sluoksnius (t. y. nuo išorinio ragenos paviršiaus epitelio per vidinio ragenos paviršiaus endotelį). Į priekinę ragenos laikiklio kamerą, kuri liečiasi su ragenos epitelio paviršiumi, įpilamas 1 ml fluoresceino natrio druskos tirpalo (4 arba 5 mg/ml, kai bandomos skystosios, paviršinio aktyvumo medžiagos arba ne paviršinio aktyvumo medžiagos), o į užpakalinę kamerą, kuri liečiasi su ragenos endotelio paviršiumi, pripilama naujos EMEM.

▼M7

Laikiklis laikomas 90 ± 5 min horizontalioje padėtyje 32 ± 1 °C temperatūroje. UV/VIS spektrofotometrijos metodu matuojamas į užpakalinę kamerą patekusios fluoresceino natrio druskos kiekis. Spektrofotometrinio matavimo duomenys registruojami kaip optinio tankio esant 490 nm bangos ilgiui (OD490) arba sugerties vertės, išmatuotos tolydžioje skalėje. Fluoresceino pralaidumo vertės nustatomos naudojant OD490 vertes, išmatuotas regimosios šviesos spektrofotometru, taikant standartinį 1 cm storio sluoksnį.

Taip pat galima naudoti 96 duobučių mikrotitravimo plokštelės skaitytuvą, jei: i) gali būti nustatytas plokštelės skaitytuvo, naudojamo fluoresceino OD490 vertėms nustatyti, tiesinis intervalas ir ii) į 96 duobučių plokštelės duobutes įpilamas reikiamas tūris, kad būtų gautos OD490 vertės, atitinkančios standartinį 1 cm storio sluoksnį (gali prireikti visiškai pripildyti duobutę (įprastas kiekis – 360 μl)).

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenų įvertinimas

Drumstumo ir vidutinio pralaidumo (OD490) vertes pakoregavus pagal foninio drumstumo ir neigiamo kontrolinio ėminio pralaidumo OD490 vertes, kiekvienos paveiktos bandomąja chemine mežiaga grupės vidutinės drumstumo ir pralaidumo OD490 vertes reikėtų įrašyti į empiriniu būdu gautą formulę, skirtą kiekvienos apdorotų ėminių grupės *in vitro* dirginimo skaitinei vertei (IVIS) apskaičiuoti:

IVIS = vidutinė drumstumo vertė + (15 × vidutinė pralaidumo OD490 vertė).

Sina *et al*. (16) paskelbė, kad ši formulė buvo gauta atliekant laboratorinius ir tarplaboratorinius tyrimus. Buvo atlikta duomenų, gautų atlikus 36 junginių serijos tarplaboratorinį tyrimą, daugiafaktorinė analizė, kad būtų gauta geriausiai *in viv*o ir *in vitro* duomenis atitinkanti lygtis. Šią analizę atliko dviejų atskirų bendrovių mokslininkai, kurie gavo beveik vienodas lygtis.

Drumstumo ir pralaidumo vertės taip pat turėtų būti įvertintos atskirai, siekiant nustatyti, ar bandomoji cheminė medžiaga sukėlė ėsdinimą arba stiprų dirginimą tik pagal vieną iš dviejų vertinamųjų baigčių (žr. *Sprendimo priėmimo kriterijai*).

Sprendimo priėmimo kriterijai

IVIS ribinės vertės, pagal kurias bandomosios cheminės medžiagos identifikuojamos kaip sukeliančios smarkų akių pažeidimą (JT GHS 1 kategorija) ir bandomosios cheminės medžiagos, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ar smarkaus akių pažeidimo (JT GHS be kategorijos), pateiktos toliau:

IVIS	JT GHS
≤ 3	Be kategorijos
> 3; ≤ 55	Prognozės pateikti negalima
> 55	1 kategorija

Tyrimo priimtinumo kriterijai

Bandymas laikomas priimtinu, jei teigiamam kontroliniam ėminiui gaunama IVIS, kuri patenka į dabartinio istorinio vidurkio dviejų standartinių nuokrypių intervalą, vidurkį atnaujinant ne rečiau kaip kartą per tris mėnesius arba kiekvieną kartą laboratorijose atliekant priimtiną bandymą, kai bandymai atliekami nedažnai (t. y. rečiau kaip kartą per mėnesį). Vertinant atsaką į neigiamą kontrolinę medžiagą arba tirpiklį ar nešiklį, gautos drumstumo ir pralaidumo vertės neturėtų viršyti foninio drumstumo ir pralaidumo verčių viršutinių ribų, nustatytų

▼M7

galvijų ragenoms, apdorotoms atitinkama neigiama kontroline medžiaga arba tirpikliu ar nešikliu. Jei klasifikavimas nedviprasmis, bandomajai cheminei medžiagai turėtų pakakti vieno bandymo, bandant ne mažiau kaip tris ragenas. Tačiau jei atliekant pirmąjį bandymą gaunami tarpiniai rezultatai, reikėtų spręsti klausimą dėl antrojo bandymo (bet jo nebūtinai reikia), taip pat, esant prieštaringiems pirmų dviejų bandymų IVIS vidutiniams rezultatams, – dėl trečiojo bandymo. Šiuo atveju pirmojo bandymo rezultatas laikomas tarpine verte, jei bandymų su 3 ragenomis gautos prognozės nesutapo taip, kad:

— 2 iš 3 ragenų gautos prieštaringos prognozės pagal visų trijų ragenų vidurkį AR,

— 1 iš 3 ragenų gauta prieštaringa prognozė pagal visų trijų ragenų vidurkį IR prieštaringas rezultatas buvo > 10 IVIS vienetų nuo ribinės vertės 55;

— jei kartotinis bandymas patvirtina pradinio bandymo prognozę (pagrįstą vidutine IVIS verte), galutinį sprendimą galima priimti be papildomo bandymo; Jei, atlikus kartotinį bandymą, gaunama pirmajam bandymui prieštaraujanti prognozė (pagrįsta vidutine IVIS verte), turėtų būti atliekamas trečiasis ir galutinis bandymas nuspręsti dėl dviprasmių prognozių ir klasifikuoti bandomąją cheminę medžiagą. Gali būti leidžiama neatlikti tolesnių klasifikavimo ir ženklinimo bandymų, jei kuris nors bandymų rezultatas duoda JT GHS 1 kategorijos prognozę.

Bandymo ataskaita

Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija, jei ji yra svarbi atliekant tyrimą:

Bandomosios ir kontrolinės cheminės medžiagos

— cheminės medžiagos pavadinimas (-ai), pvz., Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos (angl. *Chemical Abstracts Service*, CAS) naudojamas struktūrinis pavadinimas ir kiti pavadinimai, jei jie žinomi; CAS registro numeris (RN), jei žinomas;

— bandomosios ir (arba) kontrolinės cheminės medžiagos grynumas ir sudėtis (masės procentinėmis dalimis), jei tokia informacija yra;

— tyrimui atlikti reikiamos fizikinės ir cheminės savybės, pvz., fizikinis būvis, lakumas, pH, stabilumas, cheminė klasė, tirpumas vandenyje;

— bandomųjų ir (arba) kontrolinių cheminių medžiagų apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas),

— stabilumas, jei jis žinomas.

Informacija apie rėmėją ir bandymų laboratoriją

— rėmėjo pavadinimas ir adresas, bandymų laboratorija ir tyrimo vadovas.

Bandymų metodo sąlygos

— naudojamas drumstumo matuoklis (pvz., modelis ir specifikacijos) ir prietaiso nuostačiai;

— drumstumo ir pralaidumo matavimo prietaisų (pvz., drumstumo matuoklio ir spektrofotometro) kalibravimo informacija, kad būtų užtikrintas matavimų tiesiškumas;

— naudotų ragenos laikiklių tipas (pvz., modelis ir specifikacijos);

▼M7

— kitos naudojamos įrangos aprašymas;

— procedūra, taikyta bandymų metodo vientisumui (t. y. tikslumui ir patikimumui) užtikrinti laikui bėgant (pvz., kvalifikaciniam bandymui skirtų cheminių medžiagų periodinis tikrinimas).

Bandymo priimtinumo kriterijai

— Priimtini vienalaikių teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių intervalai, pagrįsti istoriniais duomenimis;

— priimtini vienalaikių palyginamųjų cheminių medžiagų kontrolinių ėminių intervalai, pagrįsti istoriniais duomenimis, jei taikoma.

Akių surinkimas ir paruošimas

— akių šaltinio identifikavimo duomenys (t. y. įmonė, iš kurios jos buvo paimtos);

— ragenos skersmuo, kaip šaltinio gyvūno amžiaus ir tinkamumo bandymui matas;

— akių laikymo ir transportavimo sąlygos (pvz., akių paėmimo data ir laikas, laiko tarpas iki bandymo pradžios, kelionėje naudojama terpė ir temperatūra, naudoti antibiotikai);

— galvijų ragenų paruošimas ir įdėjimas, įskaitant pastabas dėl jų kokybės, ragenų laikiklių temperatūra ir bandymams skirtų ragenų atrankos kriterijai.

Bandymo procedūra

— kartotinių ėminių skaičius

— naudotų neigiamų ir teigiamų kontrolinių medžiagų identifikavimo duomenys (taip pat tirpiklio ir palyginamųjų kontrolinių cheminių medžiagų, jei tinka);

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertė (-ės), naudojamas įterpimo būdas, veikimo trukmė ir inkubavimo po paveikimo trukmė;

— įvertinimo ir taikytų sprendimo priėmimo kriterijų aprašymas;

— taikytų tyrimo priimtinumo kriterijų aprašymas;

— visų bandymo procedūros pakeitimų aprašymas;

— taikytų sprendimo priėmimo kriterijų aprašymas.

Rezultatai

— Atskirų ėminių duomenų lentelė (pvz., drumstumo ir OD490 vertės, bandomosios cheminės medžiagos, teigiamų, neigiamų bei lyginamųjų cheminių medžiagų (jei naudojamos) ėminių apskaičiuotos IVIS vertės, pateiktos lentelės pavidalu, įskaitant kartotinių bandymų duomenis, jei tinka, kiekvieno bandymo vidurkiai ± standartinis nuokrypis);

— kitų pastebėtų reiškinių aprašymas.

— gautas *in vitro* JT GHS klasifikavimas, jei tinka.

Rezultatų aptarimas

Išvada

▼M7

LITERATŪRA

(1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report – *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm].

(2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm].

(3) OECD (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No.189, OECD, Paris.

(4) UN (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York and Geneva: United Nations. Available: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html].

(5) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., and Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in Vitro* 24:1-9.

(6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report – *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Available: [http://iccvam.-niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm].

(7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm].

(8) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

(9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

(10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro* 20:78-81.

(11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Available: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

▼M7

(12) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(13) OECD (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, No. 160. Adopted October 25, 2011. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

(15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on – Part I. The Lancet 349: 636-641.

(16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26:20-31.

(17) Šio priedo B.5 skyrius. *Ūmus akių dirginimas ar ėsdinimas*.

(18) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

(19) OECD (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. No. 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised in 1997).

Available at: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

▼M7

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo metodo taikymo charakteristikų matas ir vienas iš „tinkamumo“ aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „atitiktis“ tinkamų bandymo metodo rezultatų daliai išreikšti.

Palyginamoji cheminė medžiaga – cheminė medžiaga, naudojama kaip etalonas lyginant su bandomąja chemine medžiaga. Palyginamoji cheminė medžiaga turėtų turėti šias savybes: i) pastovų (-ius) ir patikimą (-us) šaltinį (-ius); ii) struktūrinį ir funkcinį panašumą su bandomųjų cheminių medžiagų klase; iii) žinomas fizikines ir (arba) chemines charakteristikas; iv) žinomą poveikį patvirtinančius duomenis ir v) žinomą veikimo gebą reikiamo atsako intervale.

Aukštynkryptis metodas – pakopinis metodas, taikomas cheminei medžiagai, apie kurią daroma prielaida, kad jos nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo arba smarkaus akių pažeidimo, kurio pradžioje cheminės medžiagos, kurių nereikia klasifikuoti (duodančios neigiamą rezultatą), atskiriamos nuo nuo kitų cheminių medžiagų (duodančių teigiamą rezultatą).

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Ragena – permatoma priekinė akies obuolio dalis, dengianti rainelę bei vyzdį ir praleidžianti šviesą į vidų.

Ragenos drumstumas – ragenos, paveiktos bandomąja chemine medžiaga, neskaidrumo laipsnio matas. Padidėjęs ragenos drumstumas rodo ragenos pažeidimą. Drumstumą galima įvertinti subjektyviai, kaip tai daroma atliekant Draize triušio akies bandymą, arba objektyviai, naudojant prietaisą, pvz., drumstumo matuoklį.

Ragenos pralaidumas – kiekybinis ragenos epitelio pažeidimo matas, gautas nustatant fluoresceino natrio druskos dažiklio kiekį, kuris prasiskverbia per visus ragenos ląstelių sluoksnius.

Akių dirginimas – akių pokyčių sukėlimas, uždėjus bandomosios cheminės medžiagos ant priekinio akies paviršiaus, kai pokyčiai visiškai išnyksta per 21 parą nuo uždėjimo. Atitinka klasifikaciją *Grįžtamasis poveikis akims* ir *JT GHS 2 kategorija* (4).

Klaidingai neigiamų rezultatų dalis – visų teigiamų cheminių medžiagų, kurios taikant bandymų metodą klaidingai identifikuotos kaip neigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo metodo taikymo charakteristikų rodiklių.

Klaidingai teigiamų rezultatų dalis – visų neigiamų cheminių medžiagų, kurios taikant bandymų metodą klaidingai identifikuotos kaip teigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo metodo taikymo charakteristikų rodiklių.

Pavojus – būdingoji medžiagos savybė arba situacija, galinti sukelti neigiamų padarinių, kai organizmą, sistemą ar populiaciją (arba jos dalį) veikia ta medžiaga.

***In vitro* dirginimo skaitinė vertė (IVIS)** – vertė, apskaičiuojama pagal empiriniu būdu gautą formulę, naudojamą taikant BCOP bandymų metodą, kai kiekvienos apdorotos grupės vidutinės drumstumo ir vidutinio pralaidumo vertės bendrinamos į vieną kiekvienos apdorotos grupės *in vitro* skaitinę vertę. *IVIS* = vidutinė drumstumo vertė + (15 × vidutinė pralaidumo vertė).

Negrįžtamasis poveikis akims – žr. *Smarkus akių pažeidimas*.

▼M7

Mišinys – dviejų arba daugiau medžiagų mišinys arba tirpalas, kuriame jos nereaguoja (4)

Neigiamas kontrolinis ėminys – neapdorotas kartotinis ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus. Šis ėminys tiriamas kartu su bandomąja chemine medžiaga paveiktais ėminiais ir kitais kontroliniais ėminiais, siekiant nustatyti, ar vyksta tirpiklio sąveika su bandymo sistema.

Neklasifikuojamos – cheminės medžiagos, kurios neklasifikuojamos dėl akių dirginimo (JT GHS 2, 2A ar 2B kategorija) ar dėl smarkaus akių pažeidimo (JT GHS 1 kategorija). Atitinka klasifikaciją *JT GHS be kategorijos*.

Drumstumo matuoklis – prietaisas, naudojamas *ragenos drumstumui* matuoti, kiekybiškai įvertinant šviesos praleidimą per rageną. Paprastai šis prietaisas yra sudarytas iš dviejų skyrių, iš kurių kiekvienas turi savo šviesos šaltinį ir fotoelementą. Vienas skyrius skirtas apdorotai ragenai, kitas – prietaisui kalibruoti ir nuliui nustatyti. Halogeninės lempos šviesa perduodama per valdymo skyrių (tuščią kamerą be langų ar skysčio) į fotoelementą ir lyginama su šviesa, į fotoelementą perduota per bandymo skyrių, kuriame yra kamera su ragena. Fotoelementų praleistos šviesos skirtumas palyginamas ir skaitmeniniame ekrane rodoma skaitinė drumstumo vertė.

Teigiamas kontrolinis ėminys – kartotinis ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus ir paveiktas chemine medžiaga, kuri yra žinoma kaip sukelianti teigiamą atsaką. Siekiant užtikrinti galimybę vertinti teigiamo kontrolinio ėminio atsako kintamumą per tam tikrą laiką, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus.

Grįžtamasis poveikis akims – žr. *Akių dirginimas*.

Patikimumas – pagal tą patį protokolą atliekamo bandymo metodo, tam tikrą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų, atkuriamumo laipsnio matas. Jis įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų ir pakartojamumą laboratorijoje.

Smarkus akių pažeidimas – tai akies audinio pažeidimas arba smarkus fizinis regėjimo pablogėjimas, ant išorinio akies paviršiaus uždėjus bandomosios cheminės medžiagos, kuris ne visiškai praeina per 21 dieną nuo uždėjimo. Atitinka klasifikaciją *Negrįžtamasis poveikis akims* ir su *JT GHS 1 kategorija* (4).

Tirpiklio ar nešiklio kontrolinis ėminys – visus bandymo sistemos komponentus, įskaitant tirpiklį ar nešiklį, turintis neapdorotas ėminys, kuris tiriamas kartu su bandomąja chemine medžiaga apdorotais ėminiais ir kitais kontroliniais ėminiais, siekiant nustatyti atskaitos vertę ėminiams, paveiktiems bandomąja chemine medžiaga, ištirpinta tame pačiame tirpiklyje ar nešiklyje. Kai bandomas kartu su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu, šis ėminys taip pat parodo, ar vyksta tirpiklio arba nešiklio sąveika su bandymo sistema.

Medžiaga – gamtoje randami arba gamybos procese gaunami cheminiai elementai ir jų junginiai, įskaitant visus priedus, kurių reikia produkto stabilumui užtikrinti, ir visas priemaišas, patenkančias į produktą taikomo proceso metu, tačiau neįskaitant tirpiklio, kurį galima atskirti, nepaveikiant medžiagos stabilumo ar nekeičiant jos sudėties (4).

▼M7

Paviršinio aktyvumo medžiaga – dar vadinama paviršinio aktyvumo agentu, tai yra medžiaga, pvz., ploviklis, kuri gali sumažinti skysčio paviršiaus įtemptį, kad jis galėtų putoti ar prasiskverbti į kietąsias medžiagas; be to, ji žinoma kaip drėkiklis.

Paviršinio aktyvumo medžiagų turintis mišinys – šio bandymų metodo kontekste tai yra mišinys, turintis vieną arba daugiau paviršinio aktyvumo medžiagų, kurių galutinė koncentracija > 5 %.

Žemynkryptis metodas – pakopinis metodas, taikomas cheminei medžiagai, apie kurią daroma prielaida, kad ji sukelia smarkų akių pažeidimą, pagal kurį cheminės medžiagos, kurios sukelia smarkų akių pažeidimą (duodančios teigiamą rezultatą), atskiriamos nuo kitų cheminių medžiagų (duodančių neigiamą rezultatą).

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Nuosekliųjų bandymų strategija – pakopomis atliekamų bandymų strategija, kai tam tikra eilės tvarka nagrinėjama visa turima informacija apie bandomąją cheminę medžiagą, kiekvienoje pakopoje taikant įrodomosios vertės analizės procesą, siekiant nustatyti, ar yra pakankamai duomenų sprendimui dėl pavojingumo kategorijos priimti, prieš pereinant prie kitos pakopos. Jei bandomosios cheminės medžiagos dirginamąją gebą galima nustatyti atsižvelgiant į turimą informaciją, papildomų bandymų atlikti nereikia. Jei atsižvelgiant į turimą informaciją, bandomajai cheminei medžiagai dirginamosios gebos priskirti neįmanoma, taikoma nuosekliųjų bandymų su gyvūnais procedūra tol, kol galima gauti nedviprasmį klasifikavimą.

Jungtinių Tautų visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema (JT GHS) – sistema, kurioje pateikiamas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimas pagal standartizuotus fizikinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir nagrinėjami atitinkami informaciniai elementai, pvz., piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų galima informuoti apie cheminių medžiagų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbuotojus, darbininkus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likvidatorius) ir aplinką (4).

JT GHS 1 kategorija – žr. *Smarkus akių pažeidimas*.

JT GHS 2 kategorija – žr. *Akių dirginimas*.

JT GHS be kategorijos – cheminės medžiagos, kurios neatitinka JT GHS 1 arba 2 (2A ar 2B) kategorijos klasifikavimo reikalavimų. Atitinka *Neklasifikuojamos*.

Patvirtinto tinkamumo bandymų metodas – bandymų metodas, kurio patvirtinimo tyrimai atlikti, kad būtų nustatytas jo tinkamumas tam tikram tikslui pasiekti (įskaitant tikslumą) ir patikimumas. Svarbu pažymėti, kad patvirtinto tinkamumo bandymo metodo tikslumo ir patikimumo charakteristikos gali būti nepakankamos, kad jį būtų galima laikyti priimtinu siūlomam tikslui pasiekti.

Įrodomoji duomenų galia – įvairių informacijos dalių privalumų ir trūkumų nagrinėjimo procesas priimant ir patvirtinant sprendimą dėl cheminės medžiagos pavojingumo.

▼M7

2 priedėlis

BCOP BANDYMŲ METODO PROGNOZAVIMO GEBA

1 lentelė

BCOP prognozavimo geba nustatant chemines medžiagas, sukeliančias smarkius akių pažeidimus (JT GHS ar ES CLP 1 kategorijos palyginti su ne 1 kategorijos (2 kategorijos ir be kategorijos); JAV AAA I kategorijos palyginti su ne I kategorijos (II kategorijos + III kategorijos + IV kategorijos)

Klasifikavimo sistema	Skaičius	Tikslumas		Jautris		Klaidingai neigiami		Specifiškumas		Klaidingai teigiami	
		%	Skaičius	%	Skaičius	%	Skaičius	%	Skaičius	%	Skaičius
JT GHS ES CLP	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
JAV AAA	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

2 lentelė

BCOP prognozavimo geba nustatant chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo arba smarkaus akių pažeidimo (*nedirginančias*) (JT GHS/ES CLP be kategorijos palyginti su ne be kategorijos (1 kategorijos + 2 kategorijos); JAV AAA IV kategorijos palyginti su ne IV kategorijos (I kategorijos + II kategorijos + III kategorijos))

Klasifikavimo sistema	Skaičius	Tikslumas		Jautris		Klaidingai neigiami		Specifiškumas		Klaidingai teigiami	
		%	Skaičius	%	Skaičius	%	Skaičius	%	Skaičius	%	Skaičius
JT GHS ES CLP	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
JAV AAA	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

▼M7

3 priedėlis

KVALIFIKACIJAI TIKRINTI SKIRTOS CHEMINĖS MEDŽIAGOS TAIKANT BCOP BANDYMŲ METODĄ

Prieš pradėdamos įprastiniu būdu taikyti šį bandymų metodą, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, tinkamai klasifikuodamos 1 lentelėje rekomenduojamų 13 cheminių medžiagų keliamą pavojų akims. Šios cheminės medžiagos buvo parinktos taip, kad atitiktų pavojų akims atsakų intervalą (t. y. 1, 2A, 2B kategorijas arba be kategorijos), atsižvelgiant į *in vivo* triušio akių bandymo (TG 405) (17) rezultatus ir į JT GHS klasifikavimo sistemą (4). Kiti atrankos kriterijai buvo cheminių medžiagų komercinis prieinamumas ir tai, ar galima gauti aukštos kokybės *in vivo* etaloninius duomenis bei aukštos kokybės *in vitro* BCOP bandymų metodo duomenis. Etaloniniai duomenys pateikti supaprastintame suvestiniame dokumente (3) ir BCOP bandymų metodo ICCVAM istorinės apžvalgos dokumente (2)(18).

1 lentelė

Cheminės medžiagos, rekomenduojamos techninei kvalifikacijai tikrinti taikant BCOP bandymų metodą

Cheminė medžiaga	CAS Nr.	Cheminė klasė (1)	Agregatinė būsena	*In Vivo* klasifikavimas (2)	BCOP klasifikavimas
Benzalkonio chloridas (5 %)	8001-54-5	Onio junginys	Skystis	1 kategorija	1 kategorija
Chlorheksidinas	55-56-1	Aminas, amidinas	Kietoji medžiaga	1 kategorija	1 kategorija
Dibenzoil-L-vyno rūgštis	2743-38-6	Karboksirūgštis, esteris	Kietoji medžiaga	1 kategorija	1 kategorija
Imidazolas	288-32-4	Heterociklinis junginys	Kietoji medžiaga	1 kategorija	1 kategorija
Trichloracto rūgštis (30 %)	76-03-9	Karboksirūgštys.	Skystis	1 kategorija	1 kategorija
2,6-dichlorbenzoilchloridas	4659-45-4	Acilhalogenidas	Skystis	2A kategorija	Negalima padaryti tikslios ir (arba) patikimos prognozės
Etil-2-metilacetoacetatas	609-14-3	Ketonas, esteris	Skystis	2 B kategorija	Negalima padaryti tikslios ir (arba) patikimos prognozės
Amonio nitratas	6484-52-2	Neorganinė druska	Kietoji medžiaga	2 kategorija (3)	Negalima padaryti tikslios ir (arba) patikimos prognozės
EDTA dikalio druska	25102-12-9	Aminas, karboksi-rūgštis (druska)	Kietoji medžiaga	Neklasifikuojama	Neklasifikuojama
Tween 20	9005-64-5	Esteris, polieteris	Skystis	Neklasifikuojama	Neklasifikuojama
2-merkaptopirimidinas	1450-85-7	Acilhalogenidas	Kietoji medžiaga	Neklasifikuojama	Neklasifikuojama
Fenilbutazonas	50-33-9	Heterociklinis junginys	Kietoji medžiaga	Neklasifikuojama	Neklasifikuojama

▼M7

Cheminė medžiaga	CAS Nr.	Cheminė klasė (1)	Agregatinė būsena	*In Vivo* klasifikavimas (2)	BCOP klasifikavimas
Polioksietileno (23) laurileteris (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Alkoholis	Skystis	Neklasifikuojama	Neklasifikuojama

Santrumpos: CAS NR. – Cheminių medžiagų pavadinimų santrumpų tarnybos registracijos numeris.

(1) Kiekviena bandomoji cheminė medžiaga priskirta cheminių junginių klasei, taikant standartinę klasifikavimo sistemą, pagrįstą Vaistų medicininių dalykinių antraščių (MeSH) nacionalinės bibliotekos klasifikavimo sistema (available at http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Atsižvelgiant į rezultatus, gautus atlikus triušio akies *in vivo* bandymą (EBPO TG 405) (17) ir taikant JT GHS (4).

(3) Klasifikavimas kaip 2A ar 2B priklauso nuo JT GHS kriterijaus šioms dviems kategorijoms atskirti aiškinimo, t. y. poveikis 7 parą 1 iš 3 gyvūnų palyginti su 2 iš 3 gyvūnų, kuris yra būtinas norint klasifikuoti kaip 2A kategorijos. *In vivo* tyrime buvo naudojami 3 gyvūnai. Visos vertinamosios baigtys, išskyrus vieno gyvūno junginės paraudimą, grįžo prie nulinių verčių 7 parą arba anksčiau. Vieno gyvūno, kurio junginės paraudimas ne visiškai išnyko iki 7 paros, paraudimo balas buvo 1 (7 parą), šis paraudimas visiškai išnyko 10 parą.

▼M7

4 priedėlis

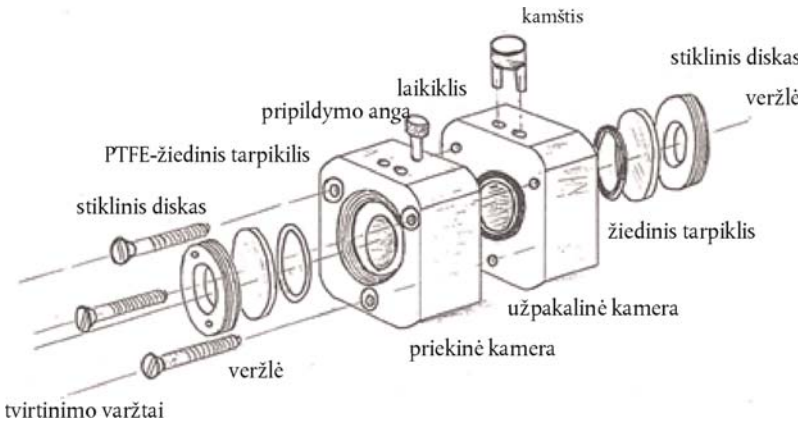
BCOP BANDYMUI NAUDOJAMAS RAGENOS LAIKIKLIS

BCOP ragenų laikikliai gaminami iš inertinės medžiagos (pvz., polipropileno). Laikikliai yra sudaryti iš dviejų dalių (priekinės ir užpakalinės kamerų) ir turi dvi panašias cilindro pavidalo vidines kameras. Kiekvienos kameros projektinė talpa yra maždaug 5 ml, jų galuose yra stikliniai langai, per kuriuos registruojamos drumstumo matavimų vertės. Kiekviena vidinė kamera yra 1,7 cm skersmens ir 2,2 cm gylio ([1]). Į užpakalinę kamerą yra įdėtas žiedinis tarpiklis, kad būtų išvengta nuotėkio. Ragenos endotelio puse dedamos ant užpakalinių kamerų žiedinio tarpiklio, o priekinės kameros dedamos ant ragenų epitelio. Kameros tvirtinamos trimis nerūdijančiojo plieno varžtais, esančiais išoriniuose kameros kraštuose. Kiekvienos kameros gale yra stiklinis langas, kurį galima išimti, kad būtų patogiau pasiekti rageną. Žiedinis tarpiklis taip pat yra įdėtas tarp stiklinio lango ir kameros, kad būtų išvengta nuotėkio. Kiekvienos kameros viršuje yra dvi angos, per kurias įpilama bei pašalinama terpė ir bandomosios cheminės medžiagos. Apdorojimo ir inkubavimo laikotarpiais jos uždaromos guminiais kamšteliais. Šviesos praleidimas per ragenos laikiklius gali kisti, nes susidėvėjimo reiškiniai arba tam tikrų cheminių medžiagų likučių kaupimasis ant vidinių kamerų angų arba ant stiklinių langų gali turėti įtakos šviesos sklaidai arba atspindžio gebai. Dėl to galėtų padidėti ar sumažėti šviesos praleidimo per ragenos laikiklius atskaitos vertės (drumstumo rodmenų atskaitos vertės pasikeistų priešingai), ir galėtų atrodyti kaip žymūs atskirų kamerų pradinio drumstumo matavimų tikėtinos atskaitos vertės pokyčiai (t. y. tam tikrų atskirų ragenų laikiklių pradinės ragenų drumstumo vertės gali įprastai skirtis daugiau kaip 2 ar 3 drumstumo vienetais, palyginti su numatomomis atskaitos vertėmis). Kiekviena laboratorija turėtų atsižvelgti į galimybę sukurti programą, kurią taikant būtų įvertinti šviesos praleidimo per ragenų laikiklius pokyčiai, atsižvelgiant į bandomųjų cheminių medžiagų tipą ir kamerų naudojimo dažnumą. Siekiant gauti atskaitos vertes, ragenų laikiklius galima patikrinti prieš įprastinį naudojimą, išmatuojant drumstumo (ar šviesos praleidimo) atskaitos vertes, į kameras be ragenų įpylus visos sudėties terpės. Tada būtų galima periodiškai tikrinti ragenų laikiklių šviesos praleidimo pokyčius naudojimo laikotarpiu. Kiekviena laboratorija, atsižvelgdama į tai, kokios cheminės medžiagos bandomos, į naudojimo dažnumą ir pastebėtus ragenų drumstumo atskaitos verčių pokyčius, galėtų nustatyti ragenų laikiklių tikrinimo dažnumą. Jei būtų pastebėti žymūs šviesos praleidimo per ragenų laikiklius pokyčiai, reikėtų spręsti ragenų laikiklių vidinių paviršių tinkamų valymo ir (arba) poliravimo procedūrų ar laikiklių pakeitimo klausimą.

([1]) Pateikti matmenys atitinka ragenos laikiklį, naudojamą tiriant 12–60 mėnesių karvių ragenas. Jei naudojami 6–12 mėnesių gyvuliai, reikėtų pagaminti laikiklį, kurio kiekvienos kameros talpa būtų 4 ml, o kiekvienos vidinės kameros skersmuo – 1,5 cm, gylis – 2,2 cm. Projektuojant visus naujus ragenų laikiklius, labai svarbu užtikrinti, kad veikiamo ragenos paviršiaus ploto ir užpakalinės kameros talpos santykis būtų lygus įprastinio ragenų laikiklio santykiui. Tai yra būtina, siekiant užtikrinti, kad būtų tinkamai nustatytos pralaidumo vertės, naudojamos IVIS skaičiuoti pagal pasiūlytą formulę.

▼M7

Ragenos laikiklio surinkimo schema.



▼M7

5 priedėlis

DRUMSTUMO MATUOKLIS

Drumstumo matuoklis yra šviesos praleidimo matavimo prietaisas. Pvz., jei BCOP bandymo metodo tinkamumui patvirtinti naudojama OP-KIT įranga iš *Electro Design* (Riomas, Prancūzija), halogeninės lempos šviesa perduodama per valdymo skyrių (tuščią kamerą be langų ar skysčio) į fotoelementą ir lyginama su šviesa, į fotoelementą perduodama per bandymo skyrių, kuriame yra kamera su ragena. Fotoelementų praleistos šviesos skirtumas palyginamas ir skaitmeniniame ekrane rodoma skaitinė drumstumo vertė. Drumstumo vienetai yra nustatyti. Galima naudoti kitokios konstrukcijos drumstumo matuoklius (pvz., kuriems nereikia atlikti lygiagrečių valdymo ir bandymo skyrių matavimų), jei būtų įrodyta, kad jais gaunami rezultatai yra panašūs į gautus patvirtinta įranga.

Drumstumo matuokliu gautas atsakas turėtų būti tiesinis tam tikrame drumstumo rodmenų intervale, kuris aprėptų ribas, atitinkančias įvairius klasifikavimo būdus, aprašytus pagal prognozavimo modelį (t. y. iki ribos, susijusios su ėsdinimu ir (arba) stipriu dirginimu). Siekiant užtikrinti tiesinius ir tikslius rodmenis iki 75–80 drumstumo vienetų, drumstumo matuoklį būtina kalibruoti naudojant įvairius kalibravimo etalonus. Kalibravimo etalonai dedami į kalibravimo kamerą (ragenos kamerą, skirtą kalibravimo etalonams laikyti) ir registruojami drumstumo matuoklio rodmenys. Kalibravimo kamera suprojektuota kalibravimo etalonams laikyti tarp šviesos šaltinio ir fotoelemento maždaug tokiu atstumu, kokiu įdedamos ragenos matuojant jų drumstumą. Etaloninės vertės ir pradinis nuostatis priklauso nuo naudojamos įrangos tipo. Drumstumo matavimų tiesiškumą turėtų užtikrinti reikiamos (prietaisui nustatytos) procedūros. Pvz., jei naudojama OP-KIT įranga iš *Electro Design* (Riomas, Prancūzija), drumstumo matuoklis iš pradžių kalibruojamas drumstumo vienetų nulinei vertei gauti, naudojant kalibravimo kamerą be kalibravimo etalono. Tada vienas po kito į kalibravimo kamerą dedami trys kalibravimo etalonai ir matuojamas drumstumas. Naudojant 1, 2 ir 3 kalibravimo etalonus, reikėtų gauti jų nuostačių vertes atitinkančius drumstumo rodmenis – 75, 150 ir 225 drumstumo vienetų ± 5 %.

▼M7

B.48. ATSKIRTŲ VIŠČIUKŲ AKIŲ BANDYMO METODAS, SKIRTAS IDENTIFIKUOTI I) CHEMINES MEDŽIAGAS, SUKELIANČIAS SMARKIUS AKIŲ PAŽEIDIMUS, IR II) CHEMINES MEDŽIAGAS, KURIŲ NEREIKIA KLASIFIKUOTI DĖL AKIŲ DIRGINIMO AR SMARKAUS AKIŲ PAŽEIDIMO

ĮVADAS

Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) 438 (2013). Atskirtų viščiukų akių (ICE) bandymo metodą 2006 ir 2010 m. įvertino Alternatyvių metodų patvirtinimo tarpžinybinio koordinavimo komitetas (angl. *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, ICCVAM) kartu su Europos alternatyvių metodų patvirtinimo centru (angl. *European Centre for the Validation of Alternative Methods*, ECVAM) ir Japonijos alternatyvių metodų patvirtinimo centru (angl. *Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods*, JaCVAM) (1) (2) (3). Atliekant pirmąjį įvertinimą, ICE buvo patvirtintas kaip moksliškai pagrįstas bandymų metodas, tinkamas kaip atrankos bandymas nustatant chemines medžiagas (medžiagas ir mišinius), kurios sukelia smarkius akių pažeidimus (1 kategorijos), kaip apibrėžta Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemoje (GHS) (4) ir Reglamente (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo (CLP) ([1]). Atliekant antrąjį įvertinimą, buvo tiriama, ar ICE bandymų metodas tinka kaip atrankos bandymas nustatant chemines medžiagas, kurios pagal JT GHS neklasifikuojamos dėl akių dirginimo ar smarkių akių pažeidimų (3) (4). Remiantis tinkamumo patvirtinimo tyrimo rezultatais ir ekspertų grupės rekomendacijomis, palikta galioti pirminė rekomendacija, kad ICE galima naudoti klasifikuojant chemines medžiagas, kurios sukelia smarkius akių pažeidimus (JT GHS 1 kategorijos), nes turima duomenų bazė nepasikeitė nuo pradinio ICCVAM tinkamumo patvirtinimo. Tame etape nebuvo pasiūlyta jokių papildomų rekomendacijų dėl ICE taikymo srities išplėtimo, kad būtų įtrauktos kitos kategorijos. Buvo iš naujo įvertintas *in vitro* ir *in vivo* duomenų rinkinys, naudotas atliekant tinkamumo patvirtinimo tyrimą, siekiant visų pirma įvertinti ICE naudingumą nustatant chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ar smarkaus akių pažeidimo (5). Atlikus pakartotinį įvertinimą, buvo prieita prie išvados, kad ICE bandymų metodas taip pat gali būti taikomas, kai reikia nustatyti chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ar smarkaus akių pažeidimo pagal JT GHS (4) (5). Atsižvelgiant į šiuos įvertinimus, į šį bandymų metodą įtrauktos rekomenduojamos ICE bandymų metodo taikymo sritys ir apribojimai. Pagrindiniai skirtumai tarp EBPO bandymų gairių originalios 2009 m. versijos ir atnaujintos 2013 m. versijos yra, be kita ko, susiję su šiais dalykais: ICE metodo taikymas nustatant chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti pagal JT GHS klasifikavimo sistemą, atnaujinti bandymo ataskaitos elementai, atnaujintos 1 priedėlio apibrėžtys ir atnaujintas 2 priedėlio kvalifikacijai tikrinti naudojamų cheminių medžiagų sąrašas.

Šiuo metu visuotinai pripažįstama, kad artimiausioje ateityje joks atskiras *in vitro* akių dirginimo bandymas negalės pakeisti *Draize* akių bandymo *in vivo*, kad būtų galima prognozuoti skirtingų cheminių klasių visą dirginimo intervalą. Tačiau kelių alternatyvių bandymų metodų strateginiai deriniai taikant (nuosekliųjų) bandymų strategiją galėtų pakeisti *Draize* akių bandymą (6). Žemynkryptis metodas (7) skirtas taikyti tada, kai, atsižvelgiant į esamą informaciją, daroma prielaida apie didelę cheminės medžiagos dirginamojo poveikio gebą, o aukštynkryptis metodas (7) skirtas taikyti tada, kai, atsižvelgiant į esamą informaciją, daroma prielaida, kad cheminė medžiaga nepakankamai dirgina akis, kad ją reikėtų klasifikuoti. ICE bandymų metodas – bandymų metodas *in vitro*, kuris tam tikromis aplinkybėmis ir su tam tikrais apribojimais, kaip aprašyta 8–10 pastraipose, gali būti taikomas akims keliamam pavojui klasifikuoti ir cheminėms medžiagoms ženklinti. Nors kaip atskiras metodas ICE metodas nelaikomas tinkamu pakeisti triušių akių bandymą *in vivo*, jis rekomenduojamas kaip pirmas

([1]) 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353, 2008 12 31.

▼M7

bandymų strategijos etapas, pvz., žemynkryptis metodas, pasiūlytas Scott *et al.* (7), be papildomų bandymų nustatant chemines medžiagas, sukeliančias smarkius akių pažeidimus, t. y. chemines medžiagas, kurias reikia klasifikuoti kaip JT GHS 1 kategorijos medžiagas (4). ICE bandymų metodas taip pat rekomenduojamas, kai reikia identifikuoti chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ar smarkaus akių pažeidimo, kaip apibrėžta JT GHS (JT GHS be kategorijos) (4), ir todėl gali būti taikomas kaip pradinis aukštynkrypčio metodo bandymo strategijos etapas (7). Tačiau cheminė medžiaga, kuri pagal ICE bandymų metodą nelaikoma galinčia sukelti smarkų akių pažeidimą arba neklasifikuojama dėl akių dirginimo ar smarkaus akių pažeidimo, turėtų būti bandoma papildomai (*in vitro* ir (arba) *in vivo*) galutinei kategorijai nustatyti. Be to, prieš pradedant taikyti ICE kaip aukštinkryptį metodą pagal kitas nei JT GHS klasifikavimo schemas, reikėtų pasitarti su atitinkamomis priežiūros institucijomis.

Šio bandymo metodo tikslas – aprašyti procedūras, taikomas įvertinant bandomosios cheminės medžiagos keliamo pavojaus akims galimybę, matuojant jos gebą sukelti toksiškumą iš kūno paimtai viščiuko akiai. Toksinis poveikis ragenai matuojamas šiais būdais: i) kokybiškai vertinamas drumstumas, ii) kokybiškai vertinami epitelio pažeidimai ant akies uždėjus fluoresceino (fluoresceino sulaikymas), iii) kiekybiškai matuojamas storio padidėjimas (pabrinkimas) ir iv) kokybiškai įvertinami makroskopiniai morfologiniai paviršiaus pažeidimai. Ragenos drumstumas, pabrinkimas ir pažeidimai, paveikus bandomąja chemine medžiaga, vertinami atskirai ir kartu, kad būtų nustatyta akies dirginimo kategorija.

Apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

Šis bandymo metodas pagrįstas EBPO rekomendaciniame dokumente 160 pasiūlytu protokolu (8), kuris buvo parengtas ICCVAM atlikus tarptautinį tinkamumo patvirtinimo tyrimą (1) (3) (9), padedant Europos alternatyvių metodų patvirtinimo centrui, Japonijos alternatyvių metodų patvirtinimo centrui ir TNO Gyvenimo kokybės – Toksikologijos ir taikomosios farmakologijos departamentui (Nyderlandai). Protokolas pagrįstas informacija, gauta iš paskelbtų protokolų ir iš TNO dabar taikomo protokolo (10) (11) (12) (13) (14).

Atliekant šio bandymų metodo tinkamumo patvirtinimą, buvo išbandyta didelė cheminių medžiagų grupė, o tinkamumo patvirtinimo tyrimo empirinę duomenų bazę sudarė 152 cheminės medžiagos, įskaitant 72 medžiagas ir 80 mišinių (5). Bandymų metodas tinka kietosioms medžiagoms, skysčiams, emulsijoms ir geliams. Skysčiai gali būti vandeniniai arba nevandeniniai; kietosios medžiagos gali būti tirpios arba netirpios vandenyje. Atliekant tinkamumo patvirtinimo tyrimą, dujos ir aerozoliai nebuvo vertinami (24).

ICE bandymų metodas gali būti taikomas nustatant chemines medžiagas, kurios sukelia smarkius akių pažeidimus, t. y. chemines medžiagas, kurias reikia klasifikuoti kaip JT GHS 1 kategorijos medžiagas (4). Kai ICE metodas taikomas šiuo tikslu, nustatyti jo apribojimai – didelė alkoholiams gautų teigiamų rezultatų dalis ir didelė kietosioms medžiagoms bei paviršinio aktyvumo medžiagoms gautų klaidingai neigiamų rezultatų dalis (1) (3) (9). Tačiau klaidingai neigiamų rezultatų dalis šiame kontekste (JT GHS 1 kategorijos identifikuota kaip ne JT GHS 1 kategorijos) esmės nekeičia, nes, priklausomai nuo reglamentavimo reikalavimų, visos bandomosios cheminės medžiagos, kurioms gaunamas neigiamas rezultatas, vėliau bandomos atliekant tinkamai patvirtintą (-us) bandymą (-us) *in vitro* arba, blogiausiu atveju, bandymą su triušiais pagal nuosekliųjų bandymų

▼M7

strategiją, taikant įrodomosios duomenų galios metodą. Reikėtų pažymėti, kad atliekant kietųjų medžiagų *Draize* akių dirginimo bandymą *in vivo* gali būti kintamos ir ribinės veikimo sąlygos, dėl kurių gali būti gautos netinkamos jų tikrosios dirginamosios gebos prognozės (15). Tyrėjai galėtų spręsti, ar taikyti šį bandymų metodą visų tipų cheminėms medžiagoms, kai teigiamas rezultatas turėtų būti priimtas kaip smarkų akių pažeidimą sukeliančio atsako rodiklis ir cheminę medžiagą reikėtų klasifikuoti kaip JT GHS 1 kategorijos be papildomų bandymų. Tačiau teigiamus rezultatus, gautus bandant alkoholius, reikėtų aiškinti atsargiai, vengiant nepagrįstų prognozių.

Kai ICE bandymų metodas taikomas siekiant nustatyti chemines medžiagas, sukeliančias smarkius akių pažeidimus (JT GHS 1 kategorijos), jo visuminis tikslumas – 86 % (120/140), klaidingai teigiamų rezultatų dalis – 6 % (7/113), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – 48 % (13/27), palyginti su triušio akių bandymų metodo *in vivo* duomenimis, klasifikuojamais pagal JT GHS klasifikavimo sistemą (4) (5).

ICE bandymų metodą taip pat galima taikyti nustatant chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo arba smarkaus akių pažeidimo pagal JT GHS klasifikavimo sistemą (4). Prieš pradedant taikyti ICE kaip aukštinkryptį metodą pagal kitas klasifikavimo schemas, reikėtų pasitarti su atitinkamomis reguliavimo institucijomis. Šį bandymų metodą galima taikyti visų tipų cheminėms medžiagoms, kurioms gautą neigiamą rezultatą būtų galima priimti kaip įrodymą, kad cheminės medžiagos nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ir smarkaus akių pažeidimo. Tačiau, atsižvelgiant į vieną rezultatą iš tinkamumo įvertinimo duomenų bazės, organinių tirpiklių turintiems nuo apnašų apsaugantiems dažams galėtų būti gautas klaidingai neigiamas rezultatas (5).

Kai ICE bandymų metodas taikomas nustatant chemines medžiagas, kurių nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo ir smarkaus akių pažeidimo, jo visuminis tikslumas – 82 % (125/152), klaidingai teigiamų rezultatų dalis – 33 % (26/79), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – 1 % (1/73), palyginti su triušio akių bandymų metodo *in vivo* duomenimis, klasifikuojamais pagal JT GHS (4) (5). Kai tam tikrų klasių bandomosios cheminės medžiagos (t. y. organinių tirpiklių turintys nuo apnašų apsaugantys dažai) pašalinamos iš duomenų bazės, ICE bandymų metodo tikslumas taikant JT GHS klasifikavimo sistemą yra 83 % (123/149), klaidingai teigiamų rezultatų dalis – 33 % (26/78), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – 0 % (0/71) (4) (5).

ICE bandymų metodas nerekomenduojamas, kai reikia nustatyti bandomąsias chemines medžiagas, kurias reikėtų klasifikuoti kaip akis dirginančias (t. y. JT GHS 2 kategorijos ar 2A kategorijos), arba bandomąsias chemines medžiagas, kurias reikėtų klasifikuoti kaip akis nestipriai dirginančias (JT GHS 2B kategorijos), dėl gana didelio skaičiaus JT GHS 1 kategorijos cheminių medžiagų, klaidingai priskiriamų JT GHS 2, 2A ar 2B kategorijai, ir JT GHS be kategorijos cheminių medžiagų, klaidingai priskiriamų JT GHS 2, 2A ar 2B kategorijai. Šiuo tikslu gali prireikti papildomų bandymų taikant kitą tinkamą metodą.

Visos procedūros su viščiukų akimis turėtų būti atliekamos pagal bandymų laboratorijos taikytinas žmogaus arba gyvūninės kilmės medžiagų, įskaitant audinius ir audinių skysčius, bet neapsiribojant tik jais, tvarkymo taisykles ir procedūras. Rekomenduojama laikytis bendrųjų laboratorijose taikytinų atsargumo priemonių (16).

Nors ICE bandymų metode neatsižvelgiama į akies junginės ir rainelės pažeidimus, kurie yra įvertinami taikant triušio akių dirginimo bandymų metodą, tiriamas poveikis ragenai, kuris yra pagrindinis rodiklis, klasifikuojant *in vivo* pagal JT GHS klasifikavimą. Be to, nors pagal ICE bandymų metodą ragenos pažeidimų grįžtamumas negali būti įvertintas tiesiogiai, atsižvelgiant į triušio akių

▼M7

tyrimus, buvo pasiūlyta naudoti ragenos žaizdos pradinį gylį, kaip galimą būdą kai kuriems negrįžtamo poveikio tipams nustatyti (17). Visų pirma reikia turėti papildomų mokslinių duomenų, kad būtų galima suprasti, kaip atsiranda negrįžtamas poveikis, nesusijęs su dideliu pradinio pažeidimo lygiu. Galiausiai taikant ICE bandymų metodą negalima įvertinti su poveikiu akims susijusio sisteminio toksiškumo galimybės.

Šis bandymų metodas bus periodiškai atnaujinamas, kai tik bus išnagrinėta nauja informacija ir duomenys. Pvz., gali būti naudinga histopatologija, kai reikia išsamiau apibūdinti ragenos pažeidimus. Siekiant įvertinti šią galimybę, naudotojai skatinami konservuoti ragenas ir ruošti histopatologinius bandinius, kuriuos galima naudoti kuriant duomenų bazę ir sprendimo priėmimo kriterijus, galinčius pagerinti šio bandymų metodo tikslumą. EBPO parengė toksiškumo akims bandymų *in vitro* metodų rekomendacinį dokumentą, kurį sudaro išsamiai aprašytos histopatologinių bandinių ėmimo procedūros ir informacija apie tai, kur pateikti bandinius ir (arba) histopatologinius duomenis (8).

Kiekviena laboratorija, kuri pradėtų taikyti šį bandymo metodą, turėtų naudoti kvalifikacijai tikrinti skirtas chemines medžiagas, nurodytas 2 priedėlyje. Laboratorija gali naudoti šias chemines medžiagas, norėdama įrodyti savo techninę kompetenciją taikyti ICE bandymo metodą, prieš pateikdama ICE bandymų duomenis teisės aktuose numatytais pavojų klasifikavimo tikslais.

BANDYMO PRINCIPAS

ICE bandymo metodas yra organotipinių audinių tyrimo modelis, pagal kurį galima išsaugoti trumpalaikį viščiuko akies funkcionavimą *in vitro*. Pagal šį bandymų metodą bandomosios cheminės medžiagos padarytas pažeidimas nustatomas įvertinant ragenos pabrinkimą, drumstumą ir fluoresceino sulaikymą. Pastarieji du parametrai vertinami kokybiškai, o ragenos pabrinkimo analizė yra kiekybinis įvertinimas. Kiekvienas matavimas perskaičiuojamas į kiekybinį balą, naudojamą visuminiam dirginimo indeksui apskaičiuoti, arba priskiriama kokybinė kategorija, kuri naudojama pavojui akims *in vitro* klasifikuoti kaip JT GHS 1 kategorijos arba kaip JT GHS be kategorijos. Bet kuris iš šių rezultatų po to gali būti naudojamas bandomosios cheminės medžiagos sukeliamam smarkiam akių pažeidimui *in vivo* prognozuoti arba nustatyti, kad bendomosios cheminės medžiagos pavojaus akims klasifikuoti nereikia (žr. *Sprendimo priėmimo kriterijai*). Tačiau ICE bandymų metodu neįmanoma suklasifikuoti cheminių medžiagų, kurios nenustatytos kaip sukeliančios smarkius akių pažeidimus arba kurios neklasifikuojamos (žr.11 pastraipą).

Viščiukų akių šaltinis ir amžius

Paprastai šiam tyrimui naudojamos žmonėms skirtų vartoti viščiukų akys, paimtos skerdykloje, kurioje viščiukai skerdžiami, kad nereikėtų naudoti laboratorinių gyvūnų. Naudojamos tik sveikų gyvūnų, kurie laikomi tinkamais patekti į žmonių maisto grandinę, akys.

Nors kontrolinis tyrimas tinkamiausiam viščiukų amžiui įvertinti nebuvo atliktas, anksčiau taikant šį bandymų metodą buvo naudojami viščiukai, kurių amžius ir masė atitinka paukščių skerdykloje pavasarį skerdžiamų mėsinių viščiukų amžių ir masę (t. y. maždaug 7 savaičių amžiaus, 1,5–2,5 kg masės).

Akių paėmimas ir transportavimas į laboratoriją

Galvos turėtų būti nupjautos iš karto po to, kai viščiukai numarinami, paprastai elektros šoku, ir įpjaunamas kaklas, kad nubėgtų kraujas. Reikėtų rasti netoli laboratorijos esantį vietinį viščiukų šaltinį, kad galvas būtų galima nuvežti iš skerdyklos į laboratoriją pakankamai greitai ir būtų kuo mažesnė jų pažeidimo ir (arba) užteršimo bakterijomis tikimybė. Laikotarpis nuo viščiukų galvų surinkimo iki išpjautų akių pernešimo į perfuzijos aparato kamerą turėtų būti kuo mažesnis (paprastai trumpesnis kaip dvi valandos), kad būtų užtikrinta atitiktis tyrimo priimtinumo kriterijams. Visos bandymui atlikti naudojamos akys turėtų būti iš tos pačios tam tikrą dieną surinktos akių grupės.

▼M7

Kadangi akys išpjaunamos laboratorijoje, iš skerdyklos vežamos galvos su akimis laikomos plastikinėse dėžėse aplinkos temperatūroje (paprastai nuo 18 °C iki 25 °C) ir drėkinamos servetėlėmis, įmirkytomis izotoniniu druskos tirpalu.

ICE bandymui skirtų akių atrankos kriterijai ir skaičius

Išimtos akys atmetamos, jei jų dažymo fluoresceinu atskaitos vertės (t. y. > 0,5) arba ragenos drumstumo atskaitos vertės (t. y. > 0,5) yra didelės.

Kiekvieną apdorotų ėminių ir vienalaikių kontrolinių ėminių grupę sudaro ne mažiau kaip trys akys. Neigiamo kontrolinio ėminio arba tirpiklio ar nešiklio kontrolinio ėminio (jei naudojamas kitas nei druskos tirpalas tirpiklis) grupę sudaro bent viena akis.

Jei kietosioms medžiagoms gaunamas GHS be kategorijos rezultatas, rekomenduojama atlikti antrąjį bandymą su trimis akimis, kad būtų patvirtintas arba paneigtas neigiamas rezultatas.

PROCEDŪRA

Akių paruošimas

Atsargiai, nepažeidžiant ragenos, išpjaunami akių vokai. Ragenos vientisumas greitai įvertinamas ant ragenos paviršiaus kelioms sekundėms užlašinus 2 % (m/V) fluoresceino natrio druskos tirpalo lašą ir jį nuplovus izotoniniu druskos tirpalu. Fluoresceinu apdorotos akys apžiūrimos per mikroskopą su plyšine lempa, siekiant įsitikinti, ar ragena yra nepažeista (t. y. ar fluoresceino sulaikymo ir ragenos drumstumo vertės yra ≤ 0,5).

Jei ragena nepažeista, akis išpjaunama iš kaukolės, nepažeidžiant ragenos. Akies obuolys ištraukiamas iš akiduobės tvirtai suimant mirksimąją membraną chirurginėmis žnyplėmis, tada lenktomis, bukais galais žirklėmis nupjaunami akies raumenys. Svarbu nepažeisti ragenos (t. y. nepalikti spaudimo žymių) per daug ją spaudžiant.

Akį išėmus iš akiduobės, matoma regos nervo dalis turėtų būti palikta. Iš akiduobės išimta akis padedama ant sugeriamojo padėklo, tada nupjaunama mirksimoji membrana ir kiti jungiamieji audiniai.

Išimta akis tvirtinama nerūdijančiojo plieno laikiklyje taip, kad ragenos padėtis būtų vertikali. Laikiklis perkeliamas į perfuzijos aparato kamerą (18). Laikiklius perfuzijos aparate reikėtų įtaisyti taip, kad izotoninis druskos tirpalas lašėtų ant visos ragenos (3–4 lašai per minutę ar 0,1–0,15 ml/min). Kontroliuojama perfuzijos aparato kamerų temperatūra turėtų būti 32 ± 1,5 °C. 3 priedėlyje pateikta perfuzijos aparato ir akių laikiklių, kuriuos galima nusipirkti arba pasigaminti, schema. Aparato konstrukciją galima keisti, atsižvelgiant į kiekvienos laboratorijos poreikius (pvz., norint įdėti kitokį akių skaičių).

Įdėjus akis į perfuzijos aparatą, jos dar kartą apžiūrimos per mikroskopą su plyšine lempa, siekiant įsitikinti, ar jos nebuvo pažeistos per išpjovimo procedūrą. Kartu taip pat turėtų būti išmatuotas ragenos storis jos viršūnėje, naudojant gylio matavimo prietaisą, įrengtą mikroskope su plyšine lempa. Akis, kurių i) fluoresceino sulaikymo vertė > 0,5, ii) ragenos drumstumas > 0,5 arba iii) yra papildomų pažeidimo požymių, reikėtų pakeisti. Jei akys nebuvo atmestos pagal kurį nors iš šių kriterijų, reikėtų atmesti atskiras akis, kurių ragenos storio nuokrypis nuo visų akių vidurkio didesnis kaip 10 %. Naudotojai turėtų žinoti, kad matuojant mikroskopu su plyšine lempa gautas ragenų storis gali skirtis, pasirinkus nevienodus plyšio pločio nuostačius. Reikėtų nustatyti 0,095 mm pločio plyšį.

▼M7

Apžiūrėjus akis ir patvirtinus jų tinkamumą, jos maždaug 45–60 min inkubuojamos, kad prieš dozavimą būtų pasiekta pusiausvyra su bandymo sistema. Pasibaigus pusiausvirinimo laikotarpiui, registruojamos ragenos nulinės storio ir drumstumo vertės, kurios būtų naudojamos kaip atskaitos vertės (t. y. laikas = 0). Išpjovimo metu gauta fluoresceino skaitinė vertė naudojama kaip šios vertinamosios baigties atskaitos vertė.

Bandomosios cheminės medžiagos įterpimas

Iš karto po nulinio laiko atskaitos verčių matavimo, akis (su laikikliu) išimama iš perfuzijos aparato, padedama horizontaliai ir ant ragenos uždedama bandomosios cheminės medžiagos.

Skystos bandomosios cheminės medžiagos paprastai bandomos grynos, tačiau prireikus (pvz., jei tai yra tyrimo schemos dalis) jas galima atskiesti. Tinkamiausias bandomųjų cheminių medžiagų tirpiklis yra fiziologinis tirpalas. Kontroliuojamomis sąlygomis galima naudoti kitus tirpiklius, tačiau būtina įrodyti tirpiklių, kurie nėra fiziologinis tirpalas, tinkamumą.

Skystos bandomosios cheminės medžiagos užlašinamos ant ragenos taip, kad visas ragenos paviršius būtų tolygiai padengtas bandomąja chemine medžiaga, kurios tipinis tūris – 0,03 ml.

Jei įmanoma, kietąsias bandomąsias chemines medžiagas reikėtų kuo smulkiau sumalti grūstuve arba panašia malimo priemone. Milteliai ant ragenos beriami taip, kad jos paviršius būtų tolygiai padengtas bandomąja chemine medžiaga, kurios tipinis kiekis – 0,03 g.

Bandomoji cheminė medžiaga (skysta arba kieta) laikoma uždėta 10 sekundžių ir nuplaunama nuo akies aplinkos temperatūros izotoniniu druskos tirpalu (maždaug 20 ml). Tada akis (su laikikliu) vėl įdedama į perfuzijos aparatą, į pradinę vertikaliąją padėtį. Prireikus po 10 sekundžių laikymo ir vėlesniais laiko momentais (pvz., ant ragenos radus bandomosios cheminės medžiagos likučių) galima plauti papildomai. Apskritai papildomam plovimui naudojamas druskos tirpalo tūris neturi didelės reikšmės, bet svarbu pastebėti, ar ant ragenos yra prilipusios cheminės medžiagos.

Kontrolinės cheminės medžiagos

Atliekant kiekvieną bandymą turėtų būti įtraukti vienalaikiai neigiami arba tirpiklio ar nešiklio kontroliniai ėminiai ir teigiami kontroliniai ėminiai.

Kai pagal ICE bandymo metodą bandomi gryni skysčiai arba kietosios medžiagos, kaip vienalaikis neigiamas kontrolinis ėminys naudojamas fiziologinis tirpalas, kad būtų galima aptikti netipinius bandymo sistemos pokyčius ir kad tyrimo sąlygos nesukeltų netinkamo dirginamojo atsako.

Kai taikant bandymo metodą bandomi atskiesti skysčiai, įtraukiama vienalaikė tirpiklio ar nešiklio kontrolinė grupė, kad būtų galima aptikti netipinius bandymo sistemos pokyčius ir kad tyrimo sąlygos nesukeltų netinkamo dirginamojo atsako. Kaip nurodyta 31 skirsnyje, galima naudoti tik tokį tirpiklį ar nešiklį, kuris, kaip įrodyta, neturi neigiamo poveikio bandymo sistemai.

Siekiant patikrinti, ar sukeliamas reikiamas atsakas, atliekant kiekvieną bandymą kaip teigiama kontrolinė medžiaga įtraukiama žinoma akis dirginanti medžiaga. Kadangi pagal šį bandymo metodą ICE bandymas atliekamas ėsdinančioms arba smarkiai dirginančioms medžiagoms nustatyti, šio bandymų metodo teigiama kontrolinė medžiaga turėtų būti etaloninė cheminė medžiaga, kuri sukelia stiprų atsaką. Tačiau, siekiant užtikrinti galimybę vertinti teigiamo kontrolinio ėminio

▼M7

atsako kintamumą per tam tikrą laiką, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus. Turėtų būti gauta pakankamai *in vitro* duomenų apie teigiamą kontrolinę medžiagą, kad būtų galima apskaičiuoti statistiškai apibrėžtą priimtiną teigiamos kontrolinės medžiagos intervalą. Jei tinkamų istorinių ICE bandymo metodo duomenų apie tam tikrą teigiamą kontrolinę medžiagą nėra, gali tekti atlikti tyrimus šiai informacijai gauti.

Tinkamų teigiamų kontrolinių medžiagų pavyzdžiai bandant skystas chemines medžiagas yra 10 % acto rūgštis arba 5 % benzalkonio chloridas, o bandant kietąsias chemines medžiagas – natrio hidroksidas arba imidazolas.

Palyginamosios cheminės medžiagos yra naudingos, kai reikia įvertinti tam tikros cheminių medžiagų ar produktų klasės nežinomų cheminių medžiagų gebą dirginti akis arba akis dirginančios medžiagos santykinę dirginamąją gebą tam tikrame atsako į dirginimą intervale.

Matuojamos vertinamosios baigtys

Apdorotos ragenos įvertinamos prieš apdorojimą ir 30, 75, 120, 180 bei 240 min (± 5 min) po apdorotų ragenų nuplovimo. Matuojant tokiais laiko momentais užtikrinamas tinkamas matavimų skaičius keturių valandų apdorojimo laikotarpiu, tarp matavimų paliekant pakankamai laiko reikiamai visų akių apžiūrai.

Nustatytos vertinamosios baigtys – ragenos drumstumas, pabrinkimas, fluoresceino sulaikymas ir morfologiniai padariniai (pvz., epitelio išopėjimas arba atsiskyrimas). Visos vertinamosios baigtys, išskyrus fluoresceino sulaikymą (kuris nustatomas tik prieš apdorojimą ir praėjus 30 min nuo paveikimo bandomąja chemine medžiaga), vertinamos kiekvienu pirmiau nurodytu laiko momentu.

Patariama padaryti nuotraukas, kad būtų gauti ragenos drumstumo, fluoresceino sulaikymo, morfologinių padarinių ir histopatologinių tyrimų, jei atliekami, dokumentai.

Baigus keturių valandų tyrimą, naudotojams siūloma konservuoti akis tinkamame fiksavimo tirpale (pvz., neutraliame buferuotame formalino tirpale), kad būtų galima atlikti histopatologinį tyrimą (išsamesnės informacijos pateikta 14 pastraipoje ir (8) nuorodoje).

Ragenų pabrinkimas nustatomas ragenos storį matuojant optiniu pachimetru, įrengtu mikroskope su plyšine lempa. Jis išreiškiamas procentais ir taikant ragenos storio matavimo duomenis apskaičiuojamas pagal šią formulę:

$$\left(\frac{\textit{ragenos storis esant } t - \textit{ragenos storis esant } t = 0}{\textit{ragenos storis esant } t = 0} \right) \times 100$$

Apskaičiuojamas visų bandytų akių vidutinis ragenos pabrinkimas procentais kiekvienu stebėjimo laiko momentu. Pagal didžiausią vidutinį ragenos pabrinkimo balą, nustatytą kuriuo nors laiko momentu, kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai priskiriamas visuminis kategorijos balas (žr. 51 pastraipą).

Ragenos drumstumas įvertinamas tame ragenos plote, kuris labiausiai nepraleidžia šviesos, kad būtų gautas drumstumo balas, pateiktas 1 lentelėje. Apskaičiuojama visų bandytų akių vidutinė ragenos drumstumo vertė kiekvienu stebėjimo laiko momentu. Pagal didžiausią vidutinį ragenos drumstumo balą, nustatytą kuriuo nors laiko momentu, kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai priskiriamas bendras kategorijos balas (žr. 51 pastraipą).

▼M7

1 lentelė

Ragenos drumstumo balai

Balas	Stebėjimo rezultatas
0	Jokio drumstumo
0,5	Labai nežymus drumstumas
1	Taškinės arba pasklidosios drumstumo sritys; rainelės elementai aiškiai matomi
2	Lengvai įžiūrima pusskaidrė sritis; rainelės elementai šiek tiek neryškūs
3	Didelis ragenos drumstumas, atskirų rainelės elementų nesimato; vyzdžio dydis vos įžiūrimas
4	Visiškas ragenos drumstumas; vyzdys nematomas

Fluoresceino sulaikymas įvertinamas tik 30 min atitinkančiu stebėjimo momentu, kaip pateikta 2 lentelėje. Visų bandytų akių vidutinė fluoresceino sulaikymo vertė apskaičiuojama tik 30 min atitinkančiam stebėjimo momentui ir ji naudojama kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos visuminiam kategorijos balui gauti (žr. 51 pastraipą).

2 lentelė

Fluoresceino sulaikymo balai

Balas	Stebėjimo rezultatas
0	Jokio fluoresceino sulaikymo
0,5	Labai nedaug pavienių dažytų ląstelių
1	Pavienės dažytos ląstelės, išsklaidytos per visą apdorotą ragenos plotą
2	Dažytų pavienių ląstelių tankūs židiniai arba susilieję plotai
3	Dideli susilieję fluoresceiną sulaikančios ragenos plotai

Morfologiniai padariniai aprėpia ragenos epitelio ląstelių opėjimą, epitelio atsiskyrimą, ragenos paviršiaus šiurkštėjimą ir bandomosios cheminės medžiagos sulipimą su ragena. Šių požymių stiprumas gali būti įvairus ir jie gali pasireikšti kartu. Šių požymių klasifikavimas yra subjektyvus, priklauso nuo tyrėjo aiškinimų.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenų įvertinimas

Ragenos drumstumo, pabrinkimo ir fluoresceino sulaikymas turėtų būti įvertinti atskirai, kad būtų gauta kiekvienos vertinamosios baigties ICE klasė. Tada kiekvienos vertinamosios baigties ICE klasės apibendrinamos, kad būtų gautas kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos akių dirginimo klasifikavimas.

Sprendimo priėmimo kriterijai

Nustačius kiekvieną vertinamąją baigtį, ICE klasės gali būti priskirtos atsižvelgiant į iš anksto nustatytą intervalą. Ragenos pabrinkimo (3 lentelė), drumstumo (4 lentelė) ir fluoresceino sulaikymo (5 lentelė) rezultatų aiškinimas, taikant keturias ICE klases, atliekamas pagal toliau pateiktas skales. Svarbu atkreipti

▼M7

dėmesį į tai, kad 3 lentelėje pateikti ragenos pabrinkimo balai taikomi tik tada, jei storis matuojamas mikroskopu su plyšine lempa (pvz., Haag-Streit BP900), gylio matavimo įtaisu Nr.1 ir plyšio pločio nuostačiu $9\frac{1}{2}$, kuris yra lygus 0,095 mm. Naudotojai turėtų žinoti, kad matuojant mikroskopu su plyšine lempa ragenos storio matmenys gali skirtis, jei skirtingas plyšio pločio nuostatis.

3 lentelė

ICE klasifikavimo kriterijai atsižvelgiant į ragenos pabrinkimą

Vidutinis ragenos pabrinkimas (%) (*)	ICE klasė
nuo 0 iki 5	I
nuo > 5 iki 12	II
nuo > 12 iki 18 (> 75 min nuo apdorojimo)	II
nuo > 12 iki 18 (≤ 75 min nuo apdorojimo)	III
nuo > 18 iki 26	III
nuo > 26 iki 32 (> 75 min nuo apdorojimo)	III
nuo > 26 iki 32 (≤ 75 min nuo apdorojimo)	IV
> 32	IV

(*) Didžiausias stebimas balas bet kuriuo laiko momentu.

4 lentelė

ICE klasifikavimo kriterijai atsižvelgiant į drumstumą

Maksimalus vidutinis drumstumo balas (*)	ICE klasė
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–4,0	IV

(*) Maksimalus vidutinis balas, stebimas bet kuriuo momentu (pagrįstas drumstumo balais, kaip apibrėžta 1 lentelėje).

.5 lentelė

ICE klasifikavimo kriterijai atsižvelgiant į vidutinį fluoresceino sulaikymą

Vidutinis fluoresceino sulaikymo balas, praėjus 30 min nuo apdorojimo (*)	ICE klasė
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–3,0	IV

(*) Pagrįstas drumstumo balais, kaip apibrėžta 2 lentelėje.

Bandomosios cheminės medžiagos *in vitro* klasifikavimas vertinamas gaunant GHS klasifikavimą, kuris atitinka gautų ragenų pabrinkimo, ragenų drumstumo ir fluoresceino sulaikymo kategorijų derinį, kaip aprašyta 6 lentelėje.

▼M7

6 lentelė

Visuminis *in vitro* klasifikavimas

JT GHS klasifikavimas	Trijų vertinamųjų baigčių deriniai
Be kategorijos	3 × I 2 × I, 1 × II
Prognozės pateikti negalima	Kiti deriniai
1 kategorija	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Ragenos drumstumas ≥ 3 po 30 min (ne mažiau kaip dviejų akių) Ragenos drumstumas = 4 kuriuo nors laiko momentu (ne mažiau kaip dviejų akių) Didelis epitelio atsiskyrimas (bent vienos akies)

(*) Retai pasitaikantys deriniai.

Tyrimo priimtinumo kriterijai

Bandymas laikomas priimtinu, jei vienalaikiai neigiami arba nešiklio ar tirpiklio kontroliniai ėminiai ir vienalaikiai teigiami kontroliniai ėminiai nustatomi kaip GHS neklasifikuojami ar GHS 1 kategorijos ėminiai.

Bandymo ataskaita

Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija, jei ji yra svarbi atliekant tyrimą:

Bandomoji cheminė medžiaga ir kontrolinės cheminės medžiagos

— cheminės medžiagos pavadinimas (-ai), pvz., Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos (angl. *Chemical Abstracts Service*, CAS) naudojamas struktūrinis pavadinimas ir kiti pavadinimai, jei jie žinomi;

— CAS registro numeris (RN), jei žinomas;

— bandomosios ir (arba) kontrolinės cheminės medžiagos grynumas ir sudėtis (masės procentinėmis dalimis), jei tokia informacija yra;

— tyrimui atlikti reikiamos fizikinės ir cheminės savybės, pvz., agregatinė būsena, lakumas, pH, stabilumas, cheminių junginių klasė, tirpumas vandenyje;

— bandomųjų ir (arba) kontrolinių cheminių medžiagų apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas),

— stabilumas, jei jis žinomas.

Informacija apie rėmėją ir bandymų laboratoriją

— rėmėjo pavadinimas ir adresas, bandymų laboratorija ir tyrimo vadovas;

— akių šaltinio identifikavimo duomenys (t. y. įmonė, iš kurios jos buvo paimtos);

Bandymų metodo sąlygos

— naudotos bandymo sistemos aprašymas;

▼M7

— naudotas mikroskopas su plyšine lempa (pvz., modelis) ir naudoto prietaiso padaryti nuostačiai;

— istorinių neigiamų ir teigiamų kontrolinių ėminių rezultatų nuorodos ir, jei tinka, istoriniai duomenys, kurie parodo priimtinus vienalaikių palyginamųjų medžiagų kontrolinių ėminių intervalus;

— procedūra, taikyta bandymų metodo vientisumui (t. y. tikslumui ir patikimumui) užtikrinti laikui bėgant (pvz., kvalifikaciniam bandymui skirtų cheminių medžiagų periodinis tikrinimas).

Akių surinkimas ir paruošimas

— gyvūno donoro amžius ir masė ir, jei yra, kitos gyvūnų, kurių akys buvo imamos, specifinės charakteristikos (pvz., lytis, veislė);

— akių laikymo ir transportavimo sąlygos (pvz., akių paėmimo data ir laikas, laiko tarpas nuo viščiukų galvų surinkimo iki išpjautų akių įdėjimo į perfuzijos kamerą);

— akių paruošimas ir įdėjimas, įskaitant pastabas dėl jų kokybės, akių kamerų temperatūra ir bandymams skirtų akių atrankos kriterijai.

Bandymų procedūra

— kartotinių ėminių skaičius

— naudotų neigiamų ir teigiamų kontrolinių medžiagų identifikavimo duomenys (taip pat tirpiklio ir palyginamųjų kontrolinių cheminių medžiagų, jei tinka);

— bandomosios cheminės medžiagos dozė, naudotas uždėjimo laikas ir veikimo trukmė;

— stebėjimo laiko momentai (pieš apdorojimą ir po jo);

— įvertinimo ir taikytų sprendimo priėmimo kriterijų aprašymas;

— taikytų tyrimo priimtinumo kriterijų aprašymas;

— visų bandymo procedūros pakeitimų aprašymas.

Rezultatai

— kiekvienu stebėjimo momentu gautų kiekvienos atskiros akies ragenos pabrinkimo, drumstumo ir fluoresceino sulaikymo balų lentelė, įskaitant visų bandytų akių vidutinį balą kiekvienu stebėjimo momentu;

— stebėti (bet kuriuo laiko momentu) didžiausi vidutiniai ragenos pabrinkimo, drumstumo ir fluoresceino sulaikymo balai ir susijusi ICE klasė.

— visų kitų pastebėtų reiškinių aprašymas;

— gautas *in vitro* GHS klasifikavimas, jei tinka;

— akies nuotraukos, jei reikia.

Rezultatų aptarimas

Išvada

▼M7

LITERATŪRA

(1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report – *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Available: [http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Status of *in vitro* Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/-MildMod-TMER.htm]

(4) United Nations (UN) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, UN New York and Geneva, 2011. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html]

(5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment no. 188 (Part 1 and Part 2), OECD, Paris.

(6) Šio priedo B.5 skyrius. *Ūmus akių dirginimas arba ėsdinimas*.

(7) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. Toxicology *In Vitro* 24, 1-9.

(8) OECD (2011) Guidance Document on „The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants“. Series on Testing and Assessment no. 160, OECD, Paris.

(9) ICCVAM. (2006). Background review document: Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]

(10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

(11) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Available: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol*. 34:291-296.

▼**M7**

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

(15) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? Toxicology *in Vitro* 20,78-81.

(16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Available: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf].

(17) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(18) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼M7

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo metodo taikymo charakteristikų matas ir vienas iš „tinkamumo“ aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „atitiktis“ tinkamų bandymo metodo rezultatų daliai išreikšti.

Palyginamoji cheminė medžiaga – cheminė medžiaga, naudojama kaip etalonas lyginant su bandomąja chemine medžiaga. Palyginamoji cheminė medžiaga turėtų turėti šias savybes: i) pastovų (-ius) ir patikimą (-us) šaltinį (-ius); ii) struktūrinį ir funkcinį panašumą su bandomųjų cheminių medžiagų klase; iii) žinomas fizikines ir (arba) chemines charakteristikas; iv) žinomą poveikį patvirtinančius duomenis ir v) žinomą veikimo gebą reikiamo atsako intervale.

Aukštynkryptis metodas – pakopinis metodas, taikomas cheminei medžiagai, apie kurią daroma prielaida, kad jos nereikia klasifikuoti dėl akių dirginimo arba smarkaus akių pažeidimo, kai cheminės medžiagos, kurių nereikia klasifikuoti (duoda neigiamą rezultatą), nustatomos atskiriant jas nuo kitų cheminių medžiagų (duoda teigiamą rezultatą).

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Ragena – permatoma priekinė akies obuolio dalis, dengianti rainelę bei vyzdį ir praleidžianti šviesą į vidų.

Ragenos drumstumas – ragenos, paveiktos bandomąja chemine medžiaga, neskaidrumo laipsnio matas. Padidėjęs ragenos drumstumas rodo ragenos pažeidimą.

Ragenos pabrinkimas – objektyvus atliekant ICE bandymą nustatomas ragenos išsipūtimo lygio, baigus veikti bandomąja chemine medžiaga, matas. Išreiškiamas procentais ir apskaičiuojamas pagal ragenos storio atskaitos vertę (nustatytą prieš veikiant doze) ir ragenos storį, užregistruotą vienodais laiko tarpais, baigus veikti bandomąja chemine medžiaga atliekant ICE bandymą. Ragenos pabrinkimo lygis rodo ragenos pažeidimą.

Akių dirginimas – akių pokyčių sukėlimas, uždėjus bandomosios cheminės medžiagos ant priekinio akies paviršiaus, kai pokyčiai visiškai išnyksta per 21 parą nuo uždėjimo. Sukeičiama su *Grįžtamasis poveikis akims* ir su *JT GHS 2 kategorija* (4).

Klaidingai neigiamų rezultatų dalis – visų teigiamų cheminių medžiagų, kurios taikant bandymų metodą klaidingai nustatytos kaip neigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo metodo taikymo charakteristikų rodiklių.

Klaidingai teigiamų rezultatų dalis – visų neigiamų cheminių medžiagų, kurios taikant bandymų metodą klaidingai identifikuotos kaip teigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo metodo taikymo charakteristikų rodiklių.

Fluoresceino sulaikymas – per ICE bandymą subjektyviai nustatomas fluoresceino natrio druskos kiekis, išlikęs ragenos epitelio ląstelėse, rageną baigus veikti bandomąja chemine medžiaga. Fluoresceino sulaikymo laipsnis rodo ragenos epitelio pažeidimą.

Pavojus – būdingoji agento savybė arba situacija, galinti sukelti neigiamų padarinių, kai organizmą, sistemą ar populiaciją (arba jos dalį) veikia tas agentas.

Negrįžtamasis poveikis akims – žr. *smarkus akių pažeidimas* ir *JT GHS 1 kategorija*.

▼M7

Mišinys – dviejų arba daugiau medžiagų mišinys arba tirpalas, kuriuose jos nereaguoja (4)

Neigiamas kontrolinis ėminys – neapdorotas kartotinis ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus. Šis ėminys tiriamas kartu su bandomąja chemine medžiaga apdorotais ėminiais ir kitais kontroliniais ėminiais, siekiant nustatyti, ar vyksta tirpiklio sąveika su bandymo sistema.

Neklasifikuojamos – cheminės medžiagos, kurios neklasifikuojamos dėl akių dirginimo (JT GHS 2 kategorija) ar dėl smarkaus akių pažeidimo (JT GHS 1 kategorija). Sukeičiama su *JT GHS be kategorijos*.

Teigiamas kontrolinis ėminys – kartotinis ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus ir paveiktas chemine medžiaga, kuri yra žinoma kaip sukelianti teigiamą atsaką. Siekiant užtikrinti galimybę vertinti teigiamo kontrolinio ėminio atsako kintamumą per tam tikrą laiką, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus.

Patikimumas – pagal tą patį protokolą atliekamo bandymų metodo, tam tikrą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų, atkuriamumo laipsnio matai. Jis įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų ir pakartojamumą laboratorijoje.

Grįžtamasis poveikis akims – žr. *akių dirginimas* ir *JT GHS 2 kategorija*.

Smarkus akių pažeidimas – tai akies audinio pažeidimas arba smarkus fizinis regėjimo pablogėjimas, ant išorinio akies paviršiaus uždėjus bandomosios cheminės medžiagos, kuris ne visiškai išnyksta praėjus 21 parai nuo uždėjimo. Sukeičiama su *Nerįžtamasis poveikis akims* ir su *JT GHS 1 kategorija* (4).

Mikroskopas su plyšine lempa – prietaisas, naudojamas tiesiogiai ištirti akį, jos vaizdą padidinant binokuliniu mikroskopu ir sukuriant tiesioginį stereoskopinį vaizdą. Taikant ICE bandymo metodą, šis prietaisas naudojamas viščiukų akių priekinėms struktūroms apžiūrėti ir ragenos storiui objektyviai išmatuoti pritaisytu gylio matavimo prietaisu.

Tirpiklio ar nešiklio kontrolinis ėminys – visus bandymo sistemos komponentus, įskaitant tirpiklį ar nešiklį, turintis neapdorotas ėminys, kuris tiriamas kartu su bandomąja chemine medžiaga apdorotais ėminiais ir kitais kontroliniais ėminiais, siekiant nustatyti atskaitos vertę ėminiams, paveiktiems bandomąja chemine medžiaga, ištirpinta tame pačiame tirpiklyje ar nešiklyje. Kai bandomas kartu su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu, šis ėminys taip pat parodo, ar vyksta tirpiklio arba nešiklio sąveika su bandymo sistema.

Medžiaga – natūralios būsenos arba gamybos procese gaunami cheminiai elementai ir jų junginiai, įskaitant visus priedus, kurie reikalingi produkto stabilumui užtikrinti, ir visas priemaišas, patenkančias į produktą jo gamybos proceso metu, tačiau neįskaitant tirpiklio, kurį galima atskirti, nepaveikiant medžiagos stabilumo ar nekeičiant jos sudėties;

Paviršinio aktyvumo medžiaga – dar vadinama paviršinio aktyvumo agentu, tai yra medžiaga, pvz., ploviklis, kuri gali sumažinti skysčio paviršiaus įtemptį, kad skystis galėtų putoti ar prasiskverbti į kietąsias medžiagas; be to, ji žinoma drėkiklio pavadinimu.

▼M7

Žemynkryptis metodas – pakopinis metodas, taikomas cheminei medžiagai, apie kurią daroma prielaida, kad ji sukelia smarkų akių pažeidimą, kai cheminės medžiagos, kurios sukelia smarkų akių pažeidimą (duoda teigiamą rezultatą), nustatomos atskiriant jas nuo kitų cheminių medžiagų (duoda neigiamą rezultatą).

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Nuosekliųjų bandymų strategija – pakopomis atliekamų bandymų strategija, kai tam tikra eilės tvarka nagrinėjama visa turima informacija apie bandomąją cheminę medžiagą, kiekvienoje pakopoje taikant įrodomosios vertės analizės procesą, siekiant nustatyti, ar yra pakankamai duomenų sprendimui dėl pavojingumo kategorijos priimti, prieš pereinant prie kitos pakopos. Jei bandomosios cheminės medžiagos dirginamąją gebą galima nustatyti atsižvelgiant į turimą informaciją, papildomų bandymų atlikti nereikia. Jei atsižvelgiant į turimą informaciją, bandomajai cheminei medžiagai dirginamosios gebos priskirti neįmanoma, taikoma nuosekliųjų bandymų su gyvūnais procedūra tol, kol būtų galima gauti nedviprasmį klasifikavimą.

Jungtinių Tautų visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema (JT GHS) – sistema, kurioje pateikiamas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimas pagal standartizuotus fizikinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir nagrinėjami atitinkami informaciniai elementai, pvz., piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų galima informuoti apie medžiagų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbuotojus, darbininkus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likvidatorius) ir aplinką (4).

JT GHS 1 kategorija – žr. *Smarkus akių pažeidimas* ir (arba) *Negrįžtamasis poveikis akims*.

JT GHS 2 kategorija – žr. *Akių dirginimas* ir (arba) *Grįžtamasis poveikis akims*.

JT GHS be kategorijos – cheminės medžiagos, kurios neatitinka JT GHS 1 arba 2 (2A ar 2B) kategorijos klasifikavimo reikalavimų. Sukeičiama su *Neklasifikuojamos*

Patvirtinto tinkamumo bandymų metodas – bandymų metodas, kurio patvirtinimo tyrimai atlikti, kad būtų nustatytas jo tinkamumas tam tikram tikslui pasiekti (įskaitant tikslumą) ir patikimumas. Svarbu pažymėti, kad patvirtinto tinkamumo bandymo metodo tikslumo ir patikimumo charakteristikos gali būti nepakankamos, kad jį būtų galima laikyti priimtinu siūlomam tikslui pasiekti.

Įrodomoji duomenų galia – įvairių informacijos dalių privalumų ir trūkumų nagrinėjimo procesas priimant ir patvirtinant sprendimą dėl cheminės medžiagos pavojingumo.

▼M7

2 priedėlis

CHEMINĖS MEDŽIAGOS, SKIRTOS KVALIFIKACIJAI TIKRINTI TAIKANT ICE BANDYMŲ METODĄ

Prieš pradėdamos įprastiniu būdu atlikti bandymus, susijusius su šiuo bandymo metodu, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, tinkamai klasifikuodamos 1 lentelėje rekomenduojamų 13 cheminių medžiagų keliamą pavojų akims. Šios cheminės medžiagos buvo parinktos taip, kad atitiktų pavojų akims atsakų intervalą, atsižvelgiant į *in vivo* triušio akių bandymo (TG 405) rezultatus ir į JT GHS klasifikavimo sistemą (t. y. JT GHS 1, 2A, 2B kategorijas ar į GHS be kategorijos) (4)(6). Kiti atrankos kriterijai buvo galimybė pirkti chemines medžiagas ir tai, ar galima gauti aukštos kokybės *in vivo* etaloninius duomenis bei aukštos kokybės *in vitro* ICE bandymų metodo duomenis. Etaloniniai duomenys pateikti supaprastintame suvestiniame dokumente (5) ir ICE bandymų metodo ICCVAM istorinės apžvalgos dokumente (9).

1 lentelė

Cheminės medžiagos, rekomenduojamos techninei kvalifikacijai tikrinti taikant ICE bandymų metodą

Cheminė medžiaga	CAS Nr.	Cheminė klasė (1)	Agregatinė būsena	*In vivo* klasifikavimas (2)	*In vitro* klasifikavimas (3)
Benzalkonio chloridas (5 %)	8001-54-5	Onio junginys	Skystis	1 kategorija	1 kategorija
Chlorheksidinas	55-56-1	Aminas, amidinas	Kietoji medžiaga	1 kategorija	1 kategorija
Dibenzoil-L-vyno rūgštis	2743-38-6	Karboksirūgštis, esteris	Kietoji medžiaga	1 kategorija	1 kategorija
Imidazolas	288-32-4	Heterociklinis junginys	Kietoji medžiaga	1 kategorija	1 kategorija
Trichloracto rūgštis (30 %)	76-03-9	Karboksirūgštis	Skystis	1 kategorija	1 kategorija
2,6-dichlorbenzoil chloridas	4659-45-4	Acilhalogenidas	Skystis	2A kategorija	Neįmanoma pateikti prognozių (4)
Amonio nitratas	6484-52-2	Neorganinė druska	Kietoji medžiaga	2A kategorija (5)	Neįmanoma pateikti prognozių (4)
Etil-2-metilaceto acetatas	609-14-3	Ketonas, esteris	Skystis	2 B kategorija	Neįmanoma pateikti prognozių (4)
Dimetil sulfoksidas	67-68-5	Organinis sieros junginys	Skystis	Jokios kategorijos	Jokios kategorijos
Glicerolis	56-81-5	Alkoholis	Skystis	Be kategorijos	Be kategorijos (tarpinė vertė)
Metilciklo pentanas	96-37-7	Angliavandenilis (ciklinis)	Skystis	Be kategorijos	Be kategorijos
n-heksanas	110-54-3	Angliavandenilis (alifatinis)	Skystis	Be kategorijos	Be kategorijos

▼M7

Cheminė medžiaga	CAS Nr.	Cheminė klasė (1)	Agregatinė būsena	*In vivo* klasifikavimas (2)	*In vitro* klasifikavimas (3)
Triacetinas	102-76-1	Lipidas	Skystis	Neklasifikuojamos	Be kategorijos

Santrumpos: CAS Nr. – Cheminių medžiagų pavadinimų santrumpų tarnybos registracijos numeris.

(1) Kiekviena bandomoji cheminė medžiaga priskirta cheminių junginių klasei taikant standartinę klasifikavimo sistemą, pagrįstą Vaistų medicininių dalykinių antraščių (MeSH) nacionalinės bibliotekos klasifikavimo sistema (available at http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Atsižvelgiant į rezultatus, gautus atlikus triušio akies *in vivo* bandymą (EBPO TG 405), ir taikant JT GHS (4)(6).

(3) Atsižvelgiant į ICE rezultatus, kaip aprašyta 6 lentelėje.

(4) Kitų nei 6 lentelėje aprašytų GHS be kategorijos ir GHS 1 kategorijos ICE balų derinys (žr. 6 lentelę).

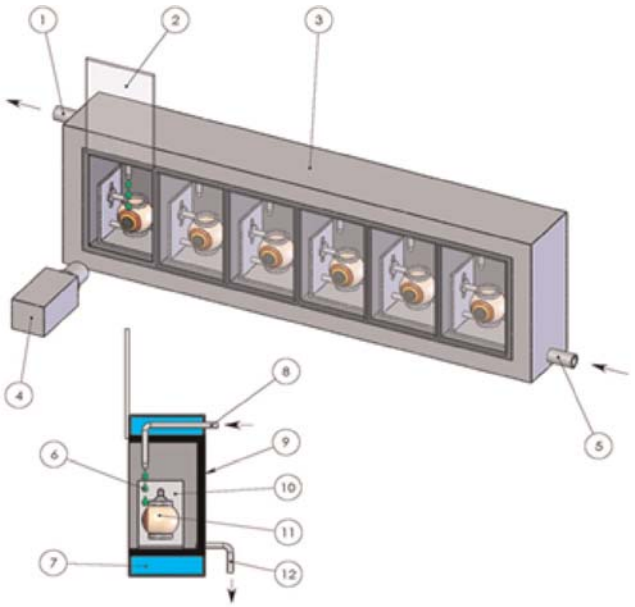
(5) Klasifikavimas kaip 2A ar 2B priklauso nuo JT GHS kriterijaus šioms dviems kategorijoms atskirti aiškinimo, t. y. poveikis 7 parą 1 iš 3 gyvūnų palyginti su 2 iš 3 gyvūnų, kuris yra būtinas norint klasifikuoti kaip 2A kategorijos. Į *in vivo* tyrime buvo naudojami 3 gyvūnai. Visos vertinamosios baigtys, išskyrus vieno gyvūno junginės paraudimą, grįžo prie nulinių verčių 7 parą arba anksčiau. Vieno gyvūno, kurio junginės paraudimas ne visiškai išnyko iki 7 paros, paraudimo balas buvo 1 (7 parą), šis paraudimas visiškai išnyko 10 parą.

▼M7

3 priedėlis

ICE PERFUZIJOS APARATO IR AKIŲ LAIKIKLIŲ SCHEMOS

(Perfuzijos aparato ir akies laikiklio išsamesnis bendrasis aprašymas pateiktas Burton et al. (18))



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Detalės Nr.	Aprašymas	Detalės Nr.	Aprašymas
1	Šilto vandens išleidžiamoji anga	9	Kamera
2	Slankiojamosios durys	10	Akies laikiklis
3	Perfuzijos aparatas	11	Viščiuko akis
4	Optinis matavimo prietaisas	12	Fiziologinio tirpalo išleidžiamoji anga
5	Šilto vandens įleidžiamoji anga	13	Fiksavimo varžtas
6	Fiziologinis tirpalas	14	Reguliuojamos padėties viršutinė svirtis
7	Šiltas vanduo	15	Nejudamoji apatinė svirtis
8	Fiziologinio tirpalo įleidžiamoji anga		

▼M7

B.49. IN VITRO ŽINDUOLIŲ LĄSTELIŲ MIKROBRANDUOLIŲ BANDYMAS

ĮVADAS

Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) 487 (2014). Jis yra genetinės toksikologijos metodų serijos dalis. Yra parengtas EBPO dokumentas, kuriame glaustai pateikiama informacijos apie genetinės toksikologijos bandymus ir naujausių šių gairių pakeitimų apžvalga (1).

In vitro mikrobranduolių (MNvit) tyrimas yra genotoksiškumo bandymas, skirtas tarpfazinių ląstelių citoplazmos mikrobranduoliams (angl. *micronuclei*, MN) aptikti. Mikrobranduoliai gali susidaryti iš chromosomų acentrinių fragmentų (t. y. neturinčių centromeros) arba iš visų chromosomų, kurios ląstelių dalijimosi anafazės stadijoje negali migruoti link polių. Todėl MNvit bandymas yra *in vitro* metodas, kuris užtikrina patikimą pagrindą tiriant *in vitro* chromosomų pažeidimo gebą, nes galima aptikti aneugenus ir klastogenus (2) (3) ląstelėse, kurioms įvyko ląstelių dalijimasis veikiant chemine medžiaga arba pasibaigus veikimui (daugiau informacijos pateikta 13 pastraipoje). Mikrobranduoliai rodo pažeidimą, kuris buvo perduotas dukterinėms ląstelėms, o metafazės ląstelėse užfiksuotos chromosomų aberacijos gali būti neperduotos. Bet kuriuo atveju pokyčiai gali būti nesuderinami su ląstelės išgyvenamumu.

Pagal šį bandymo metodą galima naudoti protokolus su aktino polimerizacijos inhibitoriumi citochalazinu B (citoB) arba be jo. Pridėjus citoB prieš mitozę gaunamos dvibranduolės ląstelės, todėl yra galimybė atpažinti ir analizuoti mikrobranduolius tik tose ląstelėse, kuriose įvyko viena mitozė (4) (5). Pagal šį bandymo metodą taip pat galima naudoti protokolus be citokinezės blokavimo, jei yra įrodymų, kad analizuojamoje ląstelių populiacijoje įvyko mitozė.

Be MNvit tyrimo taikymo nustatant chemines medžiagas, kurios indukuoja mikrobranduolius, imunocheminio kinetochorų ženklinimo arba hibridizacijos su centromeriniais ar telomeriniais zondais (fluorescencinė *in situ* hibridizacija (FISH)) naudojimas taip pat gali suteikti papildomos informacijos apie chromosomų pažeidimo ir mikrobranduolių susidarymo mechanizmus (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Šias ženklinimo ir hibridizacijos procedūras galima taikyti, kai yra padidėjęs mikrobranduolių susidarymas ir tyrėjas nori nustatyti, ar tą padidėjimą sukėlė klastogeniniai ir (arba) aneugeniniai reiškiniai.

Kadangi tarpfazinių ląstelių mikrobranduoliai gali būti įvertinti palyginti objektyviai, laboratorijos personalui tereikia nustatyti ląstelių su dviem branduoliais skaičių, kai naudojamas citoB, ir ląstelių su mikrobranduoliais dažnumą visais atvejais. Todėl objektinių stiklelių tyrimas yra palyginti spartus ir analizė gali būti automatizuota. Dėl to įmanoma įvertinti ne šimtus, o tūkstančius vieno apdorojimo ląstelių, todėl kriterijaus galia padidėja. Galiausiai, kadangi mikrobranduoliai gali susidaryti iš atsiliekančių chromosomų, yra galimybė aptikti aneuploidiją sukeliančias medžiagas, kurias sunku tirti įprastais chromosomų aberacijos bandymais, pvz., šio priedo B.10 (18). Tačiau taikant šiame bandymo metode aptašytą MNvit bandymą, negalima atskirti cheminių medžiagų, sukeliančių chromosomų skaičiaus pokyčius ir (arba) ploidiją, nuo klastogeniškumą sukeliančių medžiagų, jei netaikomi specialieji metodai, pvz., 4 pastraipoje nurodytas FISH metodas.

MNvit tyrimas yra patikimas ir gali būti atliekamas su įvairių tipų ląstelėmis, esant citoB arba jo nesant. Yra daug duomenų, kurie patvirtina MNvit bandymo tinkamumą, naudojant įvairių tipų ląsteles (ląstelių linijų kultūras ar pirminių ląstelių kultūras) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Pirmiausia tai yra tarptautiniai tinkamumo patvirtinimo tyrimai, kuriuos koordinavo Société Française de Toxicologie Génétique

▼M7

(SFTG) (19) (20) (21) (22) (23), ir tarptautinio genotoksiškumo bandymų seminaro ataskaitos (5) (17). Turimi duomenys buvo pakartotinai įvertinti atliekant retrospektyvųjį tinkamumo patvirtinimo tyrimą įrodomosios vertės analizės metodu, kurį atliko Europos Komisijos Europos alternatyvių metodų tinkamumo patvirtinimo centras (ECVAM), o ECVAM mokslinis patariamasis komitetas (ESAC) patvirtino tyrimo metodą kaip moksliškai patikimą (37) (38) (39).

Atliekant žinduolių ląstelių MNvit bandymą, galima naudoti gerai žinomų ląstelių linijų arba žmogaus ar graužikų kilmės pirminių ląstelių kultūras. Kadangi foninis mikrobranduolių dažnumas turės poveikį bandymo jautriui, rekomenduojama naudoti ląstelių tipus, kurių mikrobranduolių susidarymo foninis dažnumas yra mažas ir stabilus. Naudojamos ląstelės pasirenkamos pagal jų sugebėjimą gerai augti kultūroje, kariotipų stabilumą (įskaitant chromosomų skaičių) ir spontaninį mikrobranduolų dažnumą. Atsižvelgiant į šiuo metu turimus duomenis, neįmanoma pateikti tvirtų rekomendacijų, bet svarbu nurodyti, kad, įvertinant cheminius pavojus, reikėtų atsižvelgti į bandymams pasirinktų ląstelių *p53* būseną, genetinį (kariotipo) stabilumą, DNR atkūrimo gebą ir kilmę (graužikų palyginti su žmogaus). Todėl šio bandymo metodo naudotojai raginami atsižvelgti į šių ir kitų ląstelių charakteristikų įtaką ląstelių linijos savybėms aptinkant mikrobranduolių indukciją, nes šios srities žinių visą laiką daugėja.

Vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

Bandymus atliekant *in vitro* paprastai reikia naudoti egzogeninį metabolinio aktyvinimo šaltinį, išskyrus atvejus, kai ląstelės yra metaboliškai pajėgios bandomųjų cheminių medžiagų atžvilgiu. Egzogeninė metabolinio aktyvinimo sistema nevisiškai atkartoja *in vivo* sąlygas. Reikėtų imtis priemonių, kad būtų išvengta sąlygų, kurioms esant būtų gauti dirbtinai teigiami rezultatai, nerodantys bandomųjų cheminių medžiagų genotoksiškumo. Tokios sąlygos gali atsirasti dėl tokių veiksnių kaip pH pH (41) (42) (43) ar osmolialumo pokyčiai, sąveika su ląstelių kultūros terpe (44) (45) ar per didelis citotoksiškumas (žr. 29 pastraipą).

Mikrobranduolių indukcijai analizuoti svarbiausia, kad apdorotose ir neapdorotose kultūrose būtų įvykusi mitozė. Informatyviausias mikrobranduolių vertinimo etapas vyksta ląstelėse, kuriose veikiant bandomąja chemine medžiaga arba po to įvyko viena mitozė. Pramoninėms nanomedžiagoms gali prireikti tam tikro šio bandymų metodo pakeitimų, kurie šiame bandymų metode neaprašyti.

Prieš taikant bandymų metodą mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, tai dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį.

BANDYMO PRINCIPAS

Žmogaus ar kitų žinduolių kilmės ląstelių kultūros veikiamos bandomąja chemine medžiaga naudojant egzogeninį metabolinio aktyvinimo šaltinį arba jo nenaudojant, jei naudojamos reikiamą metabolinę gebą turinčios ląstelės (žr. 19 pastraipą).

Ląstelės auginamos pakankamą laikotarpį veikimo bandomąja chemine medžiaga metu arba po jo, kad įvyktų chromosomų pažeidimas arba kiti ląstelių ciklo ar ląstelių dalijimosi reiškiniai, dėl kurių interfazinėse ląstelėse imtų formuotis mikrobranduoliai. Aneuploidijai indukuoti bandomoji cheminė medžiaga paprastai turėtų būti mitozės metu. Surinktos ir nudažytos interfazinės ląstelės analizuojamos ieškant mikrobranduolių. Geriausiai būtų skaičiuoti mikrobranduolius tik tose ląstelėse, kuriose mitozė pasibaigia veikimo bandomąja chemine

▼M7

medžiaga metu arba jam pasibaigus, jei toks taikomas. Citokinezės blokatoriumi apdorotose kultūrose tai lengvai pasiekiama skaičiuojant tik dvibranduoles ląsteles. Jei nėra citokinezės blokatoriaus, svarbu įrodyti, kad analizuojamų ląstelių dalijimasis galimai įvyko atsižvelgiant į ląstelių populiacijos didėjimą veikimo bandomąja chemine medžiaga metu arba po jo. Pagal visus protokolus svarbu įrodyti, kad ląstelių proliferacija įvyko kontrolinėje ir apdorotoje kultūrose, o bandomosios cheminės medžiagos sukelto citotoksiškumo arba citostazės laipsnį reikėtų įvertinti visose kultūrose, kuriose skaičiuojami mikrobranduoliai.

METODO APRAŠYMAS

Ląstelės

Galima naudoti pirminių žmogaus arba kitų žinduolių periferinio kraujo limfocitų kultūras (7) (20) (46) (47) ir įvairias graužikų ląstelių linijas, pvz., CHO, V79, CHL/IU ir L5178Y ląsteles, arba žmogaus ląstelių linijas, pvz., TK6, (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (žr. 6 pastraipą). Atliekant mikrobranduolių bandymus, buvo naudotos kitos ląstelių linijos, pvz., HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), HepG2 ląstelės (52) (53), A549 ir pirminės Sirijos žiurkėno embrioninės ląstelės (54), bet jų tinkamumas šiuo metu nėra plačiai patvirtintas. Todėl šių ląstelių linijų ir tipų naudojimą reikėtų pagrįsti, atsižvelgiant į jų įrodytas bandymo charakteristikas, kaip aprašyta *Priimtinumo kriterijų* skyriuje. Buvo paskelbta, kad CitoB gali daryti įtaką L5178Y ląstelių augimui, todėl jis nerekomenduojamas naudoti su šia ląstelių linija (23). Naudojant pirmines ląsteles, dėl gyvūnų gerovės priežasčių reikėtų atsižvelgti į galimybę naudoti, jei įmanoma, žmogiškos kilmės pirmines ląsteles, ir ėminius imti atsižvelgiant į žmonių etikos principus ir reglamentus.

Žmogaus periferinio kraujo limfocitus reikėtų gauti iš jaunų (maždaug 18–35 metų amžiaus), nerūkančių žmonių, kurie nesirgtų ar nebūtų neseniai paveikti genotoksiniais agentais (pvz., cheminėmis medžiagomis, jonizuojančiąja spinduliuote), esant tokiems jų lygiams, kurie padidintų ląstelių su mikrobranduoliais foninį dažnumą. Tai užtikrintų, kad ląstelių su mikrobranduoliais foninis dažnumas būtų mažas ir pastovus. Ląstelių su mikrobranduoliais dažnumo atskaitos vertė didėja senstant ir ši tendencija labiau pasireiškia moterims nei vyrams (55). Jei naudojamos ląstelės paimamos daugiau kaip iš vieno donoro, turėtų būti nurodytas donorų skaičius. Būtina įrodyti, kad ląstelės dalijosi nuo ląstelių ėminio veikimo bandomąja chemine medžiaga pradžios. Ląstelių kultūros laikomos eksponentinio augimo fazėje (ląstelių linijos) arba stimuliuojamos dalytis (pirminės limfocitų kultūros), kad ląstelės būtų veikiamos skirtingose ląstelės ciklo stadijose, nes ląstelių stadijų jautris bandomosioms cheminėms medžiagoms gali būti nežinomas. Pirminės ląstelės, kurias reikia stimuliuoti mitogeniniais agentais, kad jos pradėtų dalytis, paprastai daugiau nesinchronizuojamos jas veikiant bandomąja chemine medžiaga (pvz., žmogaus limfocitai po 48 h mitogeninio stimuliavimo). Naudoti sinchronizuotas ląsteles veikimo bandomąja chemine medžiaga metu nerekomenduojama, bet gali būti priimtina, jei būtų pagrįsta.

Terpės ir kultūros sąlygos

Prižiūrimoms kultūroms reikėtų naudoti reikiamą kultūros terpę ir inkubavimo sąlygas (kultūros indus, drėkinamąją 5 % CO_2 atmosferą, jei tinka, temperatūrą – 37 °C). Ląstelių linijos turėtų būti reguliariai tikrinamos, ar nesikeičia modalinis chromosomų skaičius ir nėra mikoplazmos užkrato, o užkrėstos arba pakitusio modalinio chromosomų skaičiaus ląstelės neturėtų būti naudojamos. Turėtų būti nustatyta bandymo laboratorijoje naudojamų ląstelių linijų ar pirminių kultūrų normalaus ląstelių ciklo trukmė ir ji turėtų atitikti paskelbtas ląstelių charakteristikas.

▼M7

Kultūrų paruošimas

Ląstelių linijos: ląstelės yra dauginamos iš kamieninių kultūrų, sėjamos kultūros terpėje tokiu tankiu, kad ląstelės suspensijose ar monosluoksniuose visą laiką iki pat surinkimo laiko augtų eksponentiškai (pvz., reikėtų vengti monosluoksniuose augančių ląstelių susiliejimo).

Limfocitai: viso kraujo ėminys, apdorotas antikoaguliantu (pvz., heparinu), ar iš to kraujo atskirti limfocitai auginami (pvz., žmogaus limfocitai – 48 h) esant mitogeno (pvz., žmogaus limfocitams – fitohemagliutinino (PHA)), kad ląstelės pradėtų dalytis prieš jas paveikiant bandomąja chemine medžiaga ir citoB.

Metabolinis aktyvinimas

Kai naudojamos nepakankamos endogeninės metabolinės gebos ląstelės, reikėtų naudoti egzogenines metabolinimo sistemas. Jei nebūtų pagrįsta kita sistema, dažniausiai kaip numatytoji rekomenduojama sistema yra kofaktoriumi papildyta pomitochondrinė frakcija (S9), ruošiama iš graužikų (paprastai žiurkių) kepenų, paveiktų fermentų aktyvumą skatinančiais agentais, pvz,. *Aroclor* 1254 (56) (57) ar fenobarbitalio ir b-naftoflavono deriniu (58) (59) (60). Pastarasis derinys neprieštarauja Stokholmo konvencijai dėl patvariųjų organinių teršalų (61) ir pasirodė esąs toks pat veiksmingas kaip *Aroclor* 1254 mišrių funkcijų oksidazėms skatinti (58) (59) (60) (28). S9 frakcija paprastai naudojama nuo 1 % iki 2 % (tūrio) koncentracijos, bet galutinio bandymo terpėje gali būti padidinta iki 10 % (tūrio). Paveikiant bandomąja chemine medžiaga reikėtų vengti naudoti produktus, kurie mažina mitozinį indeksą, ypač su kalciu kompleksus sudarančius produktus (62). Naudojamos egzogeninės metabolinio aktyvinimo sistemos ar metabolizmo skatinimo priemonės tipo ir koncentracijos pasirinkimui įtakos gali turėti naudojamų cheminių medžiagų klasė.

Bandomosios cheminės medžiagos ruošimas

Prieš apdorojant ląsteles, kietąsias cheminės medžiagas reikėtų ištirpinti atitinkamuose tirpikliuose ir, jei reikia, praskiesti. Skystąsias chemines medžiagas galima dėti tiesiogiai į bandymo sistemą ir (arba) praskiesti prieš apdorojant bandymo sistemą. Dujos ar lakiosios bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti bandomos atitinkamai pakeitus standartinius protokolus, pvz., apdorojimas sandariuose kultūros induose (63) (64) (65). Bandomųjų cheminių medžiagų preparatus reikėtų ruošti prieš pat apdorojimą, išskyrus atvejus, kai stabilumo duomenys rodo, kad juos galima laikyti.

Bandymo sąlygos

Tirpikliai

Tirpiklį reikėtų pasirinkti taip, kad būtų optimizuotas bandomosios cheminės medžiagos tirpumas, bet nebūtų daroma neigiama įtaka tyrimo eigai, pvz., kistų ląstelių augimas, būtų paveiktas bandomosios cheminės medžiagos vientisumas, vyktų reakcija su kultūros indais, būtų pakenkta metabolinio aktyvinimo sistemai. Jei įmanoma, rekomenduojama naudoti vandeninį tirpiklį (ar kultūros terpę). Gerai ištirti tirpikliai yra vanduo ar dimetilsulfoksidas (DMSO). Paprastai organinių tirpiklių kiekis neturėtų būti didesnis kaip 1 % (tūrio). Jei citoB tirpinamas DMSO, cheminei medžiagai ir citoB tirpinti naudojamas organinio tirpiklio suminis kiekis neturėtų būti didesnis kaip 1 % (tūrio); priešingu atveju reikėtų naudoti neapdorotus kontrolinius ėminius, kad būtų galima įsitikinti, ar organinio tirpiklio procentinis kiekis nedaro neigiamo poveikio. Vandeninių tirpiklių (natrio chlorido tirpalo ar vandens) koncentracija galutinėje apdorojimo terpėje neturėtų būti didesnė kaip 10 % (tūrio). Jei naudojami tinkamai neištirti

▼M7

tirpikliai (pvz., etanolis ar acetonas), jų naudojimas turėtų būti pagrįstas duomenimis, kurie rodytų tirpiklio suderinamumą su bandomąja chemine medžiaga bei bandymo sistema ir genetinio toksiškumo nebuvimą, esant naudojamai koncentracijai. Jei tokių patvirtinančių duomenų nėra, svarbu įtraukti neapdorotus kontrolinius ėminius (žr. 1 priedėlį), taip pat tirpiklio kontrolinius ėminius, siekiant įrodyti, kad pasirinktas tirpiklis nėra žalingas ir nesukelia žalingo poveikio chromosomoms (pvz., aneuploidijos ar klastogeniškumo).

CitoB kaip citokinezės blokatoriaus naudojimas

Vienas iš svarbiausių aspektų atliekant MNvit bandymą – užtikrinti, kad skaičiuojamų ląstelių mitozė būtų baigta apdorojimo metu ar po jo. Todėl mikrobranduolių skaičiavimas turėtų apsiriboti ląstelėmis, kuriose mitozė įvyko apdorojimo metu ar po jo. CitoB yra medžiaga, kuri plačiausiai naudojama citokinezei blokuoti, nes slopina aktino susijungimą ir taip neleidžia dukterinėms ląstelėms atsiskirti po mitozės, dėl ko ima formuotis dvibranduolės ląstelės (6) (66) (67). Kai naudojamas citoB, kartu galima matuoti bandomosios cheminės medžiagos įtaką ląstelių proliferacijos kinetikai. CitoB reikėtų naudoti kaip citokinezės blokatorių, kai naudojami žmogaus limfocitai, nes ląstelių ciklo trukmė tarp donorų skirsis ir ne visi limfocitai reaguos į stimuliavimą PHA. CitoB nėra privalomas kitų tipų ląstelėms, jei būtų galima nustatyti, kad jos pasidalijo, kaip aprašyta 27 pastraipoje. Be to, citoB paprastai nenaudojamas, kai ėminių mikrobranduoliai įvertinami taikant tėkmės citometrinius metodus.

Laboratorija turėtų nustatyti reikiamą citoB koncentraciją kiekvieno tipo ląstelėms, kad būtų gautas optimalus dvibranduolių ląstelių dažnumas tirpiklio kontrolinėse kultūrose ir būtų įrodyta, kad gaunama skaičiavimui tinkama dvibranduolių ląstelių išeiga. Tinkama citoB koncentracija paprastai yra 3–6 μg/ml.

Ląstelių proliferacijos bei citotoksiškumo matavimas ir apdorojimo koncentracijos verčių parinkimas

Nustatant didžiausią bandymui naudojamą bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją reikėtų vengti koncentracijos, galinčios sukelti dirbtinį teigiamą atsaką, pvz., kuri sukeltų per didelį citotoksiškumą (žr. 29 pastraipą), nuosėdų kultūros terpėje (žr. 30 pastraipą) ar žymius pH arba osmolialumo pokyčius (žr. 9 pastraipą). Jei bandomosios cheminės medžiagos pridėjimo metu žymiai pakinta terpės pH vertė, ją būtų galima reguliuoti buferuojant galutinio apdorojimo terpę, kad būtų išvengta dirbtinių teigiamų rezultatų ir būtų užtikrintos tinkamos kultūros sąlygos.

Ląstelių proliferacija matuojama siekiant įsitikinti, ar bandymo metu pakankamas paveiktų ląstelių skaičius pasiekė mitozę ir ar apdorojama esant reikiamam citotoksiškumo lygiui (žr. 29 pastraipą). Citotoksiškumą reikėtų nustatyti pagrindinio bandymo metu pagal atitinkamus ląstelių žūties ir augimo rodiklius, esant ir nesant metaboliniam aktyvinimui (žr. 26 ir 27 pastraipas). Nors citotoksiškumo įvertinimas atliekant pradinį parengiamąjį bandymą gali būti naudingas pagrindinio bandymo koncentracijos vertėms geriau apibrėžti, pradinis bandymas nėra privalomas. Jei jis būtų atliekamas, jis neturėtų pakeisti citotoksiškumo matavimo atliekant pagrindinį bandymą.

Ląstelių apdorojimas citoB ir santykinio vienbranduolių, dvibranduolių ir daugiabranduolių ląstelių dažnumo kultūroje matavimas yra tikslus metodas kiekybiškai įvertinant poveikį ląstelių proliferacijai ir apdorojimo citotoksinį ar citostatinį aktyvumą (6) ir juo užtikrinama, kad per mikroskopą būtų skaičiuojamos tik apdorojimo metu ar po jo pasidalijusios ląstelės. Apdorojimo citotoksiniam ar citostatiniam aktyvumui įvertinti, lyginant apdorotų ir kontrolinių

▼M7

kultūrų vertes, rekomenduojamas citokinezės blokavimo proliferacijos indeksas (angl. *cytokinesis-block proliferation index*, CBPI)(6) (27) (68) arba replikacijos indeksas (angl. *Replication Index*, RI), imant ne mažiau kaip 500 ląstelių vienai kultūrai (dėl formulių žr. 2priedėlį). Kitų citotoksiškumo rodiklių (pvz., ląstelių vientisumo, apoptozės, nekrozės, metafazės ląstelių skaičiaus, ląstelės ciklo) vertinimas galėtų suteikti naudingos informacijos, bet jų nereikėtų naudoti vietoj CBPI ar RI.

Atliekant tyrimus be citoB, būtina įrodyti, kad kultūros ląstelės dalijosi taip, kad didžioji skaičiuojamų ląstelių dalis pasidalijo veikimo bandomąja cheminė medžiaga metu arba po jo. Apdorojimo citotoksiniam ar citostatiniam aktyvumui įvertinti rekomenduojamas santykinio populiacijos padvigubėjimo (RPD) ar santykinio ląstelių skaičiaus padidėjimo (RICC) matavimas (17) (68) (69) (70) (71) (dėl formulių žr. 2priedėlį). Jei atliekamas ilgalaikis apdorojimas (t. y. 1,5–2,0 karto ilgesnis nei normalaus ląstelių ciklo trukmė, o surenkama praėjus laikui, dar 1,5–2,0 karto ilgesniam nei normalaus ląstelių ciklo trukmė, iš viso gaunant ėminių ėmimo trukmę 3–4 kartus ilgesnę nei normalaus ląstelių ciklo trukmė, kaip aprašyta 38 ir 39 pastraipose), taikant RPD gali būti gautas per mažas citotoksiškumo įvertis (71). Šiomis aplinkybėmis geresnis matas galėtų būti RICC arba naudingas įvertis galėtų būti ir RPD, citotoksiškumą įvertinant praėjus laikui, kuris būtų 1,5–2 karto ilgesnis nei normalaus ląstelių ciklo trukmė. Kitų citotoksiškumo ar citostazės rodiklių (pvz., ląstelių vientisumo, apoptozės, nekrozės, metafazės ląstelių skaičiaus, proliferacijos indekso (PI), ląstelės ciklo, nukleoplazmos tiltelių ar branduolų užuomazgų) vertinimas galėtų suteikti naudingos informacijos, bet jų nereikėtų naudoti vietoj RPD ar RICC.

Reikėtų įvertinti ne mažiau kaip tris bandymo koncentracijos vertes (neįskaitant tirpiklio ir teigiamus kontrolinius ėminius), kurios atitinka priimtinumo kriterijus (reikiamas citotoksiškumas, ląstelių skaičius ir kt.). Neatsižvelgiant į ląstelių tipą (ląstelių linijos ar pirminės limfocitų kultūros), galima naudoti kiekvienos bandymo koncentracijos kartotines ar pavienes apdorotas kultūras. Nors patariama naudoti kartotines kultūras, pavienės kultūros taip pat priimtinos, jei vertinamas vienodas suminis pavienės ar kartotinės kultūros ląstelių skaičius. Naudoti pavienę kultūrą ypač tinka, kai vertinamos daugiau kaip 3 koncentracijos vertės (žr. 44–45 pastraipas). Nepriklausomoms kartotinėms kultūroms gauti tam tikros koncentracijos rezultatai gali būti subendrinti duomenų analizei (38). Jei bandomoji cheminė medžiaga rodo mažą citotoksiškumą arba jo visai nėra, paprastai tiktų maždaug nuo 2 iki 3 kartų besiskiriančios koncentracijos intervalai. Jei citotoksiškumas nustatomas, pasirinktos koncentracijos vertės turėtų aprėpti intervalą nuo koncentracijos, kuriai citotoksiškumas pasireiškia, kaip aprašyta 29 pastraipoje, įtraukiant koncentracijos vertes, kurioms gaunamas vidutinis citotoksiškumas ar jo visai nėra. Daugelio bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos atsako kreivės kyla staigiai, todėl norint gauti mažo arba vidutinio citotoksiškumo duomenis arba išsamiai ištirti dozės ir atsako santykį, būtina naudoti arčiau išdėstytas ir (arba) daugiau kaip tris koncentracijos vertes (pavienių ar kartotinių kultūrų), ypač tomis aplinkybėmis, kai reikia atlikti kartotinį bandymą (žr. 60 pastraipą).

Jei maksimali koncentracija pagrįsta citotoksiškumu, didžiausiai koncentracijai reikėtų pasiekti 55 ± 5 % citotoksiškumą, taikant rekomenduotus citotoksiškumo parametrus (t. y. ląstelių linijų RICC bei RPD sumažėjimą, kai citoB nenaudojamas, ir CBPI ar RI sumažėjimą iki 45 ± 5 % vienalaikio neigiamo kontrolinio ėminio, kai citoB yra naudojamas) (72). Reikėtų atsargiai aiškinti teigiamus rezultatus, kurie būtų gauti tik viršutiniam šio 55 ± 5 % citotoksiškumo intervalo galui (71).

▼M7

Jei mažai tirpios bandomosios cheminės medžiagos nėra citotoksiškos, kai koncentracija yra mažesnė nei mažiausia netirpumo koncentracija, veikimo bandomąja chemine medžiaga pabaigoje, esant didžiausiai analizuojamai koncentracijai, turėtų atsirasti drumstumas arba nuosėdos, matomos plika akimi arba per inversinį mikroskopą. Netgi jei citotoksiškumas pasireiškia, kai koncentracija yra didesnė nei mažiausia netirpumo koncentracija, patartina bandyti tik esant vienai drumstumą ar matomas nuosėdas sukeliančiai koncentracijai, nes nuosėdos gali daryti dirbtinį poveikį. Esant koncentracijai, kurioje susidaro nuosėdos, reikėtų imtis priemonių užtikrinti, kad nuosėdos netrukdytų atlikti bandymą (pvz., dažymą ar įvertinimą). Gali padėti tirpumo nustatymas kultūros terpėje prieš atliekant bandymą.

Jei nuosėdų ar ribinio citotoksiškumo nestebima, didžiausia bandymo koncentracija turėtų atitikti 10 mmol/l, 2 mg/ml ar 2 μl/ml, pasirenkant mažiausią (73) (74) (75). Jei bandomoji cheminė medžiaga yra neapibrėžtos sudėties, pvz., nežinomos ar kintamos sudėties medžiaga, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos (UVCB) (76), iš aplinkos ekstrahuojamas ėminys ir kt., nesant pakankamam citotoksiškumui, gali prireikti didesnės didžiausios koncentracijos (pvz., 5 mg/ml), kad būtų didesnė kiekvieno iš komponentų koncentracija. Reikėtų pažymėti, kad žmonėms skirtiems vaistiniams preparatams šie reikalavimai gali skirtis (93).

Kontroliniai ėminiai

Kiekvieną kartą surenkant kultūrą, reikėtų įtraukti vienalaikius neigiamus kontrolinius ėminius (žr. 21 pastraipą), sudarytus vien tik iš tirpiklio apdorojimo terpėje ir apdorotus taip pat, kaip apdorojamos kultūros.

Vienalaikiai teigiami kontroliniai ėminiai yra būtini siekiant įrodyti laboratorijos gebėjimą naudojamo bandymų protokolo sąlygomis identifikuoti klastogenus bei aneugenus ir egzogeninės metabolinio aktyvinimo sistemos efektyvumą (jei taikoma). Teigiamų kontrolinių ėminių pavyzdžiai pateikiami toliau 1 lentelėje. Galima naudoti alternatyvias teigiamas kontrolines chemines medžiagas, jei tai būtų pagrįsta.

Šiuo metu nežinoma jokių aneugenų, kurių genotoksiniam aktyvumui būtinas metabolinis aktyvinimas (17). Kadangi genetinio toksiškumo žinduolių ląstelėms bandymai *in vitro* yra pakankamai standartizuoti, esant trumplaikiam apdorojimui, atliekamam vienu metu su metaboliniu aktyvinimu ar be jo, naudojant vienodą apdorojimo trukmę, teigiamų kontrolinių ėminių naudojimas gali apsiriboti klastogenu, kuriam būtinas metabolinis aktyvinimas. Šiuo atveju vieno klastogeninio teigiamo kontrolinio ėminio atsakas įrodys metabolinio aktyvinimo sistemos aktyvumą ir bandymo sistemos jautrį. Tačiau ilgalaikiam apdorojimui (be S9) reikėtų turėti savo teigiamą kontrolinį ėminį, nes apdorojimo trukmė skirsis nuo metabolinį aktyvinimą naudojančio bandymo trukmės. Jei atliekant trumpalaikį apdorojimą su metaboliniu aktyvinimu ar be jo, kaip vienas teigiamas kontrolinis ėminys pasirenkamas klastogenas, tai atliekant ilgalaikį apdorojimą be metabolinio aktyvinimo reikėtų pasirinkti aneugeną. Reikėtų naudoti teigiamus kontrolinius ėminius su klastogenu ir aneugenu, jei ląstelės yra metaboliškai pajėgios ir joms nereikia S9.

Kiekvienas teigiamas kontrolinis ėminys turėtų būti naudojamas vienos arba kelių koncentracijos verčių, kurioms esant būtų galima tikėtis gauti atkuriamą ir aptinkamą didesnį nei fonas atsaką, kad būtų galima įrodyti bandymo sistemos jautrį (t. y. poveikis yra aiškus, bet tyrėjui ne iš karto atskleidžiama užkoduotų objektinių stiklelių tapatybė), ir atsako neturėtų sutrikdyti citotoksiškumas, kuris viršytų šiam bandymo metodui nustatytas ribas.

▼M7

1 lentelė

Etaloninės cheminės medžiagos, rekomenduojamos laboratorijos kvalifikacijai vertinti ir teigiamiems kontroliniams ėminiams pasirinkti

Kategorija	Cheminė medžiaga	CAS Nr.
1. **Klastogenai, aktyvūs be metabolinio aktyvinimo**		
	Metilmetansulfonatas	66-27-3
	Mitomicinas C	50-07-7
	4-nitrochinolin-N-oksidas	56-57-5
	Citozino arabinozidas	147-94-4
2. **Klastogenai, kuriems reikia metabolinio aktyvinimo**		
	Benz(a)pirenas	50-32-8
	Ciklofosfamidas	50-18-0
3. **Aneugenai**		
	Kolchicinas	64-86-8
	Vinblastinas	143-67-9

PROCEDŪRA

Apdorojimo planas

Siekiant padidinti tikimybę aptikti aneugeną ar klastogeną, veikiantį tam tikroje ląstelės ciklo stadijoje, svarbu, kad bandomąja chemine medžiaga būtų apdorotas pakankamas skaičius ląstelių, reprezentuojančių visas įvairias ląstelių ciklo stadijas. Kiekvienas apdorojimas turėtų prasidėti ir baigtis ląstelėms augant eksponentiškai ir ląstelės turėtų augti iki ėminio ėmimo pradžios. Todėl ląstelių linijų ir pirminių ląstelių kultūrų apdorojimo planas gali kažkiek skirtis nuo taikomo limfocitams, kurių ląstelių ciklui pradėti būtinas mitogeninis stimuliavimas (17). Jei tai limfocitai, veiksmingiausias metodas yra pradėti veikti bandomąja chemine medžiaga praėjus 44–48 h nuo stimuliavimo PHA, kai ląstelės toliau dalysis nesinchroniškai (6).

Paskelbti duomenys (19) rodo, kad dauguma aneugenų ir klastogenų bus aptikti per trumpą 3–6 h apdorojimo laikotarpį esant ir nesant S9, vėliau bandomoji cheminė medžiaga pašalinama ir ėminiai imami nuo apdorojimo pradžios praėjus laikui, kuris būtų maždaug 1,5–2,0 kartus ilgesnis nei normalaus ląstelių ciklo trukmė (7).

Tačiau siekiant atlikti išsamų įvertinimą, kurio prireiktų neigiamam rezultatui patvirtinti, visos šios trys Bandymo sąlygos turėtų būti įgyvendintos, taikant trumpalaikį apdorojimą su metaboliniu aktyvinimu ir be jo bei ilgalaikį apdorojimą be metabolinio aktyvinimo (žr. 56, 57 ir 58 pastraipas):

— ląstelės turėtų būti veikiamos bandomąja chemine medžiaga be metabolinio aktyvinimo 3–6 h ir surenkamos nuo apdorojimo pradžios praėjus laikui, kuris būtų maždaug 1,5–2,0 kartus ilgesnis nei normalaus ląstelių ciklo trukmė (19),

— ląstelės turėtų būti veikiamos bandomąja chemine medžiaga esant metaboliniam aktyvinimui 3–6 h ir surenkamos nuo apdorojimo pradžios praėjus laikui, kuris būtų maždaug 1,5–2,0 kartus ilgesnis nei normalaus ląstelių ciklo trukmė (19),

▼M7

— ląstelės turėtų būti nuolat veikiamos be metabolinio aktyvinimo tol, kol bus surenkamos praėjus laikui, kuris būtų maždaug 1,5–2,0 kartus ilgesnis nei normalaus ląstelių ciklo trukmė.

Jei esant kuriai nors vienai iš pirmiau nurodytų bandymo sąlygų gaunamas teigiamas atsakas, gali būti nebūtina tirti kurią nors kitą apdorojimo schemą.

Jei žinoma ar yra įtarimų, kad bandomoji cheminė medžiaga daro įtaką ląstelių ciklo trukmei (pvz., kai bandomi nukleozidų analogai), ypač p53 kompetentinėms ląstelėms (35) (36) (77), papildomas ėminių ėmimo arba regeneravimo laikas galėtų būti dar 1,5–2,0 kartus ilgesnis nei normalaus ląstelių ciklo trukmė (t. y. laikas nuo trumpalaikio ir ilgalaikio apdorojimo pradžios iš viso būtų 3,0–4,0 kartus ilgesnis nei ląstelių ciklo trukmė). Šios pasirinktys skirtos situacijoms, kai gali kilti susirūpinimas dėl galimos bandomosios cheminės medžiagos ir citoB sąveikos. Jei taikoma ilgesnė ėminių ėmimo trukmė (t. y. laikas iš viso būtų 3,0–4,0 kartus ilgesnis nei kultūros ląstelių ciklo trukmė), reikėtų imtis priemonių užtikrinti, kad vis dar vyktų aktyvus ląstelių dalijimasis. Pvz., limfocitų eksponentinis augimas gali pradėti mažėti praėjus 96 h nuo stimuliavimo ir vienasluoksnės ląstelių kultūros gali susilieti.

Siūlomi ląstelių apdorojimo planai pateikti 2 lentelėje. Šie bendrieji apdorojimo planai gali būti keičiami (ir turėtų būti pagrįsti), atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos stabilumą ar reaktyvumą ar tam tikras naudojamų ląstelių augimo charakteristikas.

2 lentelė

MNvit tyrimo ląstelių apdorojimo ir surinkimo trukmė

Limfocitai, pagrindinės ląstelės ir ląstelių linijos, apdorotos citoB	Trumpalaikis apdorojimas esant S9	Apdorojama 3–6 h esant S9; pašalinama S9 ir apdorojimo terpė; įpilama naujos terpės ir citoB; surenkama nuo apdorojimo pradžios praėjus laikui, kuris būtų 1,5–2,0 kartus ilgesnis nei normalaus ląstelių ciklo trukmė.
	Trumpalaikis apdorojimas nesant S9	Apdorojama 3–6 h; pašalinama apdorojimo terpė; įpilama naujos terpės ir citoB; surenkama nuo apdorojimo pradžios praėjus laikui, kuris būtų 1,5–2,0 kartus ilgesnis nei normalaus ląstelių ciklo trukmė.
	Ilgalaikis apdorojimas nesant S9	Apdorojama 1,5 – 2 kartus ilgiau nei normalaus ląstelių ciklo trukmė, esant citoB; surenkama pasibaigus apdorojimo laikotarpiui.
Ląstelių linijos, apdorotos nenaudojant citoB (Apdorojama pagal pirmiau pateiktus apdorojimo planus, išskyrus tai, kad nededama citoB)		

Vienasluoksnių kultūrų 3–6 h trukmės apdorojimo pabaigoje gali būti mitozinių ląstelių (atpažįstamų iš apvalios formos ir atsiskyrimo nuo paviršiaus). Kadangi šios mitozinės ląstelės lengvai atsiskiria, jos gali būti prarastos šalinant terpę su bandomąja chemine medžiaga. Jei yra įrodymų dėl esminio mitozinių ląstelių skaičiaus padidėjimo palyginti su kontroliniais ėminiais, rodančio galimą ląstelių susilaikymą mitozės metu, jas reikėtų surinkti centrifugavimu ir surinkimo metu grąžinti į kultūrą, kad nebūtų prarastos mitozės ląstelės, kurioms kyla mikrobranduolių susidarymo ar chromosomų aberacijos rizika.

▼M7

Ląstelių surinkimas ir preparatų ant objektinių stiklelių paruošimas

Kiekviena kultūra turėtų būti surenkama ir apdorojama atskirai. Ruošiamos ląstelės gali būti apdorojamos hipotoniniu tirpalu, tačiau šis veiksmas nebūtinas, jei ląsteles galima tinkamai paskleisti kitu būdu. Objektinius stiklelius galima paruošti įvairiais būdais, jei skaičiavimui gaunami aukštos kokybės ląstelių preparatai. Ląstelės su nepaliesta ląstelių membrana ir citoplazma turėtų būti išsaugotos, kad būtų galima aptikti mikrobranduolius ir citokinezės blokavimo metodu patikimai nustatyti dvibranduoles ląsteles.

Preparatai ant objektinio stiklelio gali būti dažomi įvairiais metodais, pvz., Giemsa arba DNR specifiniais dažikliais. Naudojant tinkamus fluorescencinius dažus (pvz., akridino oranžinį (78) ar Hoechst 33258 ir pironiną Y (79)), galima pašalinti kai kuriuos artefaktus, susijusius su DNR nespecifinių dažų naudojimu. Mikrobranduolių turiniui nustatyti gali būti naudojami antikinetochoro antikūnai FISH analizė ir pancentromeriniai DNR zondai arba *in situ* ženklinimas pancentromerų specifiniais užpildais kartu su atitinkamu DNR priešpriešiniu dažymu (nusidažo sveika chromosoma, bet ne acentriniai chromosomų fragmentai), jei domina informacija apie mikrobranduolių susidarymo mechanizmą (16) (17). Gali būti taikomi kiti metodai klastogenams ir aneugenams atskirti, jei jie pasirodytų efektyvūs ir būtų patvirtintas jų tinkamumas. Pvz., tam tikrų ląstelių linijų hipodiploidinių ląstelių branduolių kaip hipodiploidinių reiškinių matavimas taikant, pvz., vaizdo analizės, lazerinės skenuojančios citometrijos ar tėkmės citometrijos metodus, taip pat galėtų suteikti naudingos informacijos (80) (81) (82). Morfologiniai branduolių stebėjimai taip pat galėtų rodyti galimą aneuploidiją. Be to, metafazės chromosomų aberacijų bandymas, pageidautina to paties ląstelių tipo ir taikant palyginamojo jautrio protokolą, taip pat galėtų būti patogus būdas nustatyti, ar mikrobranduoliai susidaro dėl chromosomų trūkimo (žinant, kad chromosomų praradimas nebūtų aptiktas atliekant chromosomų aberacijų bandymą).

Analizė

Prieš atliekant mikrobranduolių dažnumo mikroskopinę analizę, visi objektiniai stikleliai turėtų būti nepriklausomai užkoduoti, įskaitant tirpiklio, neapdorotų ėminių (jei naudojami) ir teigiamų kontrolinių ėminių stiklelius. Reikėtų taikyti atitinkamus metodus, kad būtų galima kontroliuoti sistemingąsias paklaidas ar poslinkį, kai naudojamos automatizuotos skaičiavimo sistemos, pvz., tėkmės citometrijos, lazerinės skenuojančios citometrijos ar vaizdo analizės sistemos. Neatsižvelgiant į mikrobranduoliams skaičiuoti naudojamą automatizuotą sistemą, tuo pačiu metu reikėtų įvertinti CBPI, RI, RPD ar RICC.

CitoB apdorotose kultūrose mikrobranduolių dažnumą reikėtų analizuoti bent 2 000 dvibranduolių ląstelių kiekvienai koncentracijai ir kontroliniam ėminiui (83), vienodai padalytų tarp kartotinių ėminių, jei jie naudojami Jei dozei naudojama po vieną kultūrą (žr. 28 pastraipą), reikėtų suskaičiuoti ne mažiau kaip 2 000 dvibranduolių šios pavienės kultūros ląstelių (83). Jei vienai (kartotinių kultūrų) kultūrai būtų suskaičiuota gerokai mažiau kaip po 1 000 dvibranduolių ląstelių arba mažiau kaip 2 000 ląstelių (pavienei kultūrai), o reikšmingo mikrobranduolių skaičiaus padidėjimo nebūtų aptikta, bandymą reikėtų pakartoti naudojant daugiau ląstelių arba mažiau citotoksinę koncentraciją, jei tai būtų tinkamiau. Reikia imtis atsargumo priemonių, kad nebūtų skaičiuojamos netaisyklingos formos arba labai nevienodo dydžio branduolių dvibranduolės ląstelės. Be to, dvibranduolių ląstelių nereikia painioti su blogai pasklidusiomis daugiabranduolėmis ląstelėmis. Ląstelės, kuriose yra daugiau kaip du pagrindiniai branduoliai, neturi būti analizuojamos dėl mikrobranduolių, nes šių ląstelių mikrobranduolių dažnumo atskaitos vertė gali būti didesnė (84). Skaičiuoti vienbranduoles ląsteles galima, jei yra įrodyta, kad bandomoji cheminė medžiaga

▼M7

veikia citoB aktyvumą. Tokiais atvejais galėtų būti naudingas kartotinis bandymas be citoB. Be dvibranduolių ląstelių skaičiaus naudingos informacijos galėtų suteikti vienbranduolių ląstelių skaičius (85) (86), bet jis nėra privalomas.

CitoB neapdorotų ląstelių linijų mikrobranduolių dažnumą reikėtų analizuoti bent 2 000 ląstelių kiekvienai koncentracijai ir kontroliniam ėminiui (83), vienodai padalytų tarp kartotinių ėminių, jei jie naudojami. Jei koncentracijai naudojama po vieną kultūrą (žr. 28 pastraipą), reikėtų suskaičiuoti ne mažiau kaip 2 000 šios pavienės kultūros ląstelių (83). Jei kiekvienos koncentracijos vienai (kartotinių kultūrų) kultūrai būtų suskaičiuota gerokai mažiau kaip po 1 000 ląstelių arba mažiau kaip 2 000 ląstelių (pavienei kultūrai), o reikšmingo mikrobranduolių skaičiaus padidėjimo nebūtų aptikta, bandymą reikėtų pakartoti naudojant daugiau ląstelių arba mažiau citotoksinę koncentraciją, jei tai būtų tinkamiau.

Kai naudojamas citoB, reikėtų nustatyti CBPI arba RI ląstelių proliferacijai įvertinti (žr. 2 priedėlį), naudojant ne mažiau kaip 500 ląstelių vienai kultūrai. Jei apdorojama nesant citoB, svarbu pateikti įrodymą, kad kultūros ląstelės dalijosi, kaip aptarta 24–28 skirsniuose.

Laboratorijos kvalifikacija

Siekdama įgyti pakankamos bandymo atlikimo patirties prieš jį taikydama įprastiniams tyrimams, laboratorija turėtų būti atlikusi etaloninių teigiamų cheminių medžiagų bandymų seriją, joms veikiant pagal skirtingus mechanizmus (bent vieną su metaboliniu aktyvinimu, vieną – be jo ir vieną, kuri veiktų pagal aneugeninį mechanizmą, medžiagas pasirenkant iš 1 lentelės sąrašo) su įvairiais neigiamais kontroliniais ėminiais (įskaitant neapdorotas kultūras ir įvairius tirpiklius ar nešiklį). Šių teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių atsakas turėtų atitikti literatūros duomenis. Tai netaikoma patirties turinčioms laboratorijoms, t. y. kurios turi istorinių duomenų bazę, prieinamą kaip apibrėžta 49–52 pastraipose.

Teigiamų kontrolinių cheminių medžiagų rinkinį (žr. 1 lentelę) reikėtų tirti atliekant trumpalaikį ir ilgalaikį apdorojimą be metabolinio aktyvinimo, taip pat trumpalaikį apdorojimą esant metaboliniam aktyvinimui, kad būtų galima įrodyti kvalifikaciją aptikti klastogenines ir aneugenines chemines medžiagas, nustatyti metabolinio aktyvinimo sistemos efektyvumą ir įrodyti skaičiavimo procedūrų (vizualios mikroskopinės analizės, tėkmės citometrijos, lazerinės skenuojančios citometrijos ar vaizdo analizės) tinkamumą. Pasirinktų cheminių medžiagų koncentracijos verčių intervalas turėtų būti pasirinktas taip, kad, siekiant įrodyti bandymo sistemos jautrį ir dinaminį diapazoną, būtų gautas atkuriamas ir su koncentracija susijęs padidėjimas palyginti su fonu.

Istorinių kontrolinių ėminių duomenys

Laboratorija turėtų nustatyti:

— istorinių teigiamų kontrolinių ėminių intervalą ir pasiskirstymą,

— istorinių neigiamų kontrolinių ėminių (neapdorotų, tirpiklio) intervalą ir pasiskirstymą.

Pirmą kartą gaunant duomenis, skirtus istorinių neigiamų kontrolinių ėminių pasiskirstymui, vienalaikiai neigiami kontroliniai ėminiai turėtų atitikti paskelbtus kontrolinius duomenis, jei jie yra. Kontrolinių ėminių pasiskirstymą papildant vis didesniu bandymų duomenų kiekiu, būtų gerai, kad vienalaikiai neigiami kontroliniai ėminiai patektų į to skirstinio 95 % kontrolines ribas (87) (88). Laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazę iš pradžių turėtų sudaryti ne mažiau kaip 10 bandymų, bet būtų geriau, jei tokių palyginamosiomis Bandymo sąlygomis atliktų bandymų skaičius būtų ne mažesnis kaip 20. Laboratorijos turėtų taikyti kokybės kontrolės metodus, tokius kaip kontrolinės diagramos (pvz., C tipo ar X juostinės diagramos (88)), kad galėtų nustatyti savo teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių duomenų kintamumą ir įrodyti

▼M7

metodikos „valdomumą“ savo laboratorijoje (83). Papildomas rekomendacijas, kaip kurti ir naudoti istorinius duomenis (t. y. duomenų įtraukimo ir pašalinimo iš istorinių duomenų kriterijus ir tam tikro bandymo priimtinumo kriterijus) galima rasti literatūroje (87).

Į visus bandymų protokolo pakeitimus reikėtų žiūrėti atsižvelgiant į duomenų suderinamumą su esamomis laboratorijos istorinių kontrolinių ėminių duomenų bazėmis. Esant didesnėms neatitiktims turėtų būti kuriama nauja istorinių kontrolinių ėminių duomenų bazė.

Neigiamų kontrolinių ėminių duomenis turėtų sudaryti pavienės kultūros ląstelių mikrobranduolių dažnumo skaičius arba kartotinių kultūrų skaičių suma, kaip aprašyta 28 pastraipoje. Būtų gerai, kad vienalaikiai neigiami kontroliniai ėminiai patektų į laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazės skirstinio 95 % kontrolines ribas (87) (88). Jei vienalaikių neigiamų kontrolinių ėminių duomenys nepatenka į 95 % kontrolines ribas, jie gali būti tinkami įtraukti į istorinių kontrolinių ėminių skirstinį, jei nėra kraštiniai riktai ir yra įrodymų, kad bandymo sistema „valdoma“ (žr. 50 pastraipą) ir kad nėra techninių ar žmogaus klaidų.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų pateikimas

Jei taikomas citokinezės blokavimo metodas, vertinant mikrobranduolių indukciją naudojamas tik dvibranduolių ląstelių su mikrobranduoliais (nepriklausomai nuo mikrobranduolių skaičiaus ląstelėje) dažnumas. Naudingos informacijos galėtų suteikti ląstelių su vienu, dviem ar keliais mikrobranduoliais skaičiai ir jų pateikimas atskirai ataskaitoje, bet tai neprivaloma.

Turėtų būti nustatyti visų apdorotų, neigiamų ir teigiamų kontrolinių ėminių citotoksiškumo ir (arba) citostazės vienalaikių matavimų duomenys (16). Visų apdorotų ir kontrolinių kultūrų CBPI arba RI turi būti apskaičiuoti kaip ląstelių ciklo delsos matavimų duomenys, kai taikomas citokinezės blokavimo metodas. Jei apdorojama be citoB, reikėtų taikyti RPD arba RICC ar PI (žr. 2 priedėlį).

Turėtų būti pateikti atskiri kiekvienos kultūros duomenys. Be to, visi duomenys turi būti suvesti į lenteles.

Priimtinumo kriterijai

Bandymo priimtinumas pagrįstas šiais kriterijais:

— laikoma, kad vienalaikis neigiamas kontrolinis ėminys gali būti įtrauktas į laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazę, kaip aprašyta 50 pastraipoje;

— vienalaikiai teigiami kontroliniai ėminiai (žr. 50 pastraipą) turėtų sukelti atsakus, kurie yra suderinami su rastais laboratorijos istorinių teigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazėje, ir duoti statistiškai reikšmingą padidėjimą palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu;

— turėtų atitikti ląstelių proliferacijos tirpiklio kontroliniame ėminyje kriterijus (25–27 pastraipos);

— bandoma esant visoms Bandymo sąlygoms, nebent vienai iš jų gaunami teigiami rezultatai (žr. 36–40 pastraipas);

— analizuojamas pakankamas ląstelių ir koncentracijos verčių skaičius (28 ir 44–46 pastraipos).

▼M7

— didžiausios koncentracijos pasirinkimo kriterijai atitinka aprašytus 24–31 pastraipose.

Rezultatų įvertinimas ir aiškinimas

Kai įvykdyti visi priimtinumo kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai teigiama, jei esant kuriai nors ištirtai bandymo sąlygai (žr. 36–39 pastraipas):

— bent vienai bandymo koncentracijai gaunamas statistiškai reikšmingas padidėjimas palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu (89);

— padidėjimas yra susijęs su doze esant bent vienai iš bandymo sąlygų, kai įvertinama pagal atitinkamą tendencijos kriterijų (žr. 28 pastraipą);

— kuris nors iš rezultatų yra už istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų skirstinio ribų (pvz., Puasono skirstinio 95 % kontrolinių ribų; žr. 52 pastraipą).

Kai įvykdyti visi šie kriterijai, laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga gali sukelti šios bandymų sistemos chromosomų trūkius ir (arba) skaičiaus padidėjimą ar sumažėjimą. Rekomendacijų dėl tinkamiausių statistinių metodų taip pat galima rasti literatūroje (90) (91) (92).

Kai įvykdyti visi priimtinumo kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai neigiama, jei visomis ištirtomis bandymo sąlygomis (žr. 36–39 pastraipas):

— jokiai bandymo koncentracijai negaunamas statistiškai reikšmingas padidėjimas palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu,

— nėra su koncentracija susijusio padidėjimo, kai įvertinama pagal atitinkamą tendencijos kriterijų,

— visi rezultatai patenka tarp istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų skirstinio ribų (pvz., Puasono skirstinio 95 % kontrolinių ribų; žr. 52 pastraipą).

Laikoma, kad ši bandomoji cheminė medžiaga negali sukelti šios bandymų sistemos chromosomų trūkių ir (arba) skaičiaus padidėjimo ar sumažėjimo. Rekomendacijų dėl tinkamiausių statistinių metodų taip pat galima rasti literatūroje (90) (91) (92).

Nėra reikalavimo patikrinti aiškų teigiamą ar neigiamą atsaką.

Jei atsakas nėra aiškiai neigiamas ar aiškiai teigiamas, kaip apibūdinta pirmiau, ir (arba) siekiant padėti nustatyti rezultato biologinę svarbą, duomenys turėtų būti įvertinti pateikiant ekspertų nuomonę ir (arba) atliekant papildomus tyrimus. Galėtų būti naudingas papildomų ląstelių skaičiavimas (jei tinka) arba kartotinis bandymas galbūt modifikuotomis bandymo sąlygomis (pvz., tarpai tarp koncentracijos verčių, kitos metabolinio aktyvinimo sąlygos (t. y. S9 koncentracija ar S9 kilmė)).

Retais atvejais, netgi atlikus papildomus tyrimus, gautų duomenų rinkinio nepakaks padaryti išvadą, ar rezultatai teigiami ar neigiami, todėl bus priimtas sprendimas, kad atsakas yra dviprasmis.

Bandomosios cheminės medžiagos, kurios atliekant MNvit bandymą indukuoja mikrobranduolius, tai gali daryti todėl, kad sukelia chromosomų trūkimą, netekimą arba abiejų veiksnių derinį. Siekiant nustatyti, ar mikrobranduolių indukcijos mechanizmas yra klastogeninio ir (arba) aneugeninio aktyvumo rezultatas, gali būti atliekama papildoma analizė naudojant antikinetochoro antikūnus, centromeroms skirtus *in situ* zondus ar taikant kitus metodus.

▼M7

Bandymo ataskaita

Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— šaltinis, partijos numeris, galiojimo pabaigos data, jei yra;

— pačios bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, jei žinomas;

— bandomųjų cheminių medžiagų reaktyvumas tirpiklio ar nešiklio arba ląstelių kultūros terpės atžvilgiu.

— bandomosios cheminės medžiagos tirpumas tirpiklyje ir stabilumas, jei žinomas;

— pH, osmolialumo ir nuosėdų matavimas kultūros terpėje, į kurią bandomoji cheminė medžiaga buvo pridėta, jei reikia.

Vienkomponentė medžiaga:

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;

— cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

— kiek įmanoma išsamesnis sudedamųjų dalių cheminis pavadinimas (žr. pirmiau), kiekybinis paplitimas ir būdingos fizikinės ir cheminės savybės.

Tirpiklis:

— tirpiklio pasirinkimo pagrindimas;

— tirpiklio galutinėje kultūros terpėje procentinė dalis.

Ląstelės:

— naudojamų ląstelių tipas ir šaltinis,

— naudojamo ląstelių tipo tinkamumas;

— ar nėra mikoplazmos, jei naudojamos ląstelių linijos;

— informacija apie ląstelių ciklo trukmę ar proliferacijos indeksą, jei naudojamos ląstelių linijos;

— jei naudojami limfocitai, kraujo donorų lytis, amžius ir visa tinkama informacija apie donorą, visas kraujas ar atskirti limfocitai, naudotas mitogenas;

— normalaus ląstelių ciklo (neigiamo kontrolinio ėminio) trukmė;

— ląstelių sėjimų skaičius, jei žinomas, kai naudojamos ląstelių linijos;

— ląstelių kultūros priežiūros metodai, jei naudojamos ląstelių linijos;

— modalinis chromosomų skaičius, jei naudojamos ląstelių linijos.

▼M7

Bandymo sąlygos

— citokinezės blokavimo medžiagos (pvz., citoB) identifikavimo duomenys, jei naudojama, jos koncentracija ir ląstelių veikimo trukmė;

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, išreikšta kaip galutinė koncentracija kultūros terpėje (pvz., μg ar mg/ml ar mmol/l kultūros terpės);

— koncentracijos verčių ir kultūrų skaičiaus parinkimo pagrindimas, įskaitant citotoksiškumo duomenis ir tirpumo apribojimus;

— terpių sudėtis, CO_2 koncentracija, jei tinka, drėgmės lygis;

— tirpiklio ir bandomosios cheminės medžiagos, pridėtos į kultūros terpę, koncentracija (ir (arba) tūris);

— inkubavimo temperatūra ir trukmė,

— apdorojimo trukmė;

— surinkimo laikas po apdorojimo,

— ląstelių tankis sėjimo metu, jei tinka;

— metabolinio aktyvinimo sistemos tipas ir sudėtis (S9 šaltinis, S9 mišinio paruošimo metodas, S9 mišinio ir S9 galutinėje kultūros terpėje koncentracija ar tūris, S9 kokybės kontrolės ėminiai (pvz., fermentinis aktyvumas, sterilumas, metabolinė geba));

— teigiamos ir neigiamos kontrolinės cheminės medžiagos, galutinės koncentracijos vertės, apdorojimo sąlygos bei trukmė ir regeneravimo laikotarpio trukmė;

— objektinių stiklelių ruošimo metodai ir taikytas dažymo būdas;

— ląstelių su mikrobranduoliais skaičiavimo kriterijai (analizei tinkamų ląstelių atranka ir mikrobranduolių nustatymas);

— tirtų ląstelių skaičius,

— citotoksiškumo matavimo metodai,

— visa papildoma informacija, susijusi su citotoksiškumu ir taikomu metodu;

— tyrimų vertinimo kaip teigiami, neigiami arba dviprasmiai kriterijai,

— taikytas (-i) statistinės analizės metodas (-ai),

— metodai, pvz., antikinetochoro antikūnų, ar specifinių pancentromerų zondų naudojimas, kad būtų galima apibūdinti, ar mikrobranduoliai turi ištisas chromosomas ar jų fragmentus, jei taikoma.

— pH, osmolialumo ir nusėdimo nustatymo metodai.

Rezultatai:

— analizei priimtinų ląstelių apibrėžtis,

— kiekvienos kultūros apdorotų ląstelių, nenaudojant citoB, skaičius ir surinktų ląstelių skaičius, kai naudojamos ląstelių linijos;

▼M7

— naudotas citotoksiškumo matas, pvz., CBPI ar RI, jei taikomas citokinezės blokavimo metodas; RICC ar RPD, kai šis metodas netaikomas; kiti pastebėjimai, jei yra (pvz., ląstelių susiliejimas, apoptozė, nekrozė, metafazės ląstelių skaičius, dvibranduolių ląstelių dažnumas);

— nusėdimo požymiai ir nustatymo laikas;

— apdorojamos terpės pH ir osmolialumo duomenys, jei nustatyti,

— vienbranduolių, dvibranduolių ir daugiabranduolių ląstelių pasiskirstymas, jei taikomas citokinezės blokavimo metodas;

— atskirai kiekvienos apdorotos ir kontrolinės kultūros ląstelių su mikrobranduoliais skaičius, nurodant, ar jie yra dvibranduolių ar vienbranduolių ląstelių, jei tinka;

— koncentracijos ir atsako priklausomybė, jei įmanoma,

— vienalaikio neigiamo (tirpiklio) ir teigiamo kontrolinio ėminio duomenys (koncentracijos vertės ir tirpikliai);

— istorinių neigiamų (tirpiklio) ir teigiamų kontrolinių ėminių duomenys, intervalai, vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai bei skirstinio 95 % kontrolinės ribos, taip pat duomenų skaičius;

— statistinė analizė, p vertės, jei yra.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

LITERATŪRA

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 1-4.

(3) Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 3-15.

(4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios,* Vol. 43/172-173, pp. 233-246.

(5) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 167-172.

(6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols,* Vol. 2/5, pp. 1084-1104.

(7) Fenech, M., A.A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research,* Vol. 161/2, pp. 193-198.

(8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 13/1, pp. 34-43.

▼M7

(9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research,* Vol. 234/5, pp. 9-20.

(10) Miller, B.M. *et al*. (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis,* Vol. 6/4, pp. 297-302.

(11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis,* Vol. 8/4, pp. 329-334.

(12) Migliore, L. *et al*. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research,* Vol. 319/3, pp. 205-213.

(13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by anti-kinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis,* Vol. 8/6, pp. 519-525.

(14) Eastmond, D.A, D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research,* Vol. 322/1, pp. 9-20.

(15) Marshall, R.R. *et al*. (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research,* Vol. 372/2, pp. 233-245.

(16) Zijno, P. *et al*. (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 372/2, 211-219.

(17) Kirsch-Volders *et al*. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research,* Vol. 540/2, pp. 153-163.

(18) Šio priedo B.10 skyrius. *Žinduolių chromosomų aberacijų bandymas* in vitro.

(19) Lorge, E. *et al*. (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 13-36.

(20) Clare, G. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 37-60.

(21) Aardema, M.J. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 61-87.

(22) Wakata, A. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 88-124.

(23) Oliver, J. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 125-152.

(24) Albertini, S. *et al*. (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 187-208.

(25) Miller, B. *et al*. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 45-59.

▼M7

(26) Miller, B. *et al*. (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research,* Vol. 410, pp. 81-116.

(27) Kalweit, S. *et al*. (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Research,* Vol. 439/2, pp. 183-190.

(28) Kersten, B. *et al*. (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research,* Vol. 445/1, pp. 55-71.

(29) von der Hude, W. *et al*. (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Res*earch, Vol. 468/2, pp. 137-163.

(30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 517/1-2, pp. 123-134.

(31) Matsushima, T. *et al*. (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis,* Vol. 14/6, pp. 569-580.

(32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 1-152.

(33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro*micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Res*earch, Vol. 702/2, pp. 139-147.

(34) Hashimoto K. *et al*. (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacol*ogy, Vol. 59/1, pp. 28-36.

(35) Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 373-384.

(36) Zhang, L.S. *et al*. (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters,* Vol. 347/3-4, pp. 105-115.

(37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 November 2006, Available at: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Available at: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(39) Corvi, R. *et al*. (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis,* Vol 23/4, pp. 271-283.

(40) ILSI paper (draft). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research.*

▼M7

(41) Scott, D. *et al*. (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research,* Vol. 257/2, pp. 147-205.

(42) Morita, T. *et al*. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research,* Vol. 268/2, pp. 297-305.

(43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.

(44) Long, L.H. *et al*. (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research,* Vol. 634/1-2, pp. 177-183.

(45) Nesslany, F. *et al*. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, Vol. 49, pp. 439-452.

(46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 147/1-2, pp. 29-36.

(47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research,* Vol. 392, pp. 11-18.

(48) Payne, C.M. *et al*. (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, pp. 825-840.

(49) Bazin, E. *et al*. (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin,Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, pp. 251-259.

(50) Le Hegarat, L. *et al*. (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cellsby the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, pp. 555-560.

(51) Josse, R. *et al*. (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 295-304.

(52) Ehrlich, V. *et al*. (2002). Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis,* Vol. 17/3, pp. 257-260.

(53) Knasmüller, S. *et al*. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology,* Vol. 198/1-3, pp. 315-328.

(54) Gibson, D.P. *et al*. (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 61-70.

(55) Bonassi, S. *et al*. (2001). HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 37/1, pp. 31-45.

(56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research,* Vol. 113/3-4, pp. 173-215.

(57) Ong, T.-m. *et al*. (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, pp. 55-65.

▼M7

(58) Elliott, B.M. *et al*. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis,* Vol. 7, pp. 175-177.

(59) Matsushima, T. *et al*. (1976). „A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems“, in *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres, F.J. *et al*. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28, pp. 51-59.

(61) UNEP (2001), Stokholmo konvencija dėl patvariųjų organinių teršalų, Jungtinių Tautų aplinkos programa (UNEP). Pateikiama http://www.pops.int/

(62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, Vol.190/3, pp. 225-8.

(63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982). „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids“, in Genotoxic Effects of Airborne Agents. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.

(64) Zamora, P.O. *et al*. (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.

(65) Asakura, M. *et al*. (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.

(66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research,* Vol. 285/1, pp. 35-44.

(67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 521/1-2, pp. 103-112.

(68) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2004). Corrigendum to „Report from the *in vitro* micronucleus assay working group“. *Mutation Research,* 564, 97-100.

(69) Lorge, E. *et al*. (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research,* Vol. 655/1-2, pp. 1-3.

(70) Surralles, J. *et al*. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 341/3, pp. 169-184.

(71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 724, pp. 86-87.

(72) Pfuhler, S. *et al*. (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 101-107.

(73) OECD (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. Available upon request.

▼M7

(74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 741, pp. 32-56.

(75) Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.

(76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(77) Sobol, Z. *et al*. (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research, Vol.*746/1, pp. 29-34.

(78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research,* Vol. 120/4, pp. 241-247.

(79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research,* Vol. 120/4, pp. 269-275.

(80) Bryce, S.M. *et al*. (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, pp. 280–286.

(81) Nicolette, J. *et al*. (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 355–362.

(82) Shi, J., R. Bezabhie, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, Vol. 25/1, pp. 33-40.

(83) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, No.198, OECD Publishing, Paris.

(84) Fenech, M. *et al*. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 534/1-2, pp. 65-75.

(85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, Vol. 13/2, pp. 193-8.

(86) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology,* Vol. 85/8, pp. 873-99.

(87) Hayashi, M. *et al*. (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.723/2, pp. 87-90.

(88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). „*In vitro* micronucleus test“, in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed. Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 463-467.

(90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.

(91) Galloway, S.M. *et al*. (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

▼**M7**

(92) Richardson, C. *et al*. (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

▼M7

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Aneugenas – cheminė medžiaga ar procesas, kuris dėl sąveikos su mitozinio ir mejozinio ląstelių dalijimosi ciklo komponentais sukelia aneuploidiją ląstelėse ar organizmuose.

Aneuploidija – vienos arba daugiau kaip vienos chromosomų, bet ne viso (-ų) jų rinkinio (-ų) (poliploidija) nukrypimas nuo normalaus diploidinio (arba haploidinio) chromosomų skaičiaus.

Apoptozė – užprogramuota ląstelių žūtis, kuriai būdinga serija etapų, per kuriuos ląstelės suyra į membrana apsuptas daleles, kurios vėliau pašalinamos fagocitoze arba numetimo būdu.

Ląstelių proliferacija – ląstelių skaičiaus didėjimas dėl mitozinio jų dalijimosi.

Centromera – chromosomos regionas, su kuriuo ląstelės dalijimosi metu asocijuojasi verpstės siūlai ir dėl to dukterinės chromosomos tvarkingai išsidėsto dukterinių ląstelių poliuose.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Koncentracijos vertės – taikoma bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kultūros terpėje galutinėms vertėms.

Klastogenas – cheminė medžiaga, kuri sukelia ląstelių arba eukariotinių organizmų populiacijų struktūrines chromosomų aberacijas.

Citokinezė – ląstelių dalijimosi procesas iškart po mitozės, kai susidaro dvi dukterinės ląstelės, turinčios po vieną branduolį.

Citokinezės blokavimo proliferacijos indeksas (CBPI) – apdorotos populiacijos ląstelių po antrojo pasidalijimo dalis palyginti su neapdorotu kontroliniu ėminiu (formulė pateikta 2 priedėlyje).

Citostazė – ląstelių augimo slopinimas (formulė pateikta 2 priedėlyje).

Citotoksiškumas – jei šio bandymo metodo tyrimai atliekami esant citochalazinui B, citotoksiškumas nustatomas kaip apdorotų ląstelių citokinezės blokavimo proliferacijos indekso (CBPI) ar replikacijos indekso (RI) sumažėjimas palyginti su neigiamu kontroliniu ėminiu (žr. 26 pastraipą ir 2 priedėlį).

Jei šio bandymo metodo tyrimai atliekami be citochalazino B, citotoksiškumas nustatomas kaip apdorotų ląstelių santykinio populiacijos padvigubėjimo (RPD) sumažėjimas ar santykinis ląstelių skaičiaus padidėjimas (RICC) palyginti su neigiamu kontroliniu ėminiu (žr. 27 pastraipą ir 2 priedėlį).

Genotoksinis – bendrasis terminas, kuriuo išreiškiamas visų tipų DNR arba chromosomų pažeidimas, įskaitant trūkius, delecijas, aduktus, nukleotidų modifikacijas ir ryšius, pergrupavimus, genų mutacijas, chromosomų aberacijas ir aneuploidiją. Ne visų tipų genotoksiniai poveikiai sukelia mutacijas ar pastovų chromosomų pažeidimą.

Interfazinės ląstelės – ląstelės, kurios nėra mitozės stadijoje.

Kinetochoras – baltyminė struktūra, susidaranti chromosomos centromeroje, prie kurios dalijantis ląstelėms jungiasi verpstės siūlai ir dėl to dukterinės chromosomos tvarkingai išsidėsto dukterinių ląstelių poliuose.

▼M7

Mikrobranduoliai – nuo ląstelių pagrindinių branduolių atskirti papildomi maži branduoliai, susidarę mitozės ar mejozės telofazėje, kai chromosomų fragmentai ar ištisos chromosomos lėtai juda ląstelės polių link.

Mitozė – ląstelės branduolio dalijimasis, paprastai į profazę, prometafazę, metafazę, anafazę ir telofazę.

Mitozinis indeksas – metafazės ląstelių skaičiaus ir ląstelių populiacijos stebimų ląstelių suminio skaičiaus dalmuo, kuris rodo tos ląstelių populiacijos proliferacijos laipsnį.

Mutageninis – sukeliantis paveldimą DNR bazinės poros sekos (-ų) pokytį genuose arba chromosomų struktūroje (chromosomų aberacijas).

Neatsijungimas – porinių chromatidžių nesugebėjimas atsijungti ir tinkamai atsiskirti į besivystančias dukterines ląsteles, todėl pastarosiose susidaro nenormalus chromosomų skaičius.

p53 būsena – p53 baltymo dalyvavimas reguliuojant ląstelių ciklą, apoptozę ir DNR atkūrimą. Ląstelės, kurioms trūksta funkcinio p53 baltymo ir negali sustabdyti ląstelių ciklo arba pašalinti pažeistas ląsteles per apoptozę arba kitais mechanizmais (pvz., DNR atkūrimo skatinimą), susijusiais su p53 funkcijomis atsakant į DNR pažaidą, teoriškai turėtų būti labiau linkusios genų mutacijai ar chromosomų aberacijoms.

Poliploidija – chromosomų skaičiaus aberacijos ląstelėse arba organizmuose, apimančios visą (-us) chromosomų rinkinį (-us), skirtingai nei atskiros chromosomos ar chromosomų (aneuploidija).

Proliferacijos indeksas (PI) – citotoksiškumo matavimo metodas, kai citoB nenaudojamas (formulė pateikta 2 priedėlyje).

Santykinis ląstelių skaičiaus padidėjimas (RICC) – citotoksiškumo matavimo metodas, kai citoB nenaudojamas (formulė pateikta 2 priedėlyje).

Santykinis populiacijos padvigubėjimas (RPD) – citotoksiškumo matavimo metodas, kai citoB nenaudojamas (formulė pateikta 2 priedėlyje).

Replikacijos indeksas (RI) – apdorotos kultūros ląstelių pasibaigusių dalijimosi ciklų skaičiaus santykis su neapdorotos kontrolinės kultūros ląstelių skaičiumi veikimo ir regeneravimo laikotarpiu (formulė pateikta 2 priedėlyje).

S9 kepenų frakcija – skystis virš kepenų homogenato, gautas po centrifugavimo esant 9 000 *g*, t. y. žalių kepenų ekstraktas.

S9 mišinys – S9 kepenų frakcijos ir fermentų metaboliniam aktyvumui būtinų kofaktorių mišinys.

Tirpiklio kontrolinis ėminys – bendrasis terminas, apibūdinantis kontrolines kultūras, į kurias dedama vien tik tirpiklio, naudoto bandomajai cheminei medžiagai ištirpinti.

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Neapdorotas kontrolinis ėminys – kultūros, kurios neapdorojamos (t. y. nededama bandomosios cheminės medžiagos ar tirpiklio), bet yra tiriamos vienu metu su kultūromis, į kurias dedama bandomoji cheminė medžiaga.

▼M7

2 priedėlis

CITOTOKSIŠKUMO VERTINIMO FORMULĖS

Kai naudojamas citoB, citotoksiškumo įvertinimas turėtų būti pagrįstas **citokinezės blokavimo proliferacijos indeksu (CBPI)** ar **replikacijos indeksu (RI)** (17) (69). CBPI rodo vidutinį ląstelės branduolių skaičių ir gali būti naudojamas ląstelių proliferacijai skaičiuoti. RI rodo apdorotų kultūrų santykinį ląstelių ciklų skaičių vienai ląstelei citoB veikimo laikotarpiu palyginti su kontrolinėmis kultūromis ir gali būti naudojamas citostazės % skaičiuoti:

$$\% \text{ citostazės} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\},$$

kai:

T– bandomąja chemine medžiaga apdorota kultūra;

C– kontrolinė kultūra,

čia:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{vienbranduolių ląstelių sk.}) + (2 \times \text{dvibranduolių ląstelių sk.}) + (3 \times \text{daugiabranduolių ląstelių sk.}))}{(\text{suminis ląstelių skaičius})}$$

Taigi, CBPI lygus 1 (visos ląstelės yra vienbranduolės) atitinka 100 % citostazę.

$$\text{Citostazė} = 100 - \text{RI},$$

$$\text{RI} = \frac{((\text{dvibranduolių ląstelių sk.}) + (2 \times \text{daugiabranduolių ląstelių sk.}))/(\text{suminis ląstelių skaičius})_T}{((\text{dvibranduolių ląstelių sk.}) + (2 \times \text{daugiabranduolių ląstelių sk.}))/(\text{suminis ląstelių skaičius})_C} \times 100$$

T – apdorotos kultūros;

C – kontrolinės kultūros.

Taigi, RI = 53 % reiškia, kad, palyginti su kontrolinės kultūros ląstelių, kurios pasidalijo sudarydamos dvibranduoles ir daugiabranduoles ląsteles, skaičiumi, apdorotos kultūros pasidalijusių ląstelių skaičius yra tik 53 %, t. y. 47 % citostazė.

Kai citoB nenaudojamas, rekomenduojamas citotoksiškumo įvertinimas, pagrįstas **santykiniu ląstelių skaičiaus padidėjimu (RICC)** arba **santykiniu populiacijos padvigubėjimu (RPD)** (69), nes abiem atvejais atsižvelgiama į pasidalijusią ląstelių populiacijos dalį.

$$\textbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{Apdorotų kultūrų ląstelių skaičiaus padidėjimas(pabaiga – pradžia)})}{(\text{Kontrolinių kultūrų ląstelių skaičiaus padidėjimas(pabaiga – pradžia)})} \times 100$$

$$\textbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{Apdorotų kultūrų populiacijos dvigubėjimų skaičius})}{(\text{Kontrolinių kultūrų populiacijos dvigubėjimų skaičius})} \times 100$$

čia:

Populiacijos padvigubėjimas = [log (ląstelių skaičius po apdorojimo ÷ pradinis ląstelių skaičius)] ÷ log 2

Taigi 53 % RICC ar RPD rodo 47 % citotoksiškumą ar citostazę.

▼M7

Naudojant **proliferacijos indeksą (PI)**, citotoksiškumą galima įvertinti skaičiuojant skaičių klonų, sudarytų iš 1 ląstelės (cl1), 2 ląstelių (cl2), 3–4 ląstelių (cl4) ir 5–8 ląstelių (cl8).

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

PI vartojamas kaip vertingas ir patikimas citotoksiškumo parametras be citoB auginamoms *in vitro* ląstelių linijoms (35) (36) (37) (38) ir į jį galima žiūrėti kaip į naudingą papildomą parametrą.

Visais atvejais apdorotų ir neigiamų kontrolinių ėminių kultūrų ląstelių skaičius prieš apdorojimą turėtų būti vienodas.

Nors praeityje kaip citotoksiškumo parametras buvo naudojamas RCC (t. y. apdorotų kultūrų ląstelių skaičius/kontrolinių kultūrų ląstelių skaičius), jis daugiau nerekomenduojamas, nes gali būti gautas per mažas citotoksiškumo įvertis.

Kai naudojamos automatizuotos skaičiavimo sistemos, pvz., tėkmės citometrija, lazerinė skenuojanti citometrija ar vaizdo analizė, ląstelių skaičių formulėje galima pakeisti branduolių skaičiumi.

Neigiamų kontrolinių kultūrų populiacijos padvigubėjimas ar replikacijos indeksas turėtų būti suderinamas su reikalavimų imti ląstelių ėminius nuo apdorojimo praėjus laikui, kuris būtų maždaug 1,5–2,0 kartus ilgesnis nei normalaus ląstelių ciklo trukmė.

▼M3

B.50. **ODOS JAUTRINIMAS. VIETINIO LIMFMAZGIO BANDYMAS. DA**

ĮVADAS

1. OECD Cheminių medžiagų bandymo gairės ir ES bandymų metodai periodiškai persvarstomi atsižvelgiant į mokslo pažangą, kintančias reguliavimo reikmes ir gyvūnų gerovės sumetimais. Pirmasis bandymų metodas (BM) (B.42) pelių odos jautrinimui nustatyti – vietinio limfmazgio bandymas (LLNA; OECD bandymų metodika 429; šio priedo B.42 skyrius) buvo persvarstytas (1). LLNA tinkamumo patvirtinimas ir susijusių darbų apžvalga paskelbta (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) šaltiniuose. Pagal LLNA limfocitų proliferacijai matuoti naudojamas radioizotopinis timidinas arba jodas ir todėl tyrimas yra riboto naudojimo, kadangi sunku įsigyti, naudoti ar pašalinti radioaktyvias medžiagas. LLNA: DA (kurį sukūrė „Daicel Chemical Industries, Ltd.“) yra neradioaktyvaus pobūdžio LLNA modifikacija, kuria adenozino trifosfato (ATP) kiekis įvertinamas bioliuminescencija kaip limfocitų proliferacijos rodikliu. LLNA: DA bandymo metodo tinkamumą patvirtino, apsvarstė ir rekomenduoja tarptautinė tarpusavio vertinimo komisija; jis laikomas naudingu su tam tikrais apribojimais identifikuojant odą jautrinančias ir nejautrinančias chemines medžiagas (10) (11) (12) (13). Šis BM yra parengtas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) sukeliamam gyvūnų odos jautrinimo potencialui įvertinti. Pagal šio priedo B.6 skyrių ir OECD bandymų metodika 406 naudojami bandymai su jūros kiaulytėmis, pirmiausia maksimizacijos ir Buehlerio bandymas su jūros kiaulytėmis (14). LLNA (šio priedo B.42 skyrius; OECD bandymų metodika 429) ir dvi neradioaktyvaus pobūdžio modifikacijos, LLNA: DA (šio priedo B.50 skyrius; OECD bandymų metodika 442 A) ir LLNA: BrdU-ELISA (šio priedo B.51 skyrius; OECD bandymų metodika 442 B), yra pranašesnės už bandymus su jūros kiaulytėmis pagal B.6 and OECD bandymų metodiką 406 (14) tuo, kad sumažinamas ir patobulinamas gyvūnų naudojimas.

2. Panašiai, kaip LLNA, LLNA: DA metodu tiriamas odos jautrinimo indukcinis etapas ir gaunami kiekybiniai duomenys, tinkami dozės ir atsako sąryšiui įvertinti. Be to, galimybė aptikti odos jautriklius nenaudojant DNR žymėjimo izotopų, panaikina galimybę darbuotojams būti apšvitintiems dirbant ir atliekų pašalinimo sunkumus. Dėl to savo ruožtu galima naudoti daugiau pelių odos jautrikliams aptikti, todėl galima dar sumažinti jūros kiaulyčių naudojimą odos jautrinimo potencialui išbandyti (t. y. B.6; OECD bandymų metodika 406) (14).

APIBRĖŽTYS

3. Vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

4. LLNA: DA yra modifikuotas LLNA metodas galimai odą jautrinančioms cheminėms medžiagoms identifikuoti su tam tikrais apribojimais. Nereikia manyti, kad visais atvejais vietoj LLNA arba bandymo su jūrų kiaulytėmis (t. y. B.6; OECD bandymų metodika 406) (14), reikia taikyti LLNA: DA bandymą; tai labiau reiškia, kad šis bandymas yra lygiavertis ir gali būti taikomas kaip pakaitinis metodas, pagal kurį teigiamų ir neigiamų rezultatų paprastai nebereikia papildomai patvirtinti (10) (11). Prieš atlikdama tyrimą bandymų laboratorija turi apsvarstyti visą turimą informaciją apie bandomąją medžiagą. Tokia informacija apima medžiagos tapatumą ir cheminę

▼M3

struktūrą, jos fizikines ir cheminės savybes, visų kitų bandomosios medžiagos *in vitro* arba *in vivo* toksiškumo bandymų rezultatus ir giminingos struktūros medžiagų toksikologinius duomenis. Ši informacija turi būti apsvarstyta, siekiant nustatyti, ar LLNA: DA tinka bandomajai medžiagai (atsižvelgiant į tam tikrų medžiagų tipų nesuderinamumą su LLNA: DA (žr. 5 skirsnį)), ir parinkti tinkamą dozę.

5. LLNA: DA yra *in vivo* metodas, todėl jautrinančiam poveikiui dėl alerginio sąlyčio įvertinti naudojami gyvūnai. Tačiau jis turi galimybę sumažinti gyvūnų naudojimą šiam tikslui, palyginti su bandymais su jūros kiaulytėmis (B.6; OECD bandymų metodika 406) (14). Be to, LLNA: DA iš esmės pagerina būdą, kuriuo gyvūnai naudojami jautrinimui dėl alerginio sąlyčio bandyti (kelia mažiau skausmo ir kančių), kadangi, skirtingai nei B.6 and OECD bandymų metodika 406, taikant LLNA: DA nereikia sukelti ypač didelio odos jautrumo reakcijų. Nepaisant LLNA: DA pranašumų prieš B.6 ir OECD bandymų metodiką 406 (14), yra tam tikrų apribojimų, dėl kurių gali tekti taikyti B.6 ir OECD bandymų metodiką 406 (pvz., tiriant kai kuriuos metalus, klaidingi teigiami rezultatai tiriant tam tikrus odos dirgiklius (pvz., kai kurias paviršinio aktyvumo tipo chemines medžiagas) (6) (1 ir šio priedo B.42 skyrius), bandomosios medžiagos tirpumas). Be to, dėl cheminių klasių arba medžiagų, kuriose yra funkcinių grupių, veikiančių kaip galimos klaidinančiosios medžiagos (16), gali tekti atlikti bandymus su jūrų kiaulytėmis (t. y. B.6; OECD bandymų metodika 406 (14)). Nustatytus LLNA apribojimus (1 ir šio priedo B.42 skyrius) rekomenduojama taikyti ir LLNA: DA (10). Be to, LLNA: DA gali netikti naudoti bandyti medžiagas, kurios turi poveikį ATP lygiui (pvz., medžiagas, kurios veikia kaip ATP inhibitoriai) arba tas, kurios trukdo tiksliai išmatuoti tarpląstelinį ATP (pvz., ATP ardančių fermentų buvimą, tarpląstelinio ATP buvimą limfmazgyje). Išskyrus tokius nustatytus apribojimus. LLNA: DA turi būti tinkamas bandant bet kurias chemines medžiagas, nebent tos medžiagos turi tokių savybių, kurios kenktų LLNA: DA tikslumui. Be to, reikia išnagrinėti ribinių teigiamų rezultatų galimybę, kai dirginimo rodiklio (SI) vertės gaunamos nuo 1,8 iki 2,5 (žr. 31, 32 skirsnius). Tai grindžiama 44 medžiagų tinkamumo patvirtinimo duomenų baze, taikant SI $\geq$ 1,8 (žr. 6 skirsnį), kurioje LLNA: DA teisingai identifikavo visus 32 LLNA jautriklius, bet neteisingai identifikavo tris iš 12 LLNA nejautriklių, kurių SI vertės nuo 1,8 iki 2,5 (t. y. ribinis teigiamas rezultatas) (10). Tačiau, kadangi tas pats duomenų rinkinys buvo naudojamas SI vertėms nustatyti ir tyrimo prognozinėms savybėms apskaičiuoti, pateikti rezultatai gali pervertinti tikrąsias prognozines savybes.

BANDYMO METODO PRINCIPAS

6. Pagrindinis principas, kuriuo pagrįstas LLNA: DA metodas, yra jautrinančiųjų medžiagų sukelta pirminė limfocitų proliferacija cheminės medžiagos poveikio vietą drenuojančiame limfmazgyje. Ši proliferacija yra proporcinga naudojamai dozei ir alergeno gebai jautrinti, taigi tai yra paprastas būdas objektyviai ir kiekybiškai išmatuoti jautrinimą. Proliferacija įvertinama palyginant vidutinę proliferaciją bandymo grupėse ir nešikliu paveiktose kontrolinėse (angl. *vehicle treated control*, VC) grupėse. Nustatomas vidutinės proliferacijos paveiktose grupėse ir kontrolinėse VC grupėse santykis, vadinamas SI, kuris turi būti $\geq$ 1,8, kad bandomoji medžiaga galėtų būti toliau vertinama kaip galinti odą dirginanti medžiaga. Čia aprašytos procedūros pagrįstos ATP kiekio matavimu bioliuminescencijos būdu (žinoma, kad ji

▼M3

koreliuoja su gyvų ląstelių skaičiumi) (17), kas parodo padidėjusį proliferuojančių ląstelių skaičių drenuojančiuose ausų limfmazgiuose (18) (19). Pagal bioliuminescencijos metodą liuciferazės fermentas panaudojamas šviesai katalizuoti iš ATP ir liuciferino, vykstant šiai reakcijai:



Skleidžiamos šviesos intensyvumas tiesiškai proporcingas ATP koncentracijai ir išmatuojamas liuminometru. Liuciferino-liuciferazės tyrimas yra jautrus ATP kiekio nustatymo metodas, taikomas labai įvairiai paskirčiai (20).

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Gyvūnų rūšių parinkimas

7. Šiam bandymui pasirinkta gyvūnų rūšis – pelės. LLNA: DA tinkamumo patvirtinimo tyrimai buvo atlikti išimtinai su CBA/J veisle, kuri dėl to laikoma tinkamiausia veisle (12) (13). Naudojamos suaugusios pelių patelės, kurios yra neturėjusios vados ir neapvaisintos. Pradedant bandymą, gyvūnų amžius turi būti 8–12 savaičių, o gyvūnų masės skirtumas turi būti kiek įmanoma mažesnis ir neviršyti 20 % vidutinės masės Galima naudoti kitas veisles ir patinus, jei yra gauta pakankamai duomenų, kurie rodytų, kad nėra esminių veislei ir (arba) lyčiai būdingų atsako į LLNA: DA skirtumų

Laikymo ir šėrimo sąlygos

8. Pelės turi būti laikomos grupėmis (21), nebent pateikiamas pakankamas loginis pagrindas, kodėl peles reikia laikyti atskirai. Patalpos, kurioje laikomi bandomieji gyvūnai, temperatūra turi būti 22 ± 3 °C. Nors santykinė oro drėgmė turi būti ne mažesnė kaip 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikia užtikrinti 50–60 %. Apšvietimas turi būti dirbtinis, taikant 12 val. šviesos ir 12 val. tamsos ciklą. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, neribojant geriamo vandens kiekio.

Gyvūnų paruošimas

9. Gyvūnai pasirenkami atsitiktinai, ženklinami, kad būtų įmanoma kiekvieną identifikuoti (tačiau netaikomas joks ausų ženklinimas), ir laikomi narveliuose mažiausiai 5 paras prieš pradedant taikyti dozes, kad galėtų priprasti prie laboratorijos sąlygų. Prieš veikimo medžiaga pradžią visi gyvūnai apžiūrimi, ar neturi pastebimų odos pažeidimų.

Dozavimo tirpalų paruošimas

10. Prieš užtepant ant pelių ausų, kietosios cheminės medžiagos ištirpinamos arba paskleidžiamos tirpikliuose / nešikliuose ir, jei reikia, atskiedžiamos. Skystos cheminės medžiagos gali būti užtepamos grynos arba atskiestos. Netirpios cheminės medžiagos, pvz., tos, kurių paprastai pasitaiko medicinos įrangoje, prieš užtepant ant pelių ausų, padidintosios ekstrakcijos būdu išskiriamos atitinkamame tirpiklyje, kad būtų gautos visos galimos išskirti sudedamosios dalys. Bandomosios medžiagos paruošiamos kasdien, nebent stabilumo duomenys rodo, kad jas galima laikyti ilgesnį laiką.

▼M3

Patikimumo tikrinimas

11. Teigiamo poveikio kontrolinės cheminės medžiagos (PC) naudojamos siekiant parodyti tyrimo tinkamumą joms reaguojant pakankamu ir atkartojamu jautrumu kaip jautrinančioms bandomosioms medžiagoms, kurių atsako dydis gerai apibūdintas. Naudoti lygiagrečias PC rekomenduojama todėl, kad jos parodo laboratorijos kompetenciją sėkmingai atlikti bandymą kiekvieną tyrimą ir įvertinti atkuriamumą bei palyginamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų. Kiekvieno tyrimo metu naudoti PC reikalauja ir kai kurios reguliavimo institucijos, todėl naudotojai raginami pasikonsultuoti su atitinkamomis institucijomis prieš vykdydami LLNA: DA. Taigi, skatinama įprastai naudoti lygiagrečią PC, kad būtų išvengta papildomų bandymų su gyvūnais, reikalingų laikytis reikalavimų, kuris gali kilti PC naudojant tik periodiškai (žr. 12 skirsnį). PC turi sukelti teigiamą LLNA: DA atsaką esant tokiam poveikio lygiui, kuris numatytas padidinti SI $\geq$ 1,8, palyginti su neigiamo poveikio kontrolinės medžiagos (NC) grupe. PC dozė turi būti parenkama taip, kad nesukeltų per didelio odos sudirginimo ar sisteminio toksiškumo, o atsako sukėlimas būtų atkuriamas, bet ne per didelis (pvz., SI > 10 būtų laikomas per dideliu). Tinkamiausia PC yra 25 % heksilcinamono aldehidas (Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos [CAS] Nr. 101–86–0) ir 25 % eugenolis (CAS Nr. 97–53–0,) acetone: alyvų aliejuje (4:1, tūrio dalys). Gali pasitaikyti aplinkybių, kai, pateikus pakankamai įrodymų, galima naudoti kitas PC, atitinkančias pirmiau nurodytus kriterijus.

12. Nors naudoti lygiagrečią PC grupę rekomenduojama, gali būti situacijų, kuriomis gali pakakti periodinių bandymų naudojant PC (t. y. $\leq$ 6 mėnesių intervalais), jei tai laboratorijos, kurios reguliariai atlieka LLNA: DA (t. y. atlieka LLNA: DA ne rečiau kaip kartą per mėnesį) ir turi įsteigusios anksčiau sukauptų PC duomenų bazę, kuri rodo laboratorijos gebėjimą gauti atkuriamus ir tikslius rezultatus su PC. Pakankamas profesionalumas atliekant LLNA: DA tyrimus gali būti sėkmingai įrodomas pastoviai gaunant teigiamus rezultatus naudojant PC ne mažiau kaip 10-yje nepriklausomų bandymų, atliktų per pagrįstą laikotarpį (t. y. trumpesnį kaip vieneri metai).

13. Lygiagreti PC visada turi būti naudojama, jei yra procedūrinių LLNA: DA pakeitimų (pvz., pasikeitė parengti darbuotojai, pakeistos bandymo metodo medžiagos ir (arba) reagentai, pakeista bandymo metodo įranga, pakeistas bandomųjų gyvūnų tiekėjas), o tokie pakeitimai turi būti užregistruoti laboratorijos ataskaitose. Turi būti apsvarstytas tokių pasikeitimų poveikis anksčiau sukauptų duomenų bazės tinkamumui, vertinant būtinybę sukurti naują anksčiau sukauptų duomenų bazę, skirtą PC rezultatų nuoseklumui dokumentuoti.

14. Tyrėjai turi suprasti, kad sprendimas vykdyti PC tyrimą periodiškai, o ne nuolat, turi padarinių neigiamų tyrimų rezultatų, gautų be lygiagrečios PC naudojimo, laikotarpiu tarp kiekvieno periodinio PC tyrimo, tinkamumui ir priimtinumui. Pvz., jei, atliekant periodinį PC tyrimą, gaunamas klaidingas neigiamas rezultatas, gali būti kvestionuojami neigiami bandomosios medžiagos rezultatai, gauti laikotarpiu nuo paskutinio priimtino periodinio PC tyrimo iki nepriimtino periodinio PC tyrimo. Šių rezultatų padariniai turi būti stropiai įvertinti sprendžiant, ar nuolat vykdyti lygiagrečius, ar tik periodinius PC tyrimus. Taip pat reikia apsvarstyti galimybę lygiagrečios PC grupės tyrimams naudoti mažiau gyvūnų, jei tai moksliškai pateisinama ir jei laboratorija savo anksčiau sukauptais duomenimis įrodo, kad galima naudoti mažiau pelių (22).

▼M3

15. Nors PC turi būti bandoma nešiklyje, kuris žinomai sukelia pastovų atsaką (pvz., acetono ir alyvų aliejaus mišinyje; 4:1, tūrio dalys), gali būti tam tikrų reguliavimo situacijų, kai gali prireikti ištirti ir nestandartinį nešiklį (kliniškai/chemiškai susijusį preparatą) (23). Jei lygiagreti PC bandoma kitokiame nešiklyje nei bandomoji medžiaga, turi būti naudojama atskira VC, skirta lygiagrečiai PC.

16. Tais atvejais, kai vertinamos tam tikrai cheminei klasei ar atsakų sričiai priklausančios medžiagos, gali būti naudojamos ir palyginamosios cheminės medžiagos, kad būtų parodyta, jog bandymo metodas tinkamai veikia nustatant šių medžiagų odos jautrinimo potencialą. Atitinkamos palyginamosios medžiagos turi pasižymėti šiomis savybėmis:

— struktūriniu ir funkciniu panašumu į bandomosios cheminės medžiagos klasę,

— žinomomis fizinėmis ir cheminėmis charakteristikomis,

— apie jas turi būti patvirtinančių duomenų, gautų LLNA: DA tyrimais,

— apie jas turi būti patvirtinančių duomenų, gautų kitų gyvūnų modeliais ir (arba) iš žmonių.

BANDYMO EIGA

Gyvūnų skaičius ir dozių dydis

17. Vienai dozės grupei naudojami ne mažiau kaip keturi gyvūnai, naudojant ne mažiau kaip tris bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas ir vieną lygiagrečią NC grupę, paveikiamą tik bandomosios medžiagos nešikliu, ir PC (lygiagrečią arba naujausią, remiantis laboratorijos politika pagal 11–15 skirsnius). Reikia apsvarstyti poreikį išbandyti keletą PC dozių, ypač bandant PC periodiškai. Išskyrus neveikimą bandomąja medžiaga, kontrolinių grupių gyvūnai turi būti prižiūrimi ir jais rūpinamasi taip pat, kaip poveikio grupės gyvūnais.

18. Dozė ir nešiklis turi būti parenkami laikantis (2) ir (24) šaltiniuose pateikiamų rekomendacijų. Paeilinės dozės paprastai parenkamos iš atitinkamos koncentracijos verčių eilės, pvz., 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % ir t. t. Taikomai koncentracijos verčių eilei turi būti skirtas tinkamas loginis pagrindas. Reikia atsižvelgti į visą turimą toksikologinę informaciją (pvz., apie ūminį toksiškumą ir odos dirginimą) ir struktūrinę bei fizikinių ir cheminių savybių informaciją apie dominančią bandomąją cheminę medžiagą (ir (arba) struktūriškai panašias medžiagas), kad trys iš eilės taikomos koncentracijos vertės būtų parinktos taip, kad didžiausios koncentracijos poveikis būtų kuo didesnis, bet išvengta sisteminio toksiškumo ir (arba) per didelio vietinio odos dirginimo (24) (25). Jei tokios informacijos neturima, gali prireikti pradinio atrankinio bandymo (žr. 21–24 skirsnius).

19. Nešiklis neturi kenkti ar iškraipyti bandymo rezultato ir turi būti parinktas taip, kad būtų kuo geresnis tirpumas, siekiant gauti didžiausią įmanomą koncentraciją gaminant tirpalą/suspensiją, tinkamą bandomajai medžiagai užtepti. Rekomenduojami nešikliai yra acetono ir alyvų aliejaus mišinys (4:1, tūrio dalys), N,N-dimetilformamidas, metiletilketonas, propilenglikolis ir dimetilsulfoksidas (6), tačiau galima naudoti kitus nešiklius, jei pateikiamas tinkamas loginis pagrindas. Tam tikrais atvejais papildomai kontrolei gali tekti naudoti klinikiniu požiūriu atitinkantį tirpiklį arba komercinį preparatą, turintį bandomosios medžiagos. Reikia ypač stengtis užtikrinti, kad į nešiklyje būtų hidrofilinių medžiagų, kurios drėkintų odą ir iš karto nenutekėtų, įdedant soliubilizavimo priemonių (pvz., 1 % „Pluronic® L92“). Taigi reikia vengti naudoti grynai vandeninius nešiklius.

▼M3

20. Apdorojant atskirų pelių limfmazgius galima įvertinti nepastovumą tarp gyvūnų ir statistiškai palyginti skirtumus tarp bandomosios medžiagos ir VC grupės matavimo rezultatų (žr. 33 skirsnį). Be to, tik tada, kai surenkami atskirų gyvūnų duomenys, realu įvertinti galimybę sumažinti pelių skaičių PC grupėje (22). Negana to, kai kurios reguliavimo institucijos reikalauja gauti atskirtų gyvūnų duomenis. Reguliarus atskirų gyvūnų duomenų rinkimas turi rūpinimosi gyvūnų gerove privalumų, nes išvengiama dvigubo bandymo, kurio reikėtų, jei bandomosios medžiagos rezultatus, iš pradžių gautus kitu būdu (pvz., iš jungtinių gyvūnų duomenų), vėliau vertintų reguliavimo institucijos, kurios vadovaujasi kitais reikalavimais (pvz., atskirų gyvūnų duomenimis).

Atrankinis bandymas

21. Jei neturima informacijos, skirtos didžiausiai bandomai dozei nustatyti (žr. 18 skirsnį), reikia atlikti atrankinį bandymą, kad būtų nustatytas tinkamas dozės lygis pagal LLNA: DA metodą. Atrankinio bandymo tikslas – nustatyti gaires didžiausiam pagrindinio LLNA: DA tyrimo dozės lygiui parinkti, kai neturima informacijos apie koncentraciją, kuri sukelia sisteminį toksiškumą (žr. 24 skirsnį) ir (arba) per didelį vietinį odos dirginimą (žr. 23 skirsnį). Didžiausias bandomas dozės lygis turi būti 100 % bandomosios medžiagos, jei tai skysčiai, arba didžiausia įmanoma koncentracija, jei tai kietosios medžiagos ar suspensijos.

22. Atrankinis bandymas atliekamas tokiomis pačiomis sąlygomis kaip ir pagrindinis LLNA: DA tyrimas, išskyrus tai, kad nevertinama limfmazgių proliferacija ir galima tirti mažiau gyvūnų kiekvienoje dozės grupėje. Siūloma naudoti vieną arba du gyvūnus vienai dozės grupei. Visos pelės kasdien stebimos, ar poveikio vietoje nepasireiškia sisteminio toksiškumo ar vietinio dirginimo klinikiniai požymiai. Kūno masė užrašoma prieš bandymą ir prieš jį pabaigiant (8 dieną). Abi kiekvienos pelės ausys stebimos, ar nėra eritemos ir įvertinama pagal 1 lentelę (25). 1 dieną (prieš dozę), 3 dieną (praėjus maždaug 48 valandų po pirmosios dozės), 7 dieną (24 valandos prieš pabaigimą) ir 8 dieną stormačiu (pvz., skaitmeniniu mikrometru arba ciferblatiniu storio matuokliu) atliekami ausų storio matavimai. Be to, 8 dieną ausų storis gali būti įvertinamas ausų skylamušio svorio matavimais, atliekamais po to, kai gyvūnai humaniškai numarinami. Per didelį vietinį dirginimą rodo $\geq$ 3 edemos įvertis ir (arba) $\geq$ 25 % ausies storio padidėjimas bet kurią matavimo dieną (26) (27). Didžiausia pagrindiniam LLNA: DA tyrimui parenkama dozė yra antra pagal dydį dozė iš atrankinio bandymo koncentracijų eilės (žr. 18 skirsnį), nesukelianti sisteminio toksiškumo ir (arba) per didelio vietinio odos dirginimo.

1 lentelė

Eritemos įverčiai

Pastebėjimas	Įvertis
Eritemos nėra	0
Labai nedidelė eritema (vos juntama)	1
Aiški eritema	2

▼M3

Pastebėjimas	Įvertis
Nuo vidutinės iki sunkios eritemos	3
Nuo sunkios eritemos (buroko raudonumo) iki šašo susidarymo, kuomet nebeįmanoma įvertinti eritemos sunkumo	4

23. Taikant LLNA metodą, dirgikliams nustatyti, be ausų storio padidėjimo 25 % (26) (27), naudojamas ir statistiškai reikšmingas paveiktų pelių ausų storio padidėjimas, palyginti su kontrolinėmis pelėmis (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Vis dėlto, nors statistiškai reikšmingas padidėjimas galimas ir ausies storiui esant mažesniam kaip 25 %, tai nėra siejama konkrečiai su per dideliu dirginimu (30) (31) (32) (33) (34).

24. Šie klinikiniai požymiai gali rodyti sisteminį toksiškumą (35), kai yra naudojami kaip integruoto įvertinimo dalis, todėl gali nurodyti didžiausią dozės lygį, skirtą pagrindiniam LLNA: DA: nervų sistemos funkcijos pokyčiai (pvz., piloerekcija, ataksija, drebulys ir konvulsijos); elgsenos pokyčiai (pvz., agresyvumas, prausimosi pokyčiai, žymus aktyvumo lygio pokytis); kvėpavimo būdo pokyčiai (t. y. kvėpavimo dažnio ir intensyvumo pokyčiai, pvz., dusulys, žiopčiojimas ir karkalai) ir ėdalo bei vandens vartojimo pokyčiai. Be to, vertinant turi būti atsižvelgiama į letargijos ir (arba) nereagavimo požymius ir bet kokius didesnio už nedidelį ar trumpalaikį skausmą ir kančią klinikinius požymius arba > 5 % kūno masės sumažėjimą nuo 1 iki 8 dienos, ir į mirtingumą. Gaištantys ar didelio skausmo ir kančios požymius rodantys gyvūnai turi būti humaniškai numarinti (36).

Pagrindinio bandymo eksperimentinis planas

25. Eksperimentinis bandymo planas atrodo taip:

— *1 diena.* Atskirai nustatoma ir užrašoma kiekvieno gyvūno masė ir bet kokie klinikiniai pastebėjimai. Ant kiekvienos ausies išorinės pusės šepetėliu, suvilgytu 1 % natrio laurilo sulfato (SLS) vandeniniame tirpale, SLS tirpalas užtepamas keturiais penkiais potėpiais padengiant visą paviršių. Praėjus vienai valandai po SLS užtepimo, ant kiekvienos ausies išorinės pusės užtepama 25 µl atitinkamai atskiesto bandomosios medžiagos tirpalo, vien tik nešiklio arba PC (lygiagrečios arba naujausios, remiantis laboratorijos politika pagal 11–15 skirsnius).

— *2, 3 ir 7 dienos.* Pakartojamas pradinis paveikimas 1 % SLS vandeniniu tirpalu ir 1 dieną atlikta bandomosios medžiagos užtepimo procedūra.

— *4, 5 ir 6 dienos.* Jokio veikimo.

— *8 diena.* Užrašoma kiekvieno gyvūno masė ir bet kokie klinikiniai pastebėjimai. Praėjus maždaug 24–30 valandų po paveikimo 7 dieną, gyvūnai humaniškai numarinami. Kiekvienos pelės drenuojamieji ausų limfmazgiai išpjaunami ir kiekvieno gyvūno atskirai apdorojami fosfatiniame buferyje (PBS). Limfmazgių identifikavimo ir skrodimo aprašą bei schemas galima rasti (22) šaltinyje. Norint toliau stebėti vietinį odos atsaką pagrindiniame tyrime, į tyrimo protokolą gali būti įtraukti tokie papildomi parametrai kaip ausų eritemos įverčiai arba ausų storio matavimo rezultatai (gauti storio matuokliu arba ausų skylamušio svorio matavimais atliekant nekroskopiją).

▼M3

Ląstelių suspensijos ruošimas

26. Limfmazgių ląstelių (LNC), išpjautų iš kiekvienos pelės abiejų ausų, pavienių ląstelių suspensija paruošiama limfmazgius sudedant tarp dviejų stiklinių objektinių stiklelių ir lengvai paspaudžiant, kad jie susitraiškytų. Įsitikinus, kad audinys pasklido plonu sluoksniu, stikleliai atskiriami. Audinys ant abiejų stiklelių pamerkiamas į PBS laikant kiekvieną stiklelį kampu virš Petri lėkštelės ir apiplaunant PBS, kartu nugramdant audinį nuo stiklelio ląstelių grandikliu. Kadangi NC gyvūnų limfmazgiai maži, svarbu dirbti atsargiai, kad būtų išvengta bet kokio dirbtinio poveikio SI vertėms. Abiems stikleliams apiplauti turi būti naudojama 1 ml PBS. LNC suspensija Petri lėkštelėje turi būti lengvai homogenizuota ląstelių grandikliu. Po to 20 µl LNC suspensijos mėginys paimamas mikropipete, pasirūpinant neįtraukti akimi matomos membranos, ir sumaišomas su 1,98 ml PBS, kad būtų gautas 2 ml mėginys. Po to pagal tą pačią procedūrą paruošiamas antras 2 ml mėginys, kad iš kiekvieno gyvūno būtų paruošta po du mėginius.

Ląstelių proliferacijos nustatymas (ATP kiekio limfocituose matavimas)

27. Padidėjęs ATP kiekis limfmazgiuose išmatuojamas liuciferino/liuciferazės metodu, naudojant ATM matavimo rinkinį, kuriuo bioliuminescencija išmatuojama santykiniais liuminescencijos vienetais (angl. *Relative Luminescence Units*, RLU) Tyrimo laikas po gyvūno numarinimo, kada matuojamas ATP kiekis, kiekvieno gyvūno atveju turi būti vienodas (maždaug 30 minučių), kadangi laikoma, kad po gyvūno žūties ATP kiekis palaipsniui mažėja (12). Taigi, procedūrų serija nuo ausų limfmazgių išpjovimo iki ATP matavimo turi būti atlikta per 20 minučių, laikantis nustatyto plano, kuris kiekvienam gyvūnui vienodas. ATP liuminescencija kiekviename 2 ml mėginyje turi būti matuojama taip, kad kiekvienam gyvūnui būtų gauti du matavimo rezultatai. Po to apskaičiuojamas liuminescencijos vidurkis, kuris naudojamas tolesniuose skaičiavimuose (žr. 30 skirsnį).

STEBĖJIMAI

Klinikiniai stebėjimai

28. Kiekviena pelė kruopščiai apžiūrima bent kartą per dieną bet kokiems vietinio dirginimui užtepimo vietoje arba sisteminio toksiškumo klinikiniams požymiams nustatyti. Visi pastebėjimai apie kiekvieną pelę yra sistemingai užrašomi. Į stebėsenos planus turi būti įtraukti kriterijai, pagal kuriuos galima tuoj pat nustatyti peles, kurioms pasireiškė sisteminis toksiškumas, per didelis vietinis odos dirginimas arba odos ėsdinimas, kad gyvūnus būtų galima numarinti (36).

Kūno masė

29. Kaip nurodyta 25 skirsnyje, atskirai kiekvieno gyvūno masė išmatuojama bandymo pradžioje ir po numatyto humaniško numarinimo.

REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS

30. Kiekvienos poveikio grupės rezultatai išreiškiami kaip vidutinis SI. SI gaunamas dalijant kiekvienos bandomosios medžiagos grupės vidutinę RLU/gyvūnui vertę ir PC grupės vidutinę RLU/gyvūnui vertę iš tirpiklio/VC grupės vidutinės RLU/gyvūnui vertės. Taigi, VC vidutinė SI vertė lygi 1.

▼M3

31. Vertinant rezultatus, atsakas laikoma teigiamu, jei SI ≥ 1,8 (10). Tačiau, sprendžiant, ar ribinis rezultatas (t. y. SI vertė yra nuo 1,8 iki 2,5) turi būti paskelbtas teigiamu, galima atsižvelgti į dozės ir atsako sąryšio stiprumą, statistinį reikšmingumą ir tirpiklio/nešiklio bei PC atsakų nuoseklumą (2) (3) (37).

32. Kai gaunamas teigiamas ribinis atsakas (SI yra nuo 1,8 iki 2,5), tyrėjai gali pageidauti įvertinti papildomą informaciją, pvz., dozės ir atsako sąryšį, sisteminio toksiškumo arba per didelio sudirginimo požymius ir, kai tinka, statistinį reikšmingumą kartu su SI vertėmis, kad patvirtintų, jog tokie rezultatai iš tiesų teigiami (10). Reikia atsižvelgti ir į įvairias bandomosios medžiagos savybes, įskaitant tai, ar jos struktūra gimininga žinomų odą jautrinančių medžiagų struktūrai, ar ji sukelia per didelį pelių odos dirginimą, ir pastebimo dozės ir atsako sąryšio tipą. Šie ir kiti aspektai yra išsamiai aptarti kitur (4).

33. Surenkant duomenis apie kiekvieną pelę galima statistiškai išanalizuoti dozės ir atsako sąryšį tuose duomenyse ir jo laipsnį. Atliekant bet kokį statistinį įvertinimą, galima įtraukti dozės ir atsako sąryšio vertinimą ir tinkamai pakoreguotus bandymo grupių palyginimus (pvz., suporuotų dozavimo grupių palyginimus su lygiagrečiomis tirpiklio/VC). Į statistinę analizę gali būti įtraukta, pvz., tiesinė regresija arba Viljamso tyrimas, skirtas dozės ir atsako sąryšio tendencijoms įvertinti, ir suporuotų rezultatų palyginimų Daneto tyrimas. Rinkdamasis tinkamą statistinės analizės metodą tyrėjas turi turėti omenyje galimus variantiškumų skirtingumus ir kitas susijusias problemas, dėl kurių gali prireikti duomenų transformacijos ar neparametrinės statistinės analizės. Bet kuriuo atveju tyrėjui gali tekti atlikti SI skaičiavimus ir statistinę analizę su tam tikrai duomenų taškais (kartais vadinamais „riktais“) ir be jų.

DUOMENYS IR ATASKAITŲ TEIKIMAS

Duomenys

34. Duomenys pateikiami lentelėse, nurodant atskirų gyvūnų RLU vertes, DPM/gyvūnui grupės vidurkis, atitinkamas paklaidos rodiklis (pvz., SD, SEM) ir kiekvienos dozės grupės vidutinis SI, palygintas su lygiagrečios tirpiklio / nešiklio grupės rodikliu.

Bandymo ataskaita

35. Bandymo ataskaitoje pateikiama ši informacija:

Bandomoji ir kontrolinė cheminės medžiagos

— tapatumo duomenys (pvz., CAS numeris ir EC numeris, jei yra; šaltinis; grynumas; žinomos priemaišos; partijos numeris),

— fizikinė būsena ir fizikinės ir cheminės savybės (pvz., lakumas, stabilumas, tirpumas),

— jei tai mišinys – jo sudėtis ir komponentų procentinė dalis.

Tirpiklis / nešiklis

— tapatumo duomenys (grynumas; koncentracija (jei tinka); naudojamas tūris),

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas.

▼M3

Bandomo gyvūnai

— CBA pelių šaltinis,

— gyvūnų mikrobiologinė būsena, jei žinoma,

— gyvūnų skaičius ir amžius,

— gyvūnų šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.

Bandymo sąlygos

— ATP rinkinio šaltinis, partijos numeris ir gamintojo kokybės užtikrinimo / kokybės kontrolės duomenys,

— išsami informacija apie bandomosios medžiagos ruošimą ir užtepimą,

— dozės pasirinkimo pagrindimas (įskaitant atrankinio bandymo rezultatus, jei bandymas buvo daromas),

— naudotos nešiklio ir bandomosios medžiagos koncentracijos vertės, suminis užteptos medžiagos kiekis,

— išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę (įskaitant pašaro tipą ar šaltinį, vandens šaltinį),

— poveikio medžiaga ir mėginių ėmimo tvarkaraščiai,

— toksiškumo matavimo metodai,

— tyrimo rezultatų vertinimo kaip teigiami arba neigiami kriterijai,

— išsami informacija apie bet kokius nukrypimus nuo protokolo ir paaiškinimas, kaip tas nukrypimas paveiks tyrimo sistemą ir rezultatus.

Patikimumo tikrinimas

— paskutinės patikimumo patikros rezultatų santrauka, įskaitant informaciją apie medžiagą, koncentraciją ir naudojamą nešiklį,

— bandymo laboratorijoje lygiagrečiai ir (arba) anksčiau sukaupti PC ir lygiagrečiai gauti neigiamos (tirpiklio / nešiklio) kontrolės duomenys,

— jei lygiagreti PC nebuvo naudojama, naujausio periodinio PC bandymo data ir laboratorijos ataskaita ir ataskaita su laboratorijos anksčiau sukauptais PC duomenimis, pagrindžiančiais lygiagrečios PC nenaudojimą.

Rezultatai

— atskirų pelių masė dozės gavimo ir numatyto numarinimo dieną; taip pat kiekvienos poveikio grupės vidurkis ir atitinkamas paklaidos rodiklis (pvz., SD, SEM),

— toksinio poveikio atsiradimo laikas ir požymiai, įskaitant kiekvieno gyvūno odos dirginimą medžiagos užtepimo vietoje, jei yra,

— kiekvieno gyvūno numarinimo ir ATP matavimo laikas,

— kiekvienos poveikio grupės atskiros pelės RLU ir SI verčių lentelės,

— kiekvienos poveikio grupės RLU/pelei vidurkis ir atitinkamas paklaidos rodiklis (pvz., SD, SEM) ir kiekvienos poveikio grupės riktų analizės rezultatai,

▼M3

— apskaičiuotas SI ir atitinkamas variantiškumo matas, kuriuo atsižvelgiama į atskirų gyvūnų rezultatų variantiškumą tiek bandomosios medžiagos, tiek kontrolinėje grupėse,

— dozės ir atsako sąryšis,

— statistinė analizė, jei tinka.

Rezultatų aptarimas

— trumpas rezultatų, dozės ir atsako sąryšio analizės ir statistinės analizės, jei tinka, paaiškinimas, padarant išvadą, ar bandomoji medžiaga turi būti laikoma odos jautrikliu.

1.1. **NUORODOS**

(1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol*., 34, 999–1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol*., 34, 985–997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.,* 36, 327–333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, 49–59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99–4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258–273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol. 34*, 274–286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process.*Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249–257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10–7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint.*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.,* 58, 1–10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.,* 58, 11–26.

(14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol*., 46, 1896–1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 55, 90–96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth*., 160, 81–88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth*., 72, 127–132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.,* 24, 27–34.

(20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol*., 305, 346–370.

(21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09–7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol*., 238, 71–89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*., 93, 13–31.

(25) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol*., 21, 195–206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 153, 83–94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.,* 8, 245–256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol*., 22, 491–506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60–68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721–728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*., 115, 1023–1028.

(35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/-JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical SAFEty Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(36) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in SAFEty Evaluation*, Environmental Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health,* 53, 563–79.

(38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment,* Environment, Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių artumas. Tikslumas yra bandymo metodo naudojimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo metodo rezultatų dalį (38).

Palyginamoji medžiaga – jautrinanti arba nejautrinanti medžiaga, naudojama kaip bandomosios medžiagos palyginimo standartas. Palyginamoji medžiaga turi pasižymėti tokiomis savybėmis: i) pastoviu (-iais) ir patikimu (-ais) šaltiniu (-iais), ii) struktūriniu ir funkciniu panašumu į bandomų medžiagų klasę, iii) žinomomis fizikinėmis ir cheminėmis charakteristikomis, iv) patvirtinančiais duomenimis apie žinomus poveikius ir v) žinomu potencialu norimų atsakų intervale.

Klaidingai neigiamas rezultatas – bandymo metodu bandomoji medžiaga neteisingai įvertinta kaip neigiama arba neaktyvi, nors iš tiesų yra teigiama arba aktyvi.

Klaidingai teigiamas rezultatas – bandymu bandomoji medžiaga neteisingai įvertinta kaip teigiama arba aktyvi, nors iš tiesų yra neigiama arba neaktyvi.

Pavojus – neigiamo poveikio sveikatai arba ekologijai galimybė. Neigiamas poveikis pasireiškia tik tada, jei veikimas medžiaga yra pakankamo lygio.

Atkuriamumas tarp laboratorijų – laipsnio, kuriuo skirtingos kvalifikuotos laboratorijos, taikydamos tą patį protokolą ir bandančios tas pačias bandomąsias medžiagas, gali gauti kokybiškai ir kiekybiškai panašius rezultatus, matas. Atkuriamumas tarp laboratorijų nustatomas atliekant pradinio tinkamumo patvirtinimo ir tinkamumo pavirtinimo procesus ir rodo laipsnį, kuriuo bandymą galima sėkmingai perkelti tarp laboratorijų; tai dar vadinama tarplaboratoriniu atkuriamumu (38).

Atkuriamumas laboratorijoje – laipsnio, kuriuo kvalifikuoti darbuotojai toje pačioje laboratorijoje gali sėkmingai atkartoti rezultatus, taikydami konkretų protokolą skirtingu metu, matas. Dar vadinamas laboratoriniu atkuriamumu (38).

Riktas – pastebėjimas, kad vertė labai skiriasi nuo kitų atsitiktinio populiacijos ėminio verčių.

Kokybės užtikrinimas – valdymo procesas, per kurį asmenys, nepriklausomi nuo atliekančiųjų bandymus, įvertina, kaip laboratorija laikosi bandymo standartų, reikalavimų ir užrašų saugojimo procedūrų bei duomenų perdavimo tikslumo.

Patikimumas – juo įvertinamas laipsnis, kuriuo bandymo metodas gali būti ilgainiui atkartojamai atliekamas vienoje ir skirtingose laboratorijose, taikant tą patį protokolą. Jis įvertinamas skaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų (38).

Odos jautrinimas – imunologinis procesas, vykstantis paveikų individą išoriškai paveikus cheminiu alergenu, kuris sukelia odos imuninį atsaką, dėl kurio gali atsirasti kontaktinis jautrinimas.

Dirginimo rodiklis (angl. SI) – vertė, apskaičiuojama bandomosios medžiagos jautrinimo potencialui įvertinti – tai yra paveiktų grupių proliferacijos sąryšio su lygiagrečios nešiklio kontrolinės grupės proliferacija koeficientas.

Bandomoji medžiaga (dar vadinama bandomąja chemine medžiaga) – bet kuri medžiaga ar mišinys, bandomi taikant šį bandymų metodą.

▼M3

B.51. **ODOS JAUTRINIMAS. VIETINIO LIMFMAZGIO BANDYMAS. BrdU-ELISA**

ĮVADAS

1. OECD Cheminių medžiagų bandymo gairės ir ES bandymų metodai periodiškai persvarstomi atsižvelgiant į mokslo pažangą, kintančias reguliavimo reikmes ir gyvūnų gerovės sumetimais. Pirmasis bandymų metodas (BM) (B.42) pelių odos jautrinimui nustatyti – vietinio limfmazgio bandymas (LLNA; OECD bandymų metodika 429; šio priedo B.42 skyrius) buvo persvarstytas (1) šaltinis ir šio priedo B.42 skyrius). LLNA tinkamumo patvirtinimas ir susijusių darbų apžvalga paskelbta (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) šaltiniuose. Pagal LLNA limfocitų proliferacijai matuoti naudojamas radioizotopinis timidinas arba jodas ir todėl tyrimas yra riboto naudojimo, kadangi sunku įsigyti, naudoti ar pašalinti radioaktyvias medžiagas. LLNA: BrdU-ELISA [imunofermentinė analizė] yra neradioaktyvaus pobūdžio LLNA modifikacija, kurioje limfocitų proliferacijai matuoti naudojamos neradioaktyvus 5-brom-2-deoksiuridinas (BrdU) (Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos [CAS] Nr. 59–14–3) ELISA tyrimo sistemoje. LLNA: BrdU-ELISA tinkamumą patvirtino, apsvarstė ir rekomenduoja tarptautinė nepriklausoma mokslinė tarpusavio vertinimo komisija; jis laikomas naudingu su tam tikrais apribojimais identifikuojant odą jautrinančias ir nejautrinančias chemines medžiagas (10) (11) (12). Šis BM yra parengtas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) sukeliamam gyvūnų odos jautrinimo potencialui įvertinti. Pagal šio priedo B.6 skyrių ir OECD bandymų metodika 406 naudojami bandymai su jūros kiaulytėmis, pirmiausia maksimizacijos ir Buehlerio bandymas su jūros kiaulytėmis (13). LLNA (šio priedo B.42 skyrius; OECD bandymų metodika 429) ir dvi neradioaktyvaus pobūdžio modifikacijos, LLNA: BrdU-ELISA (šio priedo B.51 skyrius; OECD bandymų metodika 442 B) ir LLNA: DA (šio priedo B.50 skyrius; OECD bandymų metodika 442 A), yra pranašesnės už bandymus su jūros kiaulytėmis pagal B.6 and OECD bandymų metodiką 406 (13) tuo, kad sumažinamas ir patobulinamas gyvūnų naudojimas.

2. Panašiai, kaip LLNA, LLNA: BrdU-ELISA metodu tiriamas odos jautrinimo indukcinis etapas ir gaunami kiekybiniai duomenys, tinkami dozės ir atsako sąryšiui įvertinti. Be to, galimybė aptikti odos jautriklius nenaudojant DNR žymėjimo izotopų, panaikina galimybę darbuotojams būti apšvitintiems dirbant ir atliekų pašalinimo sunkumus. Dėl to savo ruožtu galima naudoti daugiau pelių odos jautrikliams aptikti, todėl galima dar sumažinti jūros kiaulyčių naudojimą odos jautrinimo potencialui išbandyti (t. y. B.6; OECD bandymų metodika 406) (13).

APIBRĖŽTYS

3. Vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

4. LLNA: BrdU-ELISA yra modifikuotas LLNA metodas galimai odą jautrinančioms cheminėms medžiagoms identifikuoti su tam tikrais apribojimais. Nereikia manyti, kad visais atvejais vietoj LLNA arba bandymo su jūrų kiaulytėmis (t. y. B.6; OECD bandymų metodika 406) (13), reikia taikyti LLNA: BrdU-ELISA bandymą; tai labiau reiškia, kad šis bandymas yra lygiavertis ir gali būti taikomas kaip pakaitinis metodas, pagal kurį teigiamų ir neigiamų rezultatų paprastai nebereikia papildomai patvirtinti (10) (11). Prieš atlikdama tyrimą, bandymų laboratorija turi apsvarstyti visą turimą informaciją apie bandomąją medžiagą. Tokia informacija apima medžiagos

▼M3

tapatumą ir cheminę struktūrą, jos fizikines ir chemines savybes, visų kitų bandomosios medžiagos *in vitro* arba *in vivo* toksiškumo bandymų rezultatus ir giminingos struktūros medžiagų toksikologinius duomenis. Ši informacija turi būti apsvarstyta, siekiant nustatyti, ar LLNA: BrdU-ELISA tinka bandomajai medžiagai (atsižvelgiant į tam tikrų medžiagų tipų nesuderinamumą su LLNA: BrdU-ELISA (žr. 5 skirsnį)), ir parinkti tinkamą dozę.

5. LLNA: BrdU-ELISA yra *in vivo* metodas, todėl jautrinančiam poveikiui dėl alerginio sąlyčio įvertinti naudojami gyvūnai. Tačiau jis turi galimybę sumažinti gyvūnų naudojimą šiam tikslui, palyginti su bandymais su jūros kiaulytėmis (B.6; OECD bandymų metodika 406) (13). Be to, LLNA: BrdU-ELISA iš esmės pagerina būdą, kuriuo gyvūnai naudojami jautrinimui dėl alerginio sąlyčio bandyti, kadangi, skirtingai nei B.6 and OECD bandymų metodika 406, taikant LLNA: BrdU-ELISA nereikia sukelti ypač didelio odos jautrumo reakcijų. Be to, taikant LLNA: BrdU-ELISA nereikia naudoti adjuvantų, kurie reikalingi darant maksimizacijos bandymą su jūrų kiaulytėmis (šio priedo B.6 skyrius, 13). Taigi, LLNA: BrdU-ELISA sumažina gyvūnų kančias. Nepaisant LLNA: BrdU-ELISA pranašumų prieš B.6 ir OECD bandymų metodiką 406 (13), yra tam tikrų apribojimų, dėl kurių gali tekti taikyti B.6 ir OECD bandymų metodiką 406 (pvz., tiriant kai kuriuos metalus, klaidingi teigiami rezultatai tiriant tam tikrus odos dirgiklius [pvz., kai kurias paviršinio aktyvumo tipo chemines medžiagas] (6) (1 ir šio priedo B.42 skyrius), bandomosios medžiagos tirpumas). Be to, dėl cheminių klasių arba medžiagų, kuriose yra funkcinių grupių, veikiančių kaip galimos klaidinančiosios medžiagos (15), gali tekti atlikti bandymus su jūrų kiaulytėmis (t. y. B.6; OECD bandymų metodika 406 (13)). Nustatytus LLNA apribojimus (1 ir šio priedo B.42 skyrius) rekomenduojama taikyti ir LLNA: BrdU-ELISA (10). Išskyrus tokius nustatytus apribojimus. LLNA: BrdU-ELISA turi būti tinkamas bandant bet kurias chemines medžiagas, nebent tos medžiagos turi tokių savybių, kurios kenktų LLNA: BrdU-ELISA tikslumui. Be to, reikia išnagrinėti ribinių teigiamų rezultatų galimybę, kai dirginimo rodiklio (SI) vertės gaunamos nuo 1,6 iki 1,9 (žr. 31, 32 skirsnius). Tai grindžiama 43 medžiagų tinkamumo patvirtinimo duomenų baze, taikant SI ≥ 1,6 (žr. 6 skirsnį), kurioje LLNA: BrdU-ELISA teisingai identifikavo visus 32 LLNA jautriklius, bet neteisingai identifikavo du iš 11 LLNA nejautriklių, kurių SI vertės nuo 1,6 iki 1,9 (t. y. ribinis teigiamas rezultatas) (10). Tačiau, kadangi tas pats duomenų rinkinys buvo naudojamas SI vertėms nustatyti ir tyrimo prognozinėms savybėms apskaičiuoti, pateikti rezultatai gali pervertinti tikrąsias prognozines savybes.

BANDYMO METODO PRINCIPAS

6. Pagrindinis principas, kuriuo pagrįstas LLNA: BrdU-ELISA metodas, yra jautrinančiųjų medžiagų sukelta pirminė limfocitų proliferacija cheminės medžiagos poveikio vietą drenuojančiame limfmazgyje. Ši proliferacija yra proporcinga naudojamai dozei ir alergeno gebai jautrinti, taigi tai yra paprastas būdas objektyviai ir kiekybiškai išmatuoti jautrinimą. Proliferacija įvertinama palyginant vidutinę proliferaciją bandymo grupėse ir nešiklį gavusiose kontrolinėse grupėse (VC). Nustatomas vidutinės proliferacijos paveiktose grupėse ir kontrolinėse VC grupėse santykis, vadinamas SI, kuris turi būti ≥ 1,6, kad bandomoji medžiaga galėtų būti toliau vertinama

▼M3

kaip galinti odą dirginanti medžiaga. Čia aprašytos procedūros yra pagrįstos BrdU kiekio matavimu padidėjusiam proliferuojančių ląstelių skaičiui nustatyti drenuojančiuose ausų limfmazgiuose. BrdU yra analogiškas timidinui ir panašiai įsiterpia į proliferuojančių ląstelių DNR. BrdU įterpimas matuojamas ELISA metodu, pagal kurį naudojamas BrdU specifinis antikūnas, kuris dar pažymimas peroksidaze. Kai pridedama medžiagos, peroksidazė sureaguoja su substratu ir susidaro spalvotas produktas, kuris kiekybiškai įvertinamas pagal konkretų sugerties laipsnį mikrotitravimo plokštelių skaitytuvu.

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Gyvūnų rūšių parinkimas

7. Šiam bandymui pasirinkta gyvūnų rūšis – pelės. LLNA: BrdU-ELISA tinkamumo patvirtinimo tyrimai buvo atlikti išimtinai su CBA/JN veisle, kuri dėl to laikoma tinkamiausia veisle (10) (12). Naudojamos suaugusios CBA/Ca arba CBA/J veislės pelių patelės, kurios yra neturėjusios vados ir neapvaisintos. Pradedant bandymą, gyvūnų amžius turi būti 8–12 savaičių, o gyvūnų masės skirtumas turi būti kiek įmanoma mažesnis ir neviršyti 20 % vidutinės masės Galima naudoti kitas veisles ir patinus, jei yra gauta pakankamai duomenų, kurie rodytų, kad nėra esminių veislei ir (arba) lyčiai būdingų atsako į LLNA: BrdU-ELISA skirtumų

Laikymo ir šėrimo sąlygos

8. Pelės turi būti laikomos grupėmis (16), nebent pateikiamas pakankamas loginis pagrindas, kodėl peles reikia laikyti atskirai. Patalpos, kurioje laikomi bandomieji gyvūnai, temperatūra turi būti 22 ± 3 °C. Nors santykinė oro drėgmė turi būti ne mažesnė kaip 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikia užtikrinti 50–60 %. Apšvietimas turi būti dirbtinis, taikant 12 val. šviesos ir 12 val. tamsos ciklą. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, neribojant geriamo vandens kiekio.

Gyvūnų ruošimas

9. Gyvūnai pasirenkami atsitiktinai, ženklinami, kad būtų įmanoma kiekvieną identifikuoti (tačiau netaikomas joks ausų ženklinimas), ir laikomi narveliuose mažiausiai 5 paras prieš pradedant taikyti dozes, kad galėtų priprasti prie laboratorijos sąlygų. Prieš veikimo medžiaga pradžią visi gyvūnai apžiūrimi, ar neturi pastebimų odos pažeidimų.

Dozavimo tirpalų paruošimas

10. Prieš užtepant ant pelių ausų, kietosios cheminės medžiagos ištirpinamos arba paskleidžiamos tirpikliuose/nešikliuose ir, jei reikia, atskiedžiamos. Skystos cheminės medžiagos gali būti užtepamos grynos arba atskiestos. Netirpios cheminės medžiagos, pvz., tos, kurių paprastai pasitaiko medicinos įrangoje, prieš užtepant ant pelių ausų, padidintosios ekstrakcijos būdu išskiriamos atitinkamame tirpiklyje, kad būtų gautos visos galimos išskirti sudedamosios dalys. Bandomosios medžiagos paruošiamos kasdien, nebent stabilumo duomenys rodo, kad jas galima laikyti ilgesnį laiką.

Patikimumo tikrinimas

11. Teigiamo poveikio kontrolinės cheminės medžiagos (angl. *positive control chemicals*, PC) naudojamos siekiant parodyti tyrimo tinkamumą joms reaguojant pakankamu ir atkartojamu jautrumu kaip jautrinančioms bandomosioms medžiagoms, kurių atsako dydis gerai apibūdintas. Naudoti lygiagrečias PC rekomenduojama todėl, kad jos parodo laboratorijos kompetenciją sėkmingai atlikti bandymą per kiekvieną tyrimą ir įvertinti atkuriamumą ir palyginamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų. Kiekvieno tyrimo metu naudoti PC reikalauja ir kai kurios reguliavimo institucijos, todėl naudotojai

▼M3

raginami pasikonsultuoti su atitinkamomis institucijomis prieš vykdydami LLNA: BrdU-ELISA. Taigi, skatinama įprastai naudoti lygiagrečią PC, kad būtų išvengta papildomų bandymų su gyvūnais, reikalingų laikytis reikalavimų, kuris gali kilti PC naudojant tik periodiškai (žr. 12 skirsnį). PC turi sukelti teigiamą LLNA: BrdU-ELISA atsaką esant tokiam poveikio lygiui, kuris numatytas padidinti SI ≥ 1,6, palyginti su neigiamo poveikio kontrolinės medžiagos (NC) grupe. PC dozė turi būti parenkama taip, kad nesukeltų per didelio odos sudirginimo ar sisteminio toksiškumo, o atsako sukėlimas būtų atkuriamas, bet ne per didelis (pvz., SI > 14 būtų laikomas per dideliu). Tinkamiausia PC yra 25 % heksilcinamono aldehidas (CAS Nr. 101–86–0) ir 25 % eugenolis (CAS Nr. 97–53–0,) acetone: alyvų aliejuje (4:1, tūrio dalys). Gali pasitaikyti aplinkybių, kai, pateikus pakankamai įrodymų, galima naudoti kitas PC, atitinkančias pirmiau nurodytus kriterijus.

12. Nors naudoti lygiagrečią PC grupę rekomenduojama, gali būti situacijų, kuriomis gali pakakti periodinių bandymų naudojant PC (t. y. ≤ 6 mėnesių intervalais), jei tai laboratorijos, kurios reguliariai atlieka LLNA: BrdU-ELISA (t. y. atlieka LLNA: BrdU-ELISA ne rečiau kaip kartą per mėnesį) ir turi įsteigusios anksčiau sukauptų PC duomenų bazę, kuri rodo laboratorijos gebėjimą gauti atkuriamus ir tikslius rezultatus su PC. Pakankamas profesionalumas atliekant LLNA: BrdU-ELISA tyrimus gali būti sėkmingai įrodomas pastoviai gaunant teigiamus rezultatus naudojant PC ne mažiau kaip 10-yje nepriklausomų bandymų, atliktų per pagrįstą laikotarpį (t. y. trumpesnį kaip vieneri metai).

13. Lygiagreti PC visada turi būti naudojama, jei yra procedūrinių LLNA: BrdU-ELISA pakeitimų (pvz., pasikeitė parengti darbuotojai, pakeistos bandymo metodo medžiagos ir (arba) reagentai, pakeista bandymo metodo įranga, pakeistas bandomųjų gyvūnų tiekėjas), o tokie pakeitimai turi būti užregistruoti laboratorijos ataskaitose. Turi būti apsvarstytas tokių pasikeitimų poveikis anksčiau sukauptų duomenų bazės tinkamumui, vertinant būtinybę sukurti naują anksčiau sukauptų duomenų bazę, skirtą PC rezultatų nuoseklumui dokumentuoti.

14. Tyrėjai turi suprasti, kad sprendimas vykdyti PC tyrimą periodiškai, o ne nuolat, turi padarinių neigiamų tyrimų rezultatų, gautų be lygiagrečios PC naudojimo, laikotarpiu tarp kiekvieno periodinio PC tyrimo, tinkamumui ir priimtinumui. Pvz., jei, atliekant periodinį PC tyrimą, gaunamas klaidingas neigiamas rezultatas, gali būti kvestionuojami neigiami bandomosios medžiagos rezultatai, gauti laikotarpiu nuo paskutinio priimtino periodinio PC tyrimo iki nepriimtino periodinio PC tyrimo. Šių rezultatų padariniai turi būti stropiai įvertinti sprendžiant, ar nuolat vykdyti lygiagrečius, ar tik periodinius PC tyrimus. Taip pat reikia apsvarstyti galimybę lygiagrečios PC grupės tyrimams naudoti mažiau gyvūnų, jei tai moksliškai pateisinama ir jei laboratorija savo anksčiau sukauptais duomenimis įrodo, kad galima naudoti mažiau pelių (17).

15. Nors PC turi būti bandoma nešiklyje, kuris žinomai sukelia pastovų atsaką (pvz., acetono ir alyvų aliejaus mišinyje; 4:1, tūrio dalys), gali būti tam tikrų reguliavimo situacijų, kai gali prireikti ištirti ir nestandartinį nešiklį (kliniškai/chemiškai susijusį preparatą) (18). Jei lygiagreti PC bandoma kitokiame nešiklyje nei bandomoji medžiaga, turi būti naudojama atskira VC, skirta lygiagrečiai PC.

▼M3

16. Tais atvejais, kai vertinamos tam tikrai cheminei klasei ar atsakų sričiai priklausančios bandomosios medžiagos, gali būti naudojamos ir palyginamosios medžiagos, kad būtų parodyta, jog bandymo metodas tinkamai veikia nustatant šių bandomųjų medžiagų odos jautrinimo potencialą. Atitinkamos palyginamosios medžiagos turi pasižymėti šiomis savybėmis:

— struktūriniu ir funkciniu panašumu į bandomosios cheminės medžiagos klasę,

— žinomomis fizinėmis ir cheminėmis charakteristikomis,

— apie jas turi būti patvirtinančių duomenų, gautų LLNA: BrdU-ELISA tyrimais,

— apie jas turi būti patvirtinančių duomenų, gautų kitų gyvūnų modeliais ir (arba) iš žmonių.

BANDYMO EIGA

Gyvūnų skaičius ir dozių dydis

17. Vienai dozės grupei naudojami ne mažiau kaip keturi gyvūnai, naudojant ne mažiau kaip tris bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas ir vieną lygiagrečią NC grupę, paveikiamą tik bandomosios medžiagos nešikliu, ir PC grupę (lygiagrečią arba naujausią, remiantis laboratorijos politika pagal 11–15 skirsnius). Reikia apsvarstyti poreikį išbandyti keletą PC dozių, ypač bandant PC periodiškai. Išskyrus neveikimą bandomąja medžiaga, kontrolinių grupių gyvūnai turi būti prižiūrimi ir jais rūpinamasi taip pat, kaip poveikio grupės gyvūnais.

18. Dozė ir nešiklis parenkami laikantis 2 ir 19 šaltiniuose pateikiamų rekomendacijų. Paeilinės dozės paprastai parenkamos iš atitinkamos koncentracijos verčių eilės, pvz., 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % ir t. t. Taikomai koncentracijos verčių eilei turi būti skirtas tinkamas loginis pagrindas. Reikia atsižvelgti į visą turimą toksikologinę informaciją (pvz., apie ūminį toksiškumą ir odos dirginimą) ir struktūrinę bei fizikinių ir cheminių savybių informaciją apie dominančią bandomąją cheminę medžiagą (ir (arba) struktūriškai panašias medžiagas), kad trys iš eilės taikomos koncentracijos vertės būtų parinktos taip, kad didžiausios koncentracijos poveikis būtų kuo didesnis, bet išvengta sisteminio toksiškumo ir (arba) per didelio vietinio odos dirginimo (19) (20 ir šio priedo B.4 skyrius). Jei tokios informacijos neturima, gali prireikti pradinio atrankinio bandymo (žr. 21–24 skirsnius).

19. Nešiklis neturi kenkti ar iškraipyti bandymo rezultato ir turi būti parinktas taip, kad būtų kuo geresnis tirpumas, siekiant gauti didžiausią įmanomą koncentraciją gaminant tirpalą/suspensiją, tinkamą bandomajai medžiagai užtepti. Rekomenduojami nešikliai yra acetono ir alyvų aliejaus mišinys (4:1, tūrio dalys), *N,N*-dimetilformamidas, metiletilketonas, propilenglikolis ir dimetilsulfoksidas (6), tačiau galima naudoti kitus nešiklius, jei pateikiamas tinkamas loginis pagrindas. Tam tikrais atvejais papildomai kontrolei gali tekti naudoti klinikiniu požiūriu atitinkantį tirpiklį arba komercinį preparatą, turintį bandomosios medžiagos. Reikia ypač stengtis užtikrinti, kad nešiklyje būtų hidrofilinių bandomųjų medžiagų, kurios drėkintų odą ir iš karto nenutekėtų, įdedant soliubilizavimo priemonių (pvz., 1 % „Pluronic® L92“). Taigi reikia vengti naudoti grynai vandeninius nešiklius.

▼M3

20. Apdorojant atskirų pelių limfmazgius galima įvertinti nepastovumą tarp gyvūnų ir statistiškai palyginti skirtumus tarp bandomosios medžiagos ir VC grupės matavimo rezultatų (žr. 33 skirsnį). Be to, tik tada, kai surenkami atskirų gyvūnų duomenys, realu įvertinti galimybę sumažinti pelių skaičių PC grupėje (17). Negana to, kai kurios reguliavimo institucijos reikalauja gauti atskirtų gyvūnų duomenis. Reguliarus atskirų gyvūnų duomenų rinkimas turi rūpinimosi gyvūnų gerove privalumų, nes išvengiama dvigubo bandymo, kurio reikėtų, jei bandomosios medžiagos rezultatus, iš pradžių gautus kitu būdu (pvz., iš jungtinių gyvūnų duomenų), vėliau vertintų reguliavimo institucijos, kurios vadovaujasi kitais reikalavimais (pvz., atskirų gyvūnų duomenimis).

Atrankinis bandymas

21. Jei neturima informacijos, skirtos didžiausiai bandomai dozei nustatyti (žr. 18 skirsnį), reikia atlikti atrankinį bandymą, kad būtų nustatytas tinkamas dozės lygis pagal LLNA: BrdU-ELISA metodą. Atrankinio bandymo tikslas – nustatyti gaires didžiausiam pagrindinio LLNA: BrdU-ELISA tyrimo dozės lygiui parinkti, kai neturima informacijos apie koncentraciją, kuri sukelia sisteminį toksiškumą (žr. 24 skirsnį) ir (arba) per didelė vietinį odos dirginimą (žr. 23 skirsnį). Didžiausias bandomas dozės lygis turi būti 100 % bandomosios medžiagos koncentracija, jei tai skysčiai, arba didžiausia įmanoma koncentracija, jei tai kietosios medžiagos ar suspensijos.

22. Atrankinis bandymas atliekamas tokiomis pačiomis sąlygomis kaip ir pagrindinis LLNA: BrdU-ELISA tyrimas, išskyrus tai, kad nevertinama limfmazgių proliferacija ir galima tirti mažiau gyvūnų kiekvienoje dozės grupėje. Siūloma naudoti vieną arba du gyvūnus vienai dozės grupei. Visos pelės kasdien stebimos, ar poveikio vietoje nepasireiškia sisteminio toksiškumo ar vietinio dirginimo klinikiniai požymiai. Kūno masė užrašoma prieš bandymą ir prieš jį pabaigiant (6 dieną). Abi kiekvienos pelės ausys stebimos, ar nėra eritemos ir įvertinama pagal 1 lentelę (20 ir šio priedo B.4 skyrius). 1 dieną (prieš dozę), 3 dieną (praėjus maždaug 48 val. po pirmosios dozės) ir 6 dieną stormačiu (pvz., skaitmeniniu mikrometru arba ciferblatiniu storio matuokliu) atliekami ausų storio matavimai. Be to, 6 dieną ausų storis gali būti įvertinamas ausų skylamušio svorio matavimais, atliekamais po to, kai gyvūnai humaniškai numarinami. Per didelį vietinį dirginimą rodo $\geq$ 3 edemos įvertis ir (arba) $\geq$ 25 % ausies storio padidėjimas bet kurią matavimo dieną (21) (22). Didžiausia pagrindiniam LLNA: BrdU-ELISA tyrimui parenkama dozė yra antra pagal dydį dozė iš atrankinio bandymo koncentracijų eilės (žr. 18 skirsnį), nesukelianti sisteminio toksiškumo ir (arba) per didelio vietinio odos dirginimo.

1 lentelė

Eritemos įverčiai

Pastebėjimas	Įvertis
Eritemos nėra	0
Labai nedidelė eritema (vos juntama)	1
Aiški eritema	2

▼M3

Pastebėjimas	Įvertis
Nuo vidutinės iki sunkios eritemos	3
Nuo sunkios eritemos (buroko raudonumo) iki šašo susidarymo, kuomet nebeįmanoma įvertinti eritemos sunkumo	4

23. Taikant LLNA metodą, dirgikliams nustatyti, be ausų storio padidėjimo 25 % (21) (22), naudojamas ir statistiškai reikšmingas paveiktų pelių ausų storio padidėjimas, palyginti su kontrolinėmis pelėmis (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Vis dėlto, nors statistiškai reikšmingas padidėjimas galimas ir ausies storiui esant mažesniam kaip 25 %, tai nėra siejama konkrečiai su per dideliu dirginimu (25) (26) (27) (28) (29).

24. Šie klinikiniai požymiai gali rodyti sisteminį toksiškumą (30), kai yra naudojami kaip integruoto įvertinimo dalis, todėl gali nurodyti didžiausią dozės lygį, skirtą pagrindiniam LLNA: BrdU-ELISA: nervų sistemos funkcijos pokyčiai (pvz., piloerekcija, ataksija, drebulys ir konvulsijos); elgsenos pokyčiai (pvz., agresyvumas, prausimosi pokyčiai, žymus aktyvumo lygio pokytis); kvėpavimo būdo pokyčiai (t. y. kvėpavimo dažnio ir intensyvumo pokyčiai, pvz., dusulys, žiopčiojimas ir karkalai) ir ėdalo bei vandens vartojimo pokyčiai. Be to, vertinant turi būti atsižvelgiama į letargijos ir (arba) nereagavimo požymius ir bet kokius didesnio už nedidelį ar trumpalaikį skausmą ir kančią klinikinius požymius arba > 5 % kūno masės sumažėjimą nuo 1 iki 6 dienos, ir į mirtingumą. Gaištantys ar didelio skausmo ir kančios požymius rodantys gyvūnai turi būti humaniškai numarinti (31).

Pagrindinio bandymo eksperimentinis planas

25. Eksperimentinis bandymo planas atrodo taip:

— *1 diena.* Atskirai nustatoma ir užrašoma kiekvieno gyvūno masė ir bet kokie klinikiniai pastebėjimai. Ant kiekvienos ausies išorinės pusės užtepama 25 µl atitinkamai atskiesto bandomosios medžiagos tirpalo, vien tik nešiklio arba PC (lygiagrečios arba naujausios, remiantis laboratorijos politika pagal 11–15 skirsnius).

— *2 ir 3 dienos.* Pakartojama 1 dieną daryta procedūra.

— *4 diena.* Jokio veikimo.

— *5 diena.* Intraoeritonealiai suleidžiama 0,5 ml (5 mg/pelei) BrdU (10 mg/ml) tirpalo.

— *6 diena.* Užrašoma kiekvieno gyvūno masė ir bet kokie klinikiniai pastebėjimai. Praėjus maždaug 24 valandoms (24 h) po BrdU injekcijos gyvūnai humaniškai numarinami. Kiekvienos pelės drenuojamieji ausų limfmazgiai išpjaunami ir kiekvieno gyvūno atskirai apdorojami fosfatiniame buferyje (PBS). Limfmazgių identifikavimo ir skrodimo aprašą bei schemas galima rasti (17) šaltinyje. Norint toliau stebėti vietinę odos atsaką pagrindiniame tyrime, į tyrimo protokolą gali būti įtraukti tokie papildomi parametrai kaip ausų eritemos įverčiai arba ausų storio matavimo rezultatai (gauti storio matuokliu arba ausų skylamušio svorio matavimais atliekant nekroskopiją).

▼M3

Ląstelių suspensijos ruošimas

26. Limfmazgių ląstelių (LNC), išpjautų iš kiekvienos pelės abiejų ausų, pavienių ląstelių suspensija paruošiama švelniai mechaniškai susmulkinant pro 200 μm nerūdijančio plieno tinklelį ar kitu priimtinu pavienių ląstelių suspensijos sudarymo metodu (pvz., panaudojant vienkartinį plastikinį grūstuvą limfmazgiams sutraiškyti ir prakošiant pro #70 nailoninį sietą). LNS suspensijos paruošimo procedūra šiame tyrime labai svarbi, todėl kiekvienas operatorius turi iš anksto įgyti jos įgūdžių. Kadangi NC gyvūnų limfmazgiai maži, svarbu dirbti atsargiai, kad būtų išvengta bet kokio dirbtinio poveikio SI vertėms. Kiekvienu atveju LNC suspensijos tikslinis tūris turi būti pakoreguotas iki nustatyto optimizuoto tūrio (maždaug 15 ml). Optimizuotas tūris nustatomas taip, kad būtų pasiekta 0,1–0,2 vidutinė NC grupės sugertis.

Ląstelių proliferacijos nustatymas (BrdU kiekio limfocitų DNR matavimas)

27. BrdU matuojamas ELISA metodu, naudojant komercinį rinkinį (pvz., „Roche Applied Science“, Mannheim, Vokietija, katalogo Nr. 11 647 229 001). Netrukus, 100 μl LNC suspensijos įlašinama į tris plokščiadugnės mikroplokštelės šulinėlius. Po LNC fiksacijos ir denatūracijos į kiekvieną šulinėlį įdedama antiBrdU antikūnų ir leidžiama sureaguoti. Po to antiBrdU antikūnai pašalinami išplaunant, pridedama substrato tirpalo ir leidžiama sudaryti chromogeną. Tada išmatuojama sugertis esant 370 nm, naudojant standartinį 492 nm bangų ilgį. Visais atvejais tyrimo sąlygos turi būti optimizuotos (žr. 26 skirsnį).

STEBĖJIMAI

Klinikiniai stebėjimai

28. Kiekviena pelė kruopščiai apžiūrima bent kartą per dieną bet kokiems vietinio dirginimui užtepimo vietoje arba sisteminio toksiškumo klinikiniams požymiams nustatyti. Visi pastebėjimai apie kiekvieną pelę yra sistemingai užrašomi. Į stebėsenos planus turi būti įtraukti kriterijai, pagal kuriuos galima tuoj pat nustatyti peles, kurioms pasireiškė sisteminis toksiškumas, per didelis vietinis odos dirginimas arba odos ėsdinimas, kad gyvūnus būtų galima numarinti (31).

Kūno masė

29. Kaip nurodyta 25 skirsnyje, atskirai kiekvieno gyvūno masė išmatuojama bandymo pradžioje ir po numatyto humaniško numarinimo.

REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS

30. Kiekvienos poveikio grupės rezultatai išreiškiami kaip vidutinis SI. SI gaunamas dalijant kiekvienos bandomosios medžiagos grupės vidutinę BrdU ženklinimo rodiklio / gyvūnui vertę ir PC grupės vidutinę BrdU ženklinimo rodiklio / gyvūnui vertę iš tirpiklio/VC grupės vidutinės BrdU ženklinimo rodiklio vertės. Taigi, VC vidutinė SI vertė lygi 1.

BrdU ženklinimo rodiklis nustatomas taip:

$$\text{BrdU ženklinimo rodiklis} = (ABS_{em} - ABS\ blank_{em}) - (ABS_{ref} - ABS\ blank_{ref})$$

Čia: em = skleidžiamų bangų ilgis; ref = standartinis bangų ilgis.

▼M3

31. Vertinant rezultatus, atsakas laikoma teigiamu, jei SI ≥ 1,6 (10). Tačiau, sprendžiant, ar ribinis rezultatas (t. y. SI vertė yra nuo 1,6 iki 1,9) turi būti paskelbtas teigiamu, galima atsižvelgti į dozės ir atsako sąryšio stiprumą, statistinį reikšmingumą ir tirpiklio/nešiklio bei PC atsakų nuoseklumą (3) (6) (32).

32. Kai gaunamas teigiamas ribinis atsakas (SI yra nuo 1,6 iki 1,9), tyrėjai gali pageidauti įvertinti papildomą informaciją, pvz., dozės ir atsako sąryšį, sisteminio toksiškumo arba per didelio sudirginimo požymius ir, kai tinka, statistinį reikšmingumą kartu su SI vertėmis, kad patvirtintų, jog tokie rezultatai iš tiesų teigiami (10). Reikia atsižvelgti ir į įvairias bandomosios medžiagos savybes, įskaitant tai, ar jos struktūra gimininga žinomų odą jautrinančių medžiagų struktūrai, ar ji sukelia per didelį pelių odos dirginimą, ir pastebimo dozės ir atsako sąryšio tipą. Šie ir kiti aspektai yra išsamiai aptarti kitur (4).

33. Surenkant duomenis apie kiekvieną pelę galima statistiškai išanalizuoti dozės ir atsako sąryšį tuose duomenyse ir jo laipsnį. Atliekant bet kokį statistinį įvertinimą, galima įtraukti dozės ir atsako sąryšio vertinimą ir tinkamai pakoreguotus bandymo grupių palyginimus (pvz., suporuotų dozavimo grupių palyginimus su lygiagrečiomis tirpiklio/VC). Į statistinę analizę gali būti įtraukta, pvz., tiesinė regresija arba Viljamso tyrimas, skirtas dozės ir atsako sąryšio tendencijoms įvertinti, ir suporuotų rezultatų palyginimų Daneto tyrimas. Rinkdamasis tinkamą statistinės analizės metodą tyrėjas turi turėti omenyje galimus variantiškumų skirtingumus ir kitas susijusias problemas, dėl kurių gali prireikti duomenų transformacijos ar neparametrinės statistinės analizės. Bet kuriuo atveju tyrėjui gali tekti atlikti SI skaičiavimus ir statistinę analizę su tam tikrai duomenų taškais (kartais vadinamais „riktais“) ir be jų.

DUOMENYS IR ATASKAITŲ TEIKIMAS

Duomenys

34. Duomenys pateikiami lentelėse, nurodant atskirų gyvūnų BrdU ženklinimo rodiklio vertes, BrdU ženklinimo rodiklio/gyvūnui grupės vidurkis, atitinkamas paklaidos rodiklis (pvz., SD, SEM) ir kiekvienos dozės grupės vidutinis SI, palygintas su lygiagrečios tirpiklio/nešiklio grupės rodikliu.

Bandymo ataskaita

35. Bandymo ataskaitoje pateikiama ši informacija:

Bandomoji ir kontrolinė cheminės medžiagos:

— tapatumo duomenys (pvz., CAS numeris ir EC numeris, jei yra; šaltinis; grynumas; žinomos priemaišos; partijos numeris),

— fizikinė būsena ir fizikinės ir cheminės savybės (pvz., lakumas, stabilumas, tirpumas),

— jei tai mišinys – jo sudėtis ir komponentų procentinė dalis.

Tirpiklis / nešiklis:

— tapatumo duomenys (grynumas; koncentracija (jei tinka); naudojamas tūris),

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas.

▼M3

Bandomo gyvūnai:

— CBA pelių šaltinis,

— gyvūnų mikrobiologinė būsena, jei žinoma,

— gyvūnų skaičius ir amžius,

— gyvūnų šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.

Bandymo sąlygos:

— ELISA rinkinio šaltinis, partijos numeris ir gamintojo kokybės užtikrinimo/kokybės kontrolės duomenys (antikūnų jautrumas bei specifiškumas ir aptikimo riba),

— išsami informacija apie bandomosios medžiagos ruošimą ir užtepimą,

— dozės pasirinkimo pagrindimas (įskaitant atrankinio bandymo rezultatus, jei bandymas buvo daromas),

— naudotos nešiklio ir bandomosios medžiagos koncentracijos vertės, suminis užteptos medžiagos kiekis,

— išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę (įskaitant pašaro tipą ar šaltinį, vandens šaltinį),

— poveikio medžiaga ir mėginių ėmimo tvarkaraščiai,

— toksiškumo matavimo metodai,

— tyrimo rezultatų vertinimo kaip teigiami arba neigiami kriterijai,

— išsami informacija apie bet kokius nukrypimus nuo protokolo ir paaiškinimas, kaip tas nukrypimas paveiks tyrimo sistemą ir rezultatus.

Patikimumo tikrinimas:

— paskutinės patikimumo patikros rezultatų santrauka, įskaitant informaciją apie medžiagą, koncentraciją ir naudojamą nešiklį,

— bandymo laboratorijoje lygiagrečiai ir (arba) anksčiau sukaupti PC ir lygiagrečiai gauti neigiamos (tirpiklio/nešiklio) kontrolės duomenys,

— jei lygiagreti PC nebuvo naudojama, naujausio periodinio PC bandymo data ir laboratorijos ataskaita ir ataskaita su laboratorijos anksčiau sukauptais PC duomenimis, pagrindžiančiais lygiagrečios PC nenaudojimą.

Rezultatai:

— atskirų pelių masė dozės gavimo ir numatyto humaniško numarinimo dieną; taip pat kiekvienos poveikio grupės vidurkis ir atitinkamas paklaidos rodiklis (pvz., SD, SEM),

— toksinio poveikio atsiradimo laikas ir požymiai, įskaitant kiekvieno gyvūno odos dirginimą medžiagos užtepimo vietoje, jei yra,

— kiekvienos poveikio grupės atskiros pelės BrdU ženklinimo rodiklių ir SI verčių lentelės,

— kiekvienos poveikio grupės BrdU ženklinimo rodikliui/pelei vidurkis ir atitinkamas paklaidos rodiklis (pvz., SD, SEM) ir kiekvienos poveikio grupės riktų analizės rezultatai,

▼M3

— apskaičiuotas SI ir atitinkamas variantiškumo matas, kuriuo atsižvelgiama į atskirų gyvūnų rezultatų variantiškumą tiek bandomosios medžiagos, tiek kontrolinėje grupėse,

— dozės ir atsako sąryšis,

— statistinė analizė, jei tinka.

Rezultatų aptarimas:

— trumpas rezultatų, dozės ir atsako sąryšio analizės ir statistinės analizės, jei tinka, paaiškinimas, padarant išvadą, ar bandomoji medžiaga turi būti laikoma odos jautrikliu.

NUORODOS

(1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999–1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985–997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327–33.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49–59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99–4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 258–273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 274–286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 249–257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10–7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf]

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129–134.

(13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896–1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90–96.

(16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09–7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71–89.

(19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13–31.

(20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug Chem. Toxicol., 21, 195–206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83–94.

(25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245–256.

▼M3

(26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug. Chem. Toxicol., 22, 491–506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60–68.

(28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721–728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023–1028.

(30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical SAFEty Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(31) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in SAFEty Evaluation, Environmental Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, 563–79.

(33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių artumas. Tikslumas yra bandymo metodo naudojimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo metodo rezultatų dalį (33).

Palyginamoji medžiaga – jautrinanti arba nejautrinanti medžiaga, naudojama kaip bandomosios medžiagos palyginimo standartas. Palyginamoji medžiaga turi pasižymėti tokiomis savybėmis: i) pastoviu (-iais) ir patikimu (-ais) šaltiniu (-iais), ii) struktūriniu ir funkciniu panašumu į bandomų medžiagų klasę, iii) žinomomis fizikinėmis ir cheminėmis charakteristikomis, iv) patvirtinančiais duomenimis apie žinomus poveikius ir v) žinomu potencialu norimų atsakų intervale.

Klaidingai neigiamas rezultatas – bandymo metodu bandomoji medžiaga neteisingai įvertinta kaip neigiama arba neaktyvi, nors iš tiesų yra teigiama arba aktyvi (33).

Klaidingai teigiamas rezultatas – bandymu bandomoji medžiaga neteisingai įvertinta kaip teigiama arba aktyvi, nors iš tiesų yra neigiama arba neaktyvi (33).

Pavojus – neigiamo poveikio sveikatai arba ekologijai galimybė. Neigiamas poveikis pasireiškia tik tada, jei veikimas medžiaga yra pakankamo lygio.

Atkuriamumas tarp laboratorijų – laipsnio, kuriuo skirtingos kvalifikuotos laboratorijos, taikydamos tą patį protokolą ir bandančios tas pačias bandomąsias medžiagas, gali gauti kokybiškai ir kiekybiškai panašius rezultatus, matas. Atkuriamumas tarp laboratorijų nustatomas atliekant pradinio tinkamumo patvirtinimo ir tinkamumo pavirtinimo procesus ir rodo laipsnį, kuriuo bandymą galima sėkmingai perkelti tarp laboratorijų; tai dar vadinama tarplaboratoriniu atkuriamumu (33).

Atkuriamumas laboratorijoje – laipsnio, kuriuo kvalifikuoti darbuotojai toje pačioje laboratorijoje gali sėkmingai atkartoti rezultatus, taikydami konkretų protokolą skirtingu metu, matas. Dar vadinamas laboratoriniu atkuriamumu (33).

Riktas – pastebėjimas, kad vertė labai skiriasi nuo kitų atsitiktinio populiacijos ėminio verčių.

Kokybės užtikrinimas – valdymo procesas, per kurį asmenys, nepriklausomi nuo atliekančiųjų bandymus, įvertina, kaip laboratorija laikosi bandymo standartų, reikalavimų ir užrašų saugojimo procedūrų bei duomenų perdavimo tikslumo.

Patikimumas – juo įvertinamas laipsnis, kuriuo bandymo metodas gali būti ilgainiui atkartojamai atliekamas vienoje ir skirtingose laboratorijose, taikant tą patį protokolą. Jis įvertinamas skaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų (33).

Odos jautrinimas – imunologinis procesas, vykstantis paveikų individą išoriškai paveikus cheminiu alergenu, kuris sukelia odos imuninį atsaką, dėl kurio gali atsirasti kontaktinis jautrinimas.

Dirginimo rodiklis (angl. SI) – vertė, apskaičiuojama bandomosios medžiagos jautrinimo potencialui įvertinti – tai yra paveiktų grupių proliferacijos sąryšio su lygiagrečios nešiklio kontrolinės grupės proliferacija koeficientas.

Bandomoji medžiaga (dar vadinama bandomąja chemine medžiaga) – bet kuri medžiaga ar mišinys, bandomi taikant šį bandymų metodą.

▼M4

B.52. ŪMUS TOKSIŠKUMAS ĮKVĖPUS. ŪMAUS TOKSIŠKUMO KLASĖS NUSTATYMO METODAS

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka OECD „Test Guideline“ (TG) 436 (OECD bandymo gaires Nr. 436) (2009). Pirmosios ūmaus toksiškumo įkvėpus bandymo gairės TG 403 priimtos 1981 m., vėliau jos buvo atnaujintos (žr. šio priedo B.2 skyrių (1)). Parengti ūmaus toksiškumo įkvėpus klasės (ŪITK) metodą (2) (3) (4) nuspręsta priėmus atnaujintąjį ūmaus toksiškumo per virškinamąjį traktą klasės (ŪOTK) metodą (šio priedo B.1 tris skyrius) (5). Retrospektyvus ūmaus toksiškumo įkvėpus klasės bandymo metodo veiksmingumo vertinimas parodė, kad šis metodas yra tinkamas taikyti klasifikavimo ir ženklinimo tikslais (6). Ūmaus toksiškumo įkvėpus klasės bandymo metodas suteiks galimybę atlikti nuoseklius veiksmus taikant pastovias tikslines koncentracijas, siekiant įvertinti bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą. Pagrindinė metodo pasekmė – mirtingumas, tačiau didelį skausmą arba kančią patiriantys gyvūnai arba gaištantys gyvūnai turėtų būti humaniškai numarinami siekiant sumažinti kančią. Pasekmių žmonėms gairės pateiktos OECD rekomendaciniame dokumente (RD) Nr. 19 (7).

2. Šio bandymo metodo taikymo ir aiškinimo gairės pateiktos rekomendaciniame dokumente Nr. 39 dėl ūmaus toksiškumo įkvėpus bandymų (RD Nr. 39) (8).

3. Aprašant šį bandymo metodą vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje ir RD Nr. 39 (8).

4. Taikant šį bandymo metodą gaunama informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos pavojingas savybes siekiant ją įvertinti ir klasifikuoti pagal Reglamentą (EB) Nr. 1272/2008 (9) kaip ūmų toksiškumą sukeliančias chemines medžiagas. Jeigu reikalingi taškiniai LC_{50} įverčiai arba koncentracijos ir reakcijos tarpusavio priklausomybės tyrimai, reikėtų taikyti šio priedo B.2 skyriuje (1) aprašytą bandymo metodą. Daugiau rekomendacijų dėl bandymo metodo pasirinkimo pateikta RD Nr. 39 (8). Šis bandymo metodas nėra specialiai skirtas specialiosios paskirties medžiagų, pvz., mažo tirpumo izomerinių arba pluoštinių medžiagų arba dirbtinių nanomedžiagų, bandymams.

PIRMINIAI ASPEKTAI

5. Prieš svarstydama galimybę atlikti bandymus pagal šį bandymo metodą, bandymų laboratorija, siekdama sumažinti bandymų su gyvūnais poreikį, turėtų peržiūrėti visą turimą informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą, įskaitant esamus tyrimus, kurių duomenys leistų neatlikti papildomų bandymų. Pasirinkti tinkamiausią gyvūnų rūšį, padermę, lytį, poveikio būdą ir tinkamas bandymų koncentracijas gali padėti informacija apie bandomosios cheminės medžiagos tapatumą, cheminę struktūrą, fizines ir chemines savybes, taip pat toksiškumo bandymų *in vitro* arba *in vivo* rezultatai, numatomi panaudojimo būdai ir galimas poveikis žmogui, turimi (Q)SAR duomenys ir toksikologiniai duomenys apie panašios struktūros chemines medžiagas. Jeigu, atsižvelgiant į ėsdinamąjį ([1]) arba stiprų dirginamąjį poveikį, numatoma, kad koncentracija gali sukelti didelį skausmą arba kančią, tokia koncentracija neturėtų būti bandoma pagal šį bandymo metodą [žr. RD Nr. 39 (8)].

([1]) Ėsdinimas galėtų būti vertinamas remiantis ekspertų nuomone, grindžiama tokiais įrodymais: patirtimi su žmonėmis ir gyvūnais, esamais (*in vitro*) duomenimis, pvz., šio priedo B.40 skyriumi (10) ir B.40 bis skyriumi (11) arba OECD TG 435 (12), pH vertėmis, informacija apie panašias chemines medžiagas arba kitais susijusiais duomenimis.

▼M4

BANDYMO PRINCIPAS

6. Šis bandymas grindžiamas nuoseklia metodika, pagal kurią keturių valandų poveikio laikotarpiu gaunama pakankamai informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos ūmų toksiškumą įkvėpus, kad tą medžiagą būtų galima klasifikuoti. Atsižvelgiant į specialius reglamentavimo tikslus, gali būti taikomi ir kitokie poveikio laikotarpiai. Kad ir kokie būtų nustatytieji koncentracijos lygiai, bandymai atliekami naudojant po tris kiekvienos lyties gyvūnus. Atsižvelgiant į gyvūnų gaištamumą ir (arba) liguistumą, gali pakakti dviejų lygių, kad būtų galima spręsti apie bandomosios cheminės medžiagos ūmų toksiškumą. Jeigu pateikiama įrodymų, kad kurios nors lyties gyvūnai yra jautresni už kitos lyties gyvūnus, bandymas gali būti tęsiamas naudojant tik jautresniosios lyties gyvūnus. Remiantis pirmesniojo lygio taikymo rezultatais, nustatoma, kas turėtų būti daroma toliau, pvz.:

a) daugiau bandymų atlikti nereikia;

b) turėtų būti atliekami bandymai naudojant po tris kiekvienos lyties gyvūnus arba

c) turėtų būti atliekami bandymai naudojant šešis jautresniosios lyties gyvūnus, t. y. toksiškumo klasės apatinės ribos įverčiai turėtų būti nustatomi remiantis šešiais gyvūnais kiekvienoje koncentracijos lygio grupėje, nepaisant lyties.

7. Gaištantys gyvūnai arba gyvūnai, kurie akivaizdžiai patiria skausmą arba kuriems pasireiškia didelės ir ilgalaikės kančios požymių, turėtų būti humaniškai numarinami ir aiškinant bandymo rezultatus laikomi atliekant bandymą nugaišusiais gyvūnais. Sprendimo numarinti gaištančius arba sunkiai kenčiančius gyvūnus priėmimo kriterijai ir numatomos arba neišvengiamos žūties nustatymo rekomendacijos yra pateikti rekomendaciniame dokumente Nr. 19 dėl pasekmių žmonėms (7).

METODO APRAŠYMAS

Gyvūnų rūšies parinkimas

8. Turėtų būti naudojami sveiki, jauni, bet suaugę plačiai naudojamų laboratorinių padermių gyvūnai. Tinkamiausia rūšis yra žiurkės; jeigu naudojama kita rūšis, turėtų būti pateiktas jos naudojimo pagrindimas.

Gyvūnų paruošimas

9. Patelės turėtų būti dar be vados ir neapvaisintos. Poveikio dieną gyvūnai turėtų būti jauni, bet suaugę, 8–12 savaičių amžiaus, o masė pagal kiekvieną lytį turėtų ± 20 % tikslumu atitikti anksčiau dozę gavusių gyvūnų vidutinę masę. Gyvūnai atrenkami atsitiktine tvarka ir paženklinami, kad būtų galima identifikuoti kiekvieną gyvūną. Ne mažiau kaip penkias paras iki bandymo pradžios gyvūnai laikomi savo narveliuose, kad priprastų prie laboratorinių sąlygų. Prieš bandymą gyvūnai taip pat turėtų būti trumpai papratinami prie bandymo aparatūros, nes tai padės sumažinti įtampą, kylančią patekus į naują aplinką.

Gyvūnų laikymas

10. Bandomųjų gyvūnų laikymo patalpos temperatūra turėtų būti 22 ± 3 °C. Tinkamiausias santykinis drėgnis – 30–70 %, bet jis gali būti nepasiekiamas, jeigu naudojamas nešiklis yra vanduo. Prieš dozės davimą ir davus dozę gyvūnai turėtų būti laikomi narveliuose suskirstyti grupėmis pagal lytį ir koncentraciją; narvelyje laikomų gyvūnų skaičius turėtų būti toks, kad būtų galima aiškiai stebėti kiekvieną gyvūną ir kad būtų patiriama kuo mažiau žalos dėl kanibalizmo ir grumtynių. Jeigu dozė gyvūnams duodama tik per nosį, gali reikėti juos pripratinti prie uždaromųjų vamzdelių. Uždaromieji vamzdeliai gyvūnams neturėtų kelti didelės fizinės, terminės arba

▼M4

suvaržymo įtampos. Varžymas gali turėti fiziologinių pasekmių, pvz., turėti poveikio kūno temperatūrai (hipertermija) ir (arba) per minutę įkvepiamam tūriui. Jeigu yra bendrųjų duomenų, rodančių, kad tokių pastebimų pokyčių neįvyksta, pripratinimas prie uždaromųjų vamzdelių nebūtinas. Gyvūnai, kurių visas kūnas veikiamas aerozoliu, poveikio laikotarpiu turėtų būti laikomi atskirai, kad bandomasis aerozolis nebūtų filtruojamas per kitų narvelyje esančių gyvūnų kailį. Išskyrus poveikio laikotarpį, gyvūnams šerti tinka įprastas ir sertifikuotas laboratorijose naudojamas pašaras, duodant neribotą geriamo vandens kiekį. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, taikant 12 h šviesos ir 12 h tamsos seką.

Inhaliacinės kameros

11. Parenkant inhaliacinę kamerą, turėtų būti atsižvelgiama į bandomosios cheminės medžiagos pobūdį ir bandymo tikslą. Pirmenybė teikiama dozės davimui tik per nosį (ši sąvoka apima sąvokas „tik per galvą“, „tik per nosį“ ir „tik per šnipą“). Pirmenybė dozės davimui tik per nosį paprastai teikiama tiriant skystųjų arba kietųjų dalelių aerozolius ir garus, kurie gali kondensuotis ir tapti aerozoliais. Specialieji tyrimo tikslai gali būti sėkmingiau pasiekti taikant poveikio per visą kūną metodą, tačiau tai turi būti pagrįsta tyrimo ataskaitoje. Siekiant užtikrinti atmosferos pastovumą naudojant poveikio per visą kūną kamerą, visa bandomųjų gyvūnų užimama erdvė turėtų neviršyti 5 % kameros tūrio. Poveikio tik per nosį ir poveikio per visą kūną metodų principai ir konkretūs šių metodų privalumai bei trūkumai aprašyti RD Nr. 39 (8).

POVEIKIO SĄLYGOS

Koncentracijų taikymas

12. Rekomenduojama taikyti pastovų keturių valandų poveikio laikotarpį, neskaitant pusiausvirinimo laikotarpio. Siekiant užtikrinti specialiųjų reikalavimų laikymąsi gali būti taikomos kitokios trukmės, tačiau tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateiktas jų pagrindimas [žr. RD Nr. 39 (8)]. Gyvūnai, kurie veikiami poveikio per visą kūną kamerose, turėtų būti laikomi atskirai, kad kiti viename narvelyje laikomi gyvūnai laižydami nenurytų bandomosios cheminės medžiagos. Poveikio metu gyvūnas neturėtų būti šeriamas. Vandens gali būti duodama per visą poveikio per visą kūną laikotarpį.

13. Gyvūnai veikiami bandomąja medžiaga dujų, garų, aerozolių arba jų mišinių pavidalu. Per tyrimą naudotina fizinė būsena priklauso nuo fizinių ir cheminių bandomosios cheminės medžiagos savybių, pasirinktos koncentracijos ir (arba) fizinio pavidalo, kuris veikiausiai bus tvarkant ir naudojant bandomąją cheminę medžiagą. Higroskopinės ir chemiškai reaguojančios bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti bandomos sauso oro sąlygomis. Turėtų būti imamasi atsargumo priemonių, kad būtų išvengta sprogių koncentracijų susidarymo.

Dalelių dydžio pasiskirstymas

14. Dalelių rūšiavimas pagal dydį turėtų būti taikomas visiems aerozoliams ir garams, kurie gali kondensuotis ir tapti aerozoliais. Kad poveikis būtų padarytas visoms svarbioms kvėpavimo takų sritims, rekomenduojama naudoti aerozolius, kurių masės medianinis aerodinaminis skersmuo (MMAS) yra 1–4 μm, o geometrinis standartinis nuokrypis (σ_g) – 1,5–3,0 (8) (13) (14). Nors turėtų būti imamasi pagrįstų priemonių, kad šio standarto būtų laikomasi, jeigu jo įgyvendinti neįmanoma, turėtų būti pateikta ekspertų nuomonė. Pvz., metalų garai gali būti mažesni už šį standartą, o įelektrintos dalelės, pluoštai ir higroskopinės medžiagos (dydžiui didėjant drėgnoje kvėpavimo takų aplinkoje) gali viršyti šį standartą.

▼M4

Bandomosios cheminės medžiagos paruošimas nešiklyje

15. Siekiant užtikrinti reikiamą bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją ir dalelių dydį atmosferoje, gali būti naudojamas nešiklis. Paprastai pirmenybė teikiama vandeniui. Siekiant užtikrinti reikiamą dalelių dydžio pasiskirstymą, iš dalelių sudaryta medžiaga gali būti apdorojama mechaniškai, tačiau turėtų būti imamasi atsargumo priemonių, kad bandomoji medžiaga nebūtų suskaidyta arba kad būtų pakeistos jos savybės. Kai manoma, kad mechaniškai apdorojus bandomąją cheminę medžiagą pasikeitė jos cheminė sudėtis (pvz., dėl labai aukštos temperatūros, susidariusios dėl trinties pernelyg stipriai malant), bandomosios cheminės medžiagos sudėtis turėtų būti patikrinta analizės būdu. Turėtų būti imamasi tinkamų atsargumo priemonių, kad bandomoji cheminė medžiaga nebūtų užteršta. Nebūtina tikrinti netrapių granuliuotų medžiagų, kurios specialiai paruoštos taip, kad jų nebūtų galima įkvėpti. Turėtų būti atliekamas trynimo bandymas, skirtas įrodyti, kad tvarkant granuliuotą medžiagą nesusidaro įkvepiamų dalelių. Jeigu atliekant trynimo bandymą susidaro įkvepiamų dalelių, turėtų būti atliekamas toksiškumo įkvėpus bandymas.

Kontroliniai gyvūnai

16. Vienalaikės neigiamos kontrolės (naudojant orą) grupė nebūtina. Jeigu bandymo atmosferos sukūrimo tikslais naudojamas nešiklis nėra vanduo, nešiklio kontrolinė grupė turėtų būti naudojama tik tuo atveju, jeigu nėra istorinių toksiškumo įkvėpus duomenų. Jeigu atlikus nešiklyje paruoštos bandomosios cheminės medžiagos toksiškumo tyrimą nustatoma, kad medžiaga nėra toksiška, vadinasi, ir nešiklis, esant ištirtai koncentracijai, nėra toksiškas; taigi nešiklio kontrolė nebūtina.

POVEIKIO SĄLYGŲ STEBĖJIMAS

Oro srautas kameroje

17. Kiekvieno poveikio metu turėtų būti atidžiai reguliuojamas, nuolat stebimas ir ne rečiau kaip kartą per valandą registruojamas per kamerą tekantis oro srautas. Bandymo atmosferoje susidariusios koncentracijos (arba jos pastovumo) stebėjimas yra vienas iš visų dinaminių parametrų matavimų, suteikiantis galimybę netiesiogiai kontroliuoti visus svarbius dinaminius atmosferos kūrimo parametrus. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas tam, kad būtų išvengta pakartotinio įkvėpimo dozės davimo tik per nosį kamerose, kai per poveikio sistemą tekantis oro srautas yra nepakankamas užtikrinti dinaminį bandomosios cheminės medžiagos atmosferos srautą. Yra nustatyti metodai, kurie gali būti taikomi norint įrodyti, kad pasirinktomis veikimo sąlygomis neįvyksta pakartotinio įkvėpimo (8) (15). Deguonies koncentracija turėtų būti ne mažesnė kaip 19 %, anglies dioksido – ne didesnė kaip 1 %. Jeigu yra pagrindo manyti, kad šių standartų įgyvendinti neįmanoma, turėtų būti matuojamos deguonies ir anglies dioksido koncentracijos.

Kameros temperatūra ir santykinis drėgnis

18. Kameroje turėtų būti palaikoma 22 ± 3 °C temperatūra. Tiek dozę duodant tik per nosį, tiek veikiant visą kūną, santykinis drėgnis turėtų būti stebimas ir registruojamas ne mažiau kaip tris kartus, kai poveikio trukmė keturios valandos, ir kas valandą, kai poveikio trukmė mažesnė. Tinkamiausias santykinis drėgnis – 30–70 %, tačiau jis gali būti nepasiekiamas (pvz., bandant vandens pagrindo mišinius) arba neišmatuojamas dėl trukdžių, atsirandančių bandomajai cheminei medžiagai taikant bandymo metodą.

▼M4

Bandomoji cheminė medžiaga. Vardinė koncentracija

19. Jeigu įmanoma, turėtų būti apskaičiuota ir užregistruota vardinė koncentracija poveikio kameroje. Vardinė koncentracija yra sukurtos bandomosios cheminės medžiagos masės ir viso oro srauto, perleisto per kamerų sistemą, tūrio santykis. Vardinė koncentracija nėra naudojama apibūdinti poveikį gyvūnui, tačiau, vardinę koncentraciją palyginus su faktine, nustatomas generavimo, kurį užtikrina bandymų sistema, efektyvumas, kuriuo remiantis galima nustatyti generavimo problemas.

Bandomoji cheminė medžiaga. Faktinė koncentracija

20. Faktinė koncentracija yra bandomosios cheminės medžiagos koncentracija inhaliacinės kameros gyvūno kvėpavimo zonoje. Faktines koncentracijas galima nustatyti specialiaisiais metodais (pvz., taikant tiesioginio ėminių ėmimo, adsorbcijos arba cheminių reakcijų metodus ir tada atliekant analizinį apibūdinimą) arba nespecialiaisiais metodais, pvz., atliekant gravimetrinę analizę naudojant filtrus. Gravimetrinė analizė gali būti taikoma tik vienos sudedamosios dalies miltelių aerozoliams arba mažo lakumo skystųjų dalelių aerozoliams ir turėtų būti grindžiama tinkamais prieš tyrimą atliktais bandomosios cheminės medžiagos savybių apibūdinimais. Iš daugiau kaip vienos sudedamosios dalies sudarytų miltelių aerozolių koncentracijos taip pat gali būti nustatomos atliekant gravimetrinę analizę. Tačiau tam reikalingi analitiniai duomenys, įrodantys, kad ore esančios medžiagos sudėtis panaši į pirminės medžiagos sudėtį. Jeigu tokios informacijos nėra, tyrimo metu gali reikėti vienodais intervalais atlikti pakartotinę bandomosios cheminės medžiagos (geriausia, kad ji būtų ore) analizę. Jeigu aerozolinės medžiagos gali garuoti arba sublimuoti, turėtų būti įrodyta, kad pasirinktu metodu surinktos visos fazės. Tyrimo ataskaitoje turėtų būti nurodytos tikslinės, vardinės ir faktinės koncentracijos, tačiau atliekant statistinę analizę, skirtą apskaičiuoti mirtinas koncentracijos vertes, naudojamos tik faktinės koncentracijos.

21. Jeigu įmanoma, turėtų būti naudojama viena bandomosios cheminės medžiagos partija, o bandomasis ėminys turėtų būti laikomas tokiomis sąlygomis, kad būtų išsaugotas jo grynumas, homogeniškumas ir stabilumas. Prieš pradedant tyrimą reikėtų apibūdinti bandomosios cheminės medžiagos savybes, įskaitant jos grynumą ir, jeigu tai techniškai įmanoma, tapatumą, taip pat nustatytų teršalų ir priemaišų kiekius. Be kitų duomenų, tai galima pagrįsti šiais duomenimis: sulaikymo trukme ir susijusia didžiausios koncentracijos sritimi, molekuline mase, nustatyta atlikus spektroskopinę arba dujų chromatografijos analizę, arba kitais įverčiais. Nors bandomojo ėminio tapatumo nustatymas nėra bandymų laboratorijos pareiga, bandymų laboratorijai gali būti naudinga patvirtinti bent kai kurias pateikėjo nurodytas savybes (pvz., spalvą, fizinę būseną ir t. t.).

22. Poveikio atmosfera turėtų būti kaip įmanoma pastovesnė ir turėtų būti stebima nuolat ir (arba) su pertraukomis, atsižvelgiant į analizės metodą. Jeigu ėminiai imami su pertraukomis, per keturių valandų tyrimą kameros atmosferos ėminiai turėtų būti imami ne mažiau kaip du kartus. Jeigu tai neįmanoma dėl nedidelių oro srauto greičių arba mažų koncentracijų, gali būti imamas vienas ėminys per visą poveikio laikotarpį. Jeigu ėminiai pastebimai skiriasi, tiriant kitas koncentracijas per poveikio laikotarpį turėtų būti imami keturi ėminiai. Atskiri kameroje susidariusios koncentracijos ėminiai neturėtų nukrypti nuo vidutinės kameroje susidariusios koncentracijos daugiau kaip ± 10 %, kai tiriamos dujos ir garai, arba daugiau kaip ± 20 %, kai tiriami skystųjų arba kietųjų dalelių aerozoliai. Turėtų būti apskaičiuotas ir užregistruotas pusiausvyros nusistovėjimo kameroje laikotarpis (t_{95}). Į poveikio trukmę įtraukiamas laikas, per kurį susidaro bandomoji cheminė medžiaga, ir atsižvelgiama į laiką, kurio reikia, kad būtų pasiekta t_{95}. t_{95} apskaičiavimo gairės pateiktos RD Nr. 39 (8).

▼M4

23. Jeigu tiriami labai sudėtingi mišiniai, sudaryti iš garų ir (arba) dujų, ir aerozoliai (pvz., deginimo atmosferos ir bandomosios cheminės medžiagos, pučiamos iš specialiai varomų galutinio naudojimo produktų arba prietaisų), kiekvienos fazės veikimas inhaliacinėje kameroje gali būti skirtingas, todėl iš kiekvienos fazės (garų ir (arba) dujų ir aerozolio) turėtų būti parinkta bent viena indikacinė cheminė medžiaga (analitė); paprastai šiuo tikslu pasirenkama pagrindinė veiklioji mišinio cheminė medžiaga. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga yra mišinys, turėtų būti nurodyta viso mišinio, o ne tik veikliosios sudedamosios dalies (analitės) analizinė koncentracija. Daugiau informacijos apie faktines koncentracijas pateikta RD Nr. 39 (8).

Bandomoji cheminė medžiaga. Dalelių dydžio pasiskirstymas

24. Aerozolių dalelių dydžio pasiskirstymas turėtų būti nustatomas bent kartą per kiekvieną keturių valandų trukmės poveikio laikotarpį naudojant pakopinį ėmiklį arba alternatyvų prietaisą, pvz., aerodinaminį dalelių rūšiuotuvą. Jeigu galima įrodyti, kad pakopiniu ėmikliu arba alternatyviu prietaisu gaunami lygiaverčiai rezultatai, atliekant tyrimą gali būti naudojamas alternatyvus prietaisas. Siekiant įsitikinti pagrindinio prietaiso surenkamuoju veiksmingumu, kartu su pagrindiniu prietaisu turėtų būti naudojamas antrasis prietaisas, pvz., gravimetrinis filtras, gaudyklė arba barboteris. Atlikus dalelių dydžio analizę nustatyta masės koncentracija turėtų neviršyti priimtinų filtruojamosios analizės būdu nustatytos masės koncentracijos ribų [žr. RD Nr. 39 (8)]. Jeigu lygiavertiškumą galima įrodyti pradiniame tyrimo etape, tolesnius patvirtinamuosius matavimus galima praleisti. Gyvūnų gerovės sumetimais turėtų būti imamasi priemonių, kad būtų kuo mažiau negalutinių duomenų, dėl kurių galėtų reikėti pakartoti poveikį. Garuose esančios dalelės turėtų būti rūšiuojamos tuo atveju, jeigu bent kiek tikėtina, kad susidarant aerozoliui gali kondensuotis garai, arba jeigu garų atmosferoje aptinkama dalelių, dėl kurių gali susidaryti mišrių fazių (žr. 14 skirsnį).

PROCEDŪRA

Pagrindinis bandymas

25. Kiekvienam lygiui naudojama po tris kiekvienos lyties gyvūnus arba po šešis jautresniosios lyties gyvūnus. Jeigu naudojant kitos rūšies graužikus nei žiurkės dozė duodama tik per nosį, ilgiausia poveikio trukmė gali būti pakoreguojama siekiant sumažinti tos rūšies gyvūnų patiriamą kančią. Pradinei dozei taikytina koncentracija parenkama kaip vienas iš keturių nustatytųjų lygių: pradinis koncentracijos lygis turėtų būti toks, kuris, tikėtina, sukels toksiškumą kai kuriems dozę gaunantiems gyvūnams. Pagal dujoms, garams ir aerozoliams (nurodytiems 2–4 priedėliuose) skirtas bandymų schemas bandymai turėtų būti atliekami taikant ribines CLP 1–4 kategorijų vertes (9), nustatytas dujoms (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4 h) (2 priedėlis), garams (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4 h) (3 priedėlis) ir aerozoliams (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4h) (4 priedėlis). 5 kategorija, kuri nėra reglamentuojama Reglamentu (EB) Nr. 1272/2008 (9), yra susijusi su koncentracijomis, viršijančiomis atitinkamas ribines koncentracijas. Kiekvienai pradinei koncentracijai taikoma atitinkama bandymų schema. Atsižvelgiant į humaniškai numarintų arba nugaišusių gyvūnų skaičių, bandymo procedūra vykdoma vadovaujantis pateiktomis rodyklėmis, kol nebus galima nustatyti kategorijos.

26. Laiko tarpas tarp dozių davimo grupėms nustatomas atsižvelgiant į toksiškumo požymių atsiradimo laiką, trukmę ir sunkumą. Kito koncentracijos lygio dozės davimas gyvūnams nukeliamas iki to laiko, kai bus pagrįstai įsitikinta, kad pirmiau bandytieji gyvūnai išgyveno. Rekomenduojamas uždelsto toksiškumo stebėjimo laikotarpis tarp kiekvieno koncentracijos lygio dozių davimo – trys arba keturios paros. Prireikus, pvz., reakcijos be traukulių atveju, laiko tarpas gali būti koreguojamas.

▼M4

Ribinis bandymas

27. Ribinis bandymas atliekamas tada, kai bandomoji cheminė medžiaga yra nežinoma arba kai manoma, kad ji iš esmės netoksiška, t. y. sukelianti toksinį poveikį tik taikant didesnę nei norminę koncentraciją. Informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą galima gauti remiantis žiniomis apie panašias bandytas chemines medžiagas arba panašius mišinius, atsižvelgiant į toksikologinės reikšmės turinčių sudedamųjų dalių tapatumą ir procentinę dalį. Tais atvejais, kai informacijos apie medžiagos toksiškumą yra mažai arba jos išvis nėra arba kai numanoma, kad bandomoji cheminė medžiaga yra toksiška, turėtų būti atliekamas pagrindinis bandymas [daugiau rekomendacijų pateikta RD Nr. 39 (8)].

28. Taikant įprastą procedūrą, po tris kiekvienos lyties gyvūnus arba šeši jautresniosios lyties gyvūnai veikiami 20 000 ppm koncentracija, jeigu tai dujos, 20 mg/l koncentracija, jeigu tai garai, 5 mg/l koncentracija, jeigu tai dulkių ir (arba) miglos tipo medžiagos (jeigu tokios koncentracijos pasiekiamos); ši procedūra taikoma kaip šiam bandymo metodui skirtas ribinis bandymas. Atliekant aerozolių bandymus, pirmiausia turėtų būti siekiama užtikrinti įkvepiamą dalelių dydį (t. y. MMAS turėtų būti 1–4 μm). Daugelio bandomųjų cheminių medžiagų atveju tai įmanoma pasiekti, kai koncentracija yra 2 mg/l. Atlikti aerozolių bandymus taikant didesnę kaip 2 mg/l koncentraciją turėtų būti mėginama tik tuo atveju, jeigu įmanoma pasiekti įkvepiamą dalelių dydį [žr. RD Nr. 39 (8)]. Pagal GHS (16) gyvūnų gerovės sumetimais rekomenduojama neatlikti bandymų viršijant ribinę koncentraciją. Galimybė atlikti GHS 5 kategorijos (16), kuri nėra reglamentuojama Reglamentu (EB) Nr. 1272/2008 (9), medžiagų bandymus turėtų būti svarstoma tik tuo atveju, jeigu labai tikėtina, kad tokio bandymo rezultatai turės tiesioginės reikšmės žmonių sveikatos apsaugai; tokiu atveju tyrimo ataskaitoje pateikiamas pagrindimas. Tiriant potencialiai sprogias bandomąsias chemines medžiagas turėtų būti imamasi atsargumo priemonių, kad nesusidarytų sprogimui palankių sąlygų. Siekiant išvengti nebūtino gyvūnų naudojimo, prieš ribinį bandymą turėtų būti atliktas atskiras bandymas be gyvūnų, siekiant įsitikinti, ar įmanoma pasiekti ribiniam bandymui reikalingas kameros sąlygas.

STEBĖJIMAI

29. Poveikio laikotarpiu turėtų būti dažnai atliekami klinikiniai gyvūnų stebėjimai. Baigus duoti dozę, dozės davimo dieną klinikiniai stebėjimai turėtų būti atliekami bent du kartus arba daugiau, atsižvelgiant į gyvūnų reakciją į gautą dozę, o vėliau – bent kartą per parą, iš viso stebint 14 dienų. Tikslios stebėjimų laikotarpio trukmės nenustatoma; ji turėtų būti parenkama atsižvelgiant į klinikinių požymių atsiradimo laiką ir gyvūnų atsigavimo laikotarpio trukmę. Svarbu atkreipti dėmesį į toksiškumo požymių atsiradimo ir išnykimo laiką, ypač jeigu toksiškumo požymių atsiranda tik po tam tikro laiko. Visi stebėjimai sistemingai registruojami, išsaugant atskirus įrašus apie kiekvieną gyvūną. Gaištantys gyvūnai ir gyvūnai, kurie patiria didelius skausmus ir (arba) kuriems pasireiškia ilgalaikių sunkios kančios požymių, gyvūnų gerovės sumetimais turėtų būti humaniškai numarinami. Atliekant klinikinių toksiškumo požymių tyrimus, turėtų būti imamasi atsargumo priemonių, kad prasta pradinė išvaizda ir trumpalaikiai kvėpavimo takų pakitimai, atsiradę dėl poveikio procedūros, nebūtų palaikyti dozės davimo poveikiu. Reikėtų atsižvelgti į principus ir kriterijus, apibendrintus Rekomendaciniame dokumente dėl pasekmių žmonėms (7). Kai gyvūnai numarinami dėl humaniškų priežasčių arba randami nugaišę, kiek įmanoma tiksliau užregistruojamas žūties laikas.

▼M4

30. Narveliuose turėtų būti stebimi odos ir kailio, akių ir gleivinės pakitimai, taip pat kvėpavimo, kraujo, autonominės ir centrinės nervų sistemų, somatomotorinės veiklos ir elgsenos pakitimai. Jeigu įmanoma, turėtų būti išskirti vietinis ir sisteminis poveikiai. Ypač reikėtų stebėti, ar nepasireiškia drebulys, traukuliai, viduriavimas, mieguistumas, miego ir komos būsenos, ar neteka seilės. Matuojant temperatūrą tiesiojoje žarnoje, galima gauti patvirtinamųjų sulėtėjusio kvėpavimo arba nukritusios ar pakilusios temperatūros įrodymų, susijusių su dozės davimu arba izoliavimu.

Kūno masė

31. Kiekvieno gyvūno masė turėtų būti vieną kartą užregistruojama pratinimo laikotarpiu, tada poveikio dieną dar nedavus dozės (nulinė diena) ir bent pirmąją, trečiąją ir septintąją dienomis (o vėliau – kas savaitę), taip pat žūties arba numarinimo metu, jeigu tai įvyksta po pirmosios dienos. Kūno masė yra labai svarbus toksiškumo gyvūnams rodiklis, todėl gyvūnai, kurių masė, palyginti su vertėmis, gautomis prieš tyrimą, nukrenta 20 % arba daugiau, turėtų būti atidžiai stebimi. Pasibaigus poveikio pasekmių stebėjimo laikotarpiui, išgyvenę gyvūnai pasveriami ir humaniškai numarinami.

Patologija

32. Visiems bandomiesiems gyvūnams, įskaitant nugaišusius atliekant bandymą arba numarintus ir pašalintus iš tyrimo gyvūnų gerovės sumetimais, daromas bendrasis skrodimas. Jeigu skrodimo negalima atlikti iš karto po to, kai aptinkamas nugaišęs gyvūnas, gyvūnas turėtų būti laikomas pakankamai šaltoje vietoje (bet neužšaldomas), siekiant kuo labiau pristabdyti autolizę. Skrodimai turėtų būti atliekamai kaip galima anksčiau, paprastai – per dieną arba dvi. Visi dideli patologiniai pakitimai turėtų būti užregistruojami pagal kiekvieną gyvūną, ypatingą dėmesį skiriant kvėpavimo takų pakitimams.

33. Norint padidinti tyrimo aiškinamąją reikšmę, gali būti atliekamos papildomos apžiūros, iš anksto numatytos pagal tyrimo planą, pvz., išgyvenusių žiurkių plaučių svėrimas ir (arba) dirginimo įrodymų gavimas atliekant kvėpavimo takų apžiūrą mikroskopu. Taip pat gali būti tiriami organai, turintys didelės 24 valandas arba ilgiau išgyvenusių gyvūnų patologijos požymių, arba organai, apie kuriuos žinoma arba dėl kurių manoma, kad jiems buvo pakenkta. Mikroskopu apžiūrėjus visus kvėpavimo takus, galima gauti naudingos informacijos apie bandomąsias chemines medžiagas, kurios reaguoja su vandeniu, pvz., rūgštis ir higroskopines bandomąsias chemines medžiagas.

DUOMENYS IR ATASKAITOS

Duomenys

34. Turėtų būti pateikti kiekvieno gyvūno masės duomenys ir skrodimo išvados. Klinikinių stebėjimų duomenys turėtų būti apibendrinti lentelėse, pagal kiekvieną bandomąją grupę nurodant naudotų gyvūnų skaičių, gyvūnų, kuriems pasireiškė toksiškumo požymių, skaičių, atliekant bandymą nugaišusių arba dėl humaniškų priežasčių numarintų gyvūnų skaičių, kiekvieno gyvūno žūties laiką, taip pat pateikiant toksinio poveikio aprašymą, pasireiškimo laiką ir grįžtamumą, skrodimo išvadas.

▼M4

Bandymo ataskaita

35. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikta tokia informacija (jeigu taikytina):

Bandomieji gyvūnai ir jų laikymas:

— laikymo sąlygų aprašymas, nurodant gyvūnų skaičių narvelyje (arba skaičiaus pokytį), kraiko medžiagą, aplinkos temperatūrą ir santykinį drėgnį, šviesos ir tamsos kaitą paros metu ir šėrimo režimą,

— naudota rūšis (padermė) ir, jeigu tai ne žiurkės, kitos rūšies naudojimo pagrindimas,

— gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,

— atsitiktinės atrankos metodas,

— išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę (įskaitant pašaro tipą arba šaltinį, vandens šaltinį),

— prieš bandymą sudarytų sąlygų aprašymas, nurodant šėrimo režimą, izoliavimo ir apsaugos nuo ligų būdą.

Bandomoji cheminė medžiaga:

— fizinė būsena, grynumas ir, jeigu taikytina, fizinės ir cheminės savybės (įskaitant izomeriją),

— identifikavimo duomenys ir Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos (angl. CAS) registracijos numeris, jeigu jis žinomas.

Nešiklis:

— nešiklio naudojimo pagrindimas ir nešiklio parinkimo pagrindimas (jeigu tai ne vanduo),

— istoriniai arba vienalaikiai duomenys, įrodantys, kad nešiklis nedaro neigiamo poveikio tyrimo rezultatams.

Inhaliacinė kamera:

— inhaliacinės kameros aprašas, nurodant matmenis ir tūrį,

— įrangos, naudotos darant poveikį gyvūnams ir kuriant atmosferą, šaltinis ir aprašas,

— temperatūros, drėgnio, dalelių dydžio ir faktinės koncentracijos matavimo įranga,

— oro šaltinis, tiekiamo ir (arba) ištraukiamo oro apdorojimas ir kondicionavimo sistema,

— įrangos kalibravimo siekiant užtikrinti homogenišką bandymo atmosferą metodai,

— slėgių skirtumas (teigiamas ar neigiamas),

— kameroje esančios dozės davimo angos (jeigu dozė duodama tik per nosį); gyvūnų vieta sistemoje (jeigu dozė duodama per visą kūną),

— bandymo atmosferos laikinas homogeniškumas ir (arba) pastovumas,

— temperatūros ir drėgnio jutiklių vieta ir kameroje sukurtos bandymo atmosferos ėminių ėmimas,

— oro srauto greičiai, per dozės davimo angą tekančio oro srauto greitis (jeigu dozė duodama tik per nosį) arba gyvūnų kiekis kameroje (jeigu dozė duodama per visą kūną),

— informacija apie deguonies ir anglies dioksido kiekio matavimo įrangą, jeigu tokia naudota,

▼M4

— inhaliacinės kameros pusiausvyros pasiekimo laikas (t_{95}),

— tūrio pokyčių kiekis per valandą,

— matavimo prietaisai (jeigu naudojami).

Poveikio duomenys:

— tikslinės koncentracijos parinkimo pagrindiniam tyrimui pagrindimas,

— vardinės koncentracijos (inhaliacinėje kameroje sukurtos bandomosios cheminės medžiagos bendrosios masės ir viso per kamerą perleisto oro srauto tūrio santykis),

— faktinės bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, nustatytos gyvūnų kvėpavimo zonoje; jeigu bandomi mišiniai, įgaunantys įvairias fizines būsenas (dujos, garai, aerozoliai), kiekviena iš šių būsenų gali būti analizuojama atskirai,

— visos koncentracijos ore turėtų būti nurodomos masės vienetais (pvz., mg/l, mg/m^3 ir t. t.); skliaustuose taip pat gali būti nurodoma tūrio vienetais (pvz., ppm, ppb),

— dalelių dydžio pasiskirstymas, masės medianinis aerodinaminis skersmuo (MMAS) ir geometrinis standartinis nuokrypis (σ_g), nurodant jų apskaičiavimo metodus. Turėtų būti nurodytos atliktos atskiros dalelių dydžio analizės.

Bandymo sąlygos:

— išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos paruošimą, nurodant procedūras, taikytas siekiant sumažinti kietųjų cheminių medžiagų dalelių dydį arba paruošti bandomosios cheminės medžiagos tirpalus. Jeigu mechaniniais procesais galėjo būti pakeista bandomosios cheminės medžiagos sudėtis, pateikite bandomosios cheminės medžiagos sudėties patikros analizių rezultatus,

— įrangos, naudotos kuriant bandymo atmosferą ir veikiant gyvūnus bandymo atmosfera, aprašas (pageidautina, pateikiant diagramą),

— išsami informacija apie taikytą cheminės analizės metodą ir metodo tinkamumo patvirtinimą (nurodant bandomosios cheminės medžiagos regeneravimo iš ėminių ėmimo terpės veiksmingumą),

— bandomųjų koncentracijų parinkimo pagrindimas.

Rezultatai:

— kameros temperatūrų, drėgnio ir oro srautų lentelės,

— kameros vardinės ir faktinės koncentracijos duomenų lentelės,

— dalelių dydžių lentelės, pateikiant analizinių ėminių ėmimo duomenis, dalelių dydžių pasiskirstymą ir MMAS bei σ_g skaičiavimus,

— kiekvieno gyvūno reakcijos duomenų ir jam taikyto koncentracijos lygio lentelės (t. y. gyvūnų, kuriems pasireiškė toksiškumo požymių, nurodant gaištamumą, poveikio pobūdį, sunkumą ir trukmę),

— kiekvieno gyvūno masė, nustatyta tyrimo dienomis; žūties data ir laikas, jeigu gyvūnas nugaišo dar prieš numatytą numarinimą; toksiškumo požymių atsiradimo laikas ir ar šių požymių pasireiškimas kiekvieno gyvūno atveju buvo grįžtamasis,

▼M4

— kiekvieno gyvūno skrodimo išvados ir histopatologinių tyrimų rezultatai, jeigu yra,

— kategorija pagal CLP klasifikaciją ir LC_{50} ribinė vertė.

Rezultatų aptarimas ir aiškinimas

— Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas metodų, taikytų siekiant laikytis šio bandymo metodo kriterijų, pvz., susijusių su ribine koncentracija arba dalelių dydžiu, aprašymui,

— atsižvelgiant į bendruosius rezultatus, turėtų būti aprašyta dalelių įkvėpimo galimybė, ypač jeigu nebuvo įmanoma taikyti dalelių dydžio kriterijaus,

— pateikiant bendrąjį tyrimo vertinimą, turėtų būti nurodytas metodų, taikytų nustatyti vardines ir faktines koncentracijas, nuoseklumas ir faktinės koncentracijos santykis su vardine koncentracija,

— turėtų būti aprašyta tikėtina žūties priežastis ir vyraujantis veikimo būdas (sisteminis ar vietinis),

— atsižvelgiant į OECD rekomendaciniame dokumente dėl pasekmių žmonėms (7) nustatytus kriterijus, turėtų būti pateiktas paaiškinimas, ar kilo poreikis humaniškai numarinti gyvūnus, patiriančius skausmą arba sunkią ilgalaikę kančią.

LITERATŪRA

1. Šio priedo B.2 skyrius. Ūmus toksiškumas įkvėpus.

2. Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243–254.

3. Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537–549.

4. Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1: 129–134.

5. Šio priedo B.1 tris skyrius. Ūmus toksiškumas per virškinamąjį traktą. Ūmaus toksiškumo klasės nustatymo metodas.

6. OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

7. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in SAFEty Evaluation. Environmental Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

8. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

9. 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353, 2008 12 31, p. 1.

▼**M4**

10. Šio priedo B.40 skyrius. Odos ėsdinimas *in vitro*. Odos sluoksnio elektrinės varžos (OSEV) bandymas.

11. Šio priedo B.40 bis skyrius. Odos ėsdinimas *in vitro*. Žmogaus odos modelio bandymas.

12. OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

13. Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

14. SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321–327.

15. Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160–167

16. UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Available: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]

▼**M4**

1 priedėlis

APIBRĖŽTIS

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

▼M4

2 priedėlis

Procedūra, atliktina taikant kiekvieną pradinę dujų koncentraciją (ppm/4 h)

Bendros pastabos ([1])

Šiame priede kiekvienai pradinei koncentracijai pateiktos atitinkamos bandymų schemos, kuriomis nurodytos taikytinos procedūros.

2a priedėlis. Pradinė koncentracija – 100 ppm.

2b priedėlis. Pradinė koncentracija – 500 ppm.

2c priedėlis. Pradinė koncentracija – 2 500 ppm.

2d priedėlis. Pradinė koncentracija – 20 000 ppm.

Atsižvelgiant į humaniškai numarintų arba nugaišusių gyvūnų skaičių, bandymų procedūra vykdoma vadovaujantis pateiktomis rodyklėmis.

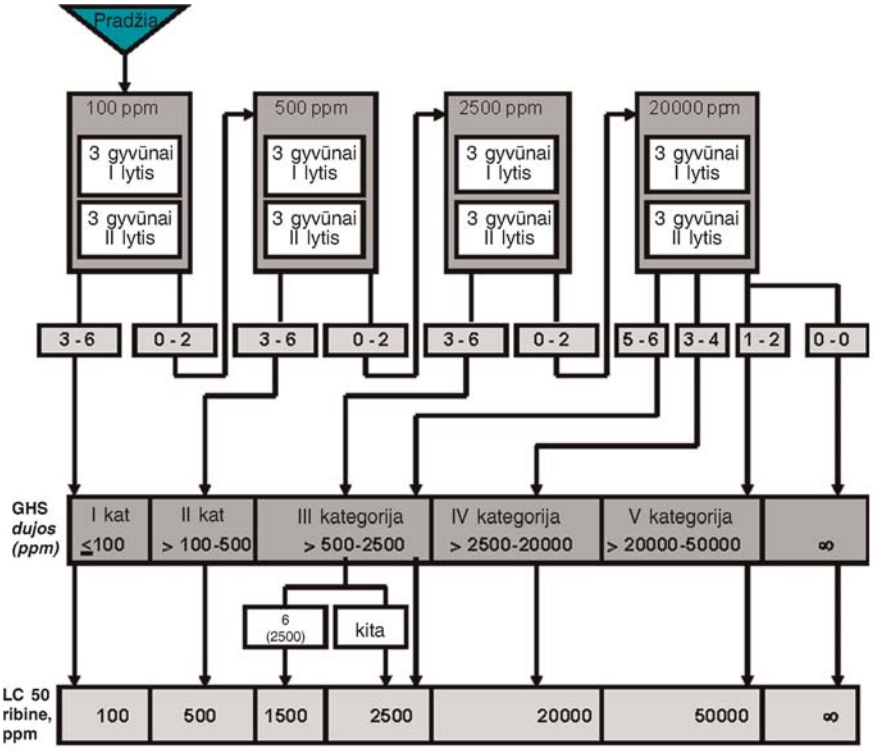
([1]) Toliau pateiktose lentelėse pateiktos nuorodos į visuotinai suderintą cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemą (angl. GHS). ES atitikmuo – Reglamentas (EB) Nr. 1272/2008. Reglamentu (EB) Nr. 1272/2008 (9) nereglamentuojamas 5 kategorijos cheminių medžiagų ūmus toksiškumas įkvėpus.

▼M4

2a priedėlis

Ūmus inhaliacinis toksiškumas.

Bandymų procedūra taikant pradinę 100 ppm/4 h dujų koncentraciją



— Kiekvienam lygiui naudojami 3 patinai ir 3 patelės arba 6 jautresniosios lyties gyvūnai.

— 0-6: taikant bandomąją koncentraciją nustatytas gaišusių gyvūnų skaičius.

— GHS: visuotinai suderinta klasifikavimo sistema.

— ∞: neklasifikuojama.

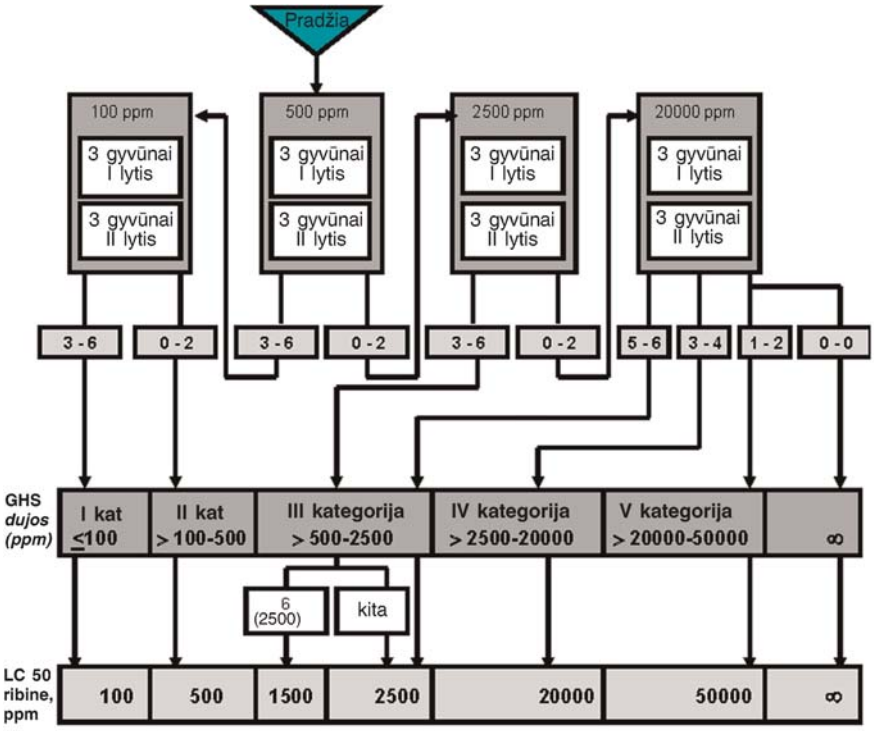
— Bandymai taikant didesnę kaip 20 000 ppm/4 h koncentraciją: žr. Rekomendacinį dokumentą Nr. 39 (8).

▼M4

2b priedėlis

Ūmus inhaliacinis toksiškumas.

Bandymų procedūra taikant pradinę 500 ppm/4 h dujų koncentraciją



— Kiekvienam lygiui naudojami 3 patinai ir 3 patelės arba 6 jautresniosios lyties gyvūnai.

— 0-6: taikant bandomąją koncentraciją nustatytas gaišusių gyvūnų skaičius.

— GHS: visuotinai suderinta klasifikavimo sistema.

— ∞: neklasifikuojama.

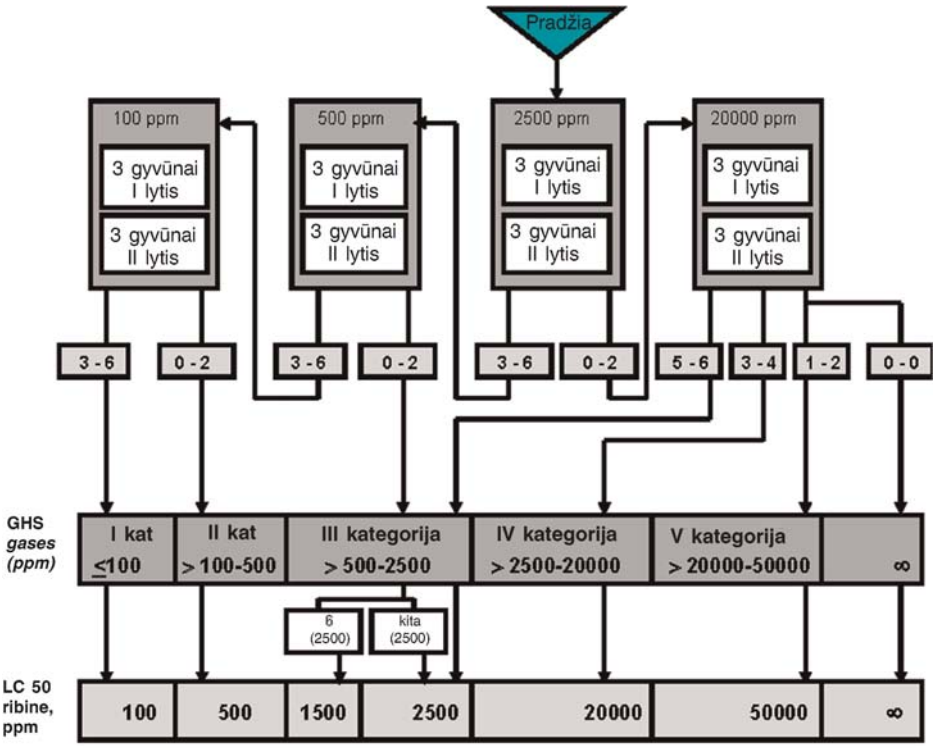
— Bandymai taikant didesnę kaip 20 000 ppm/4 h koncentraciją: žr. Rekomendacinį dokumentą Nr. 39 (8).

▼M4

2c priedėlis

Ūmus inhaliacinis toksiškumas.

Bandymų procedūra taikant pradinę 2 500 ppm/4 h dujų koncentraciją



— Kiekvienam lygiui naudojami 3 patinai ir 3 patelės arba 6 jautresniosios lyties gyvūnai.

— 0–6: taikant bandomąją koncentraciją nustatytas gaišusių gyvūnų skaičius.

— GHS: visuotinai suderinta klasifikavimo sistema.

— ∞: neklasifikuojama.

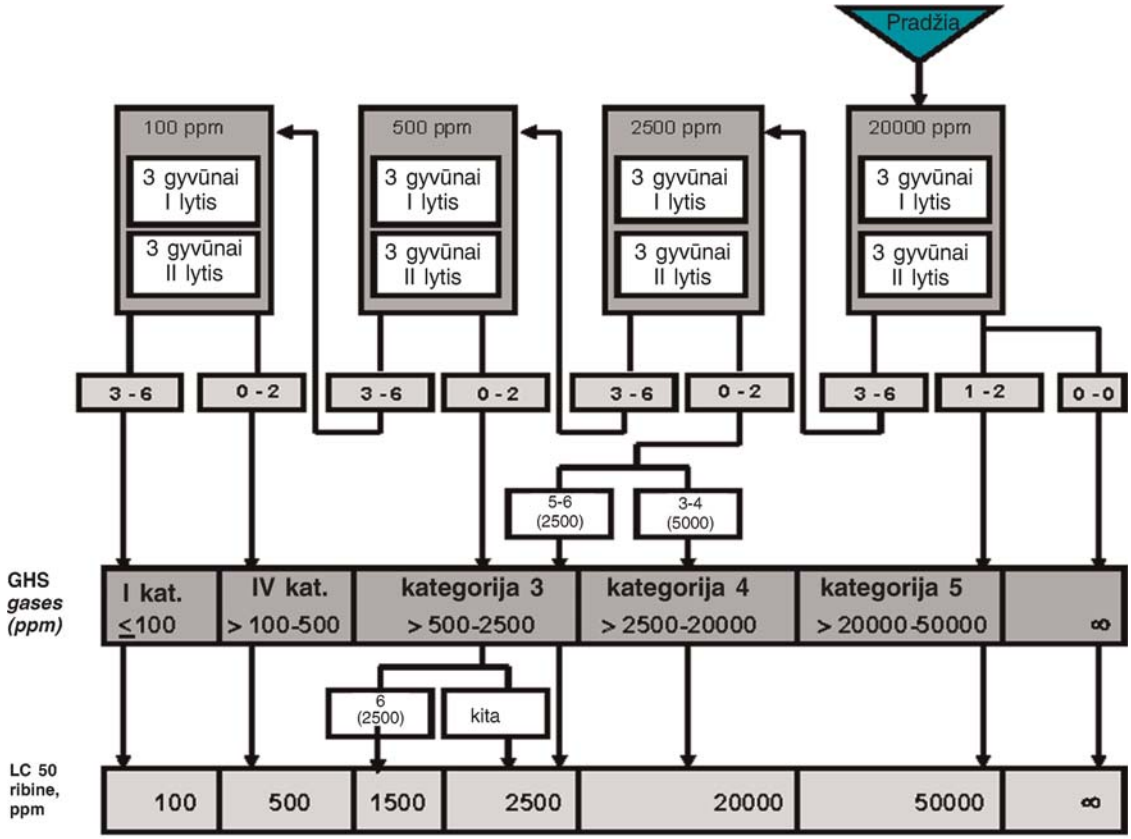
— Bandymai taikant didesnę kaip 20 000 ppm/4 h koncentraciją: žr. Rekomendacinį dokumentą Nr. 39 (8).

▼M4

2d priedėlis

Ūmus inhaliacinis toksiškumas.

Bandymų procedūra taikant pradinę 20 000 ppm/4 h dujų koncentraciją



— Kiekvienam lygiui naudojami 3 patinai ir 3 patelės arba 6 jautresniosios lyties gyvūnai.

— 0-6: taikant bandomąją koncentraciją nustatytas gaištančių arba nu gaisusių gyvūnų skaičius.

— GHS: visuotinai suderinta klasifikavimo sistema.

— ∞: neklasifikuojama.

— Bandymai taikant didesnę kaip 20 000 ppm/4 h koncentraciją: žr. rekomendacinį dokumentą Nr. 39 (8).

▼M4

3 priedėlis

Procedūra, atliktina taikant kiekvieną pradinę garų koncentraciją (mgl/l/4 h)

Bendros pastabos ([1])

Šiame priede kiekvienai pradinei koncentracijai pateiktos atitinkamos bandymų schemos, kuriomis nurodytos taikytinos procedūros.

3a priedėlis. Pradinė koncentracija – 0,5 mg/l.

3b priedėlis. Pradinė koncentracija – 2,0 mg/l.

3c priedėlis. Pradinė koncentracija – 10 mg/l.

3d priedėlis. Pradinė koncentracija – 20 mg/l.

Atsižvelgiant į humaniškai numarintų arba nugaišusių gyvūnų skaičių, bandymų procedūra vykdoma vadovaujantis pateiktomis rodyklėmis.

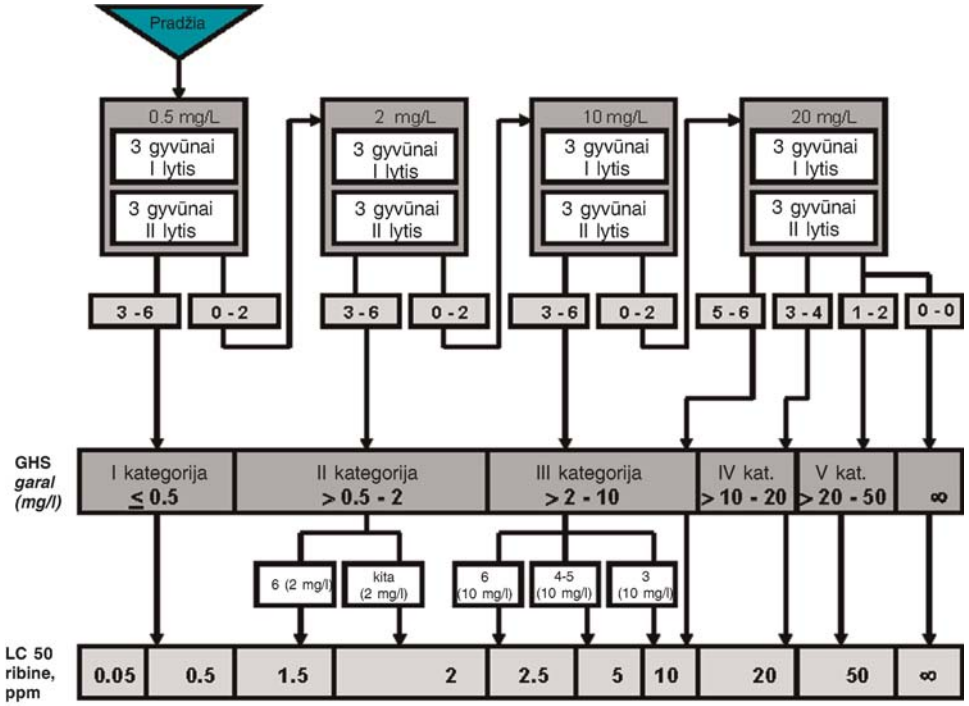
([1]) Toliau pateiktose lentelėse pateiktos nuorodos į visuotinai suderintą cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemą (angl. GHS). ES atitikmuo – Reglamentas (EB) Nr. 1272/2008. Reglamentu (EB) Nr. 1272/2008 (9) nereglamentuojamas 5 kategorijos cheminių medžiagų ūmus toksiškumas įkvėpus.

▼M4

3a priedėlis

Ūmus inhaliacinis toksiškumas.

Bandymų procedūra taikant pradinę 0,5 mg/l/4 h garų koncentraciją



— Kiekvienam lygiui naudojami 3 patinai ir 3 patelės arba 6 jautresniosios lyties gyvūnai.

— 0-6: taikant bandomąją koncentraciją nustatytas gaištančių arba nu gaisusių gyvūnų skaičius.

— GHS: visuotinai suderinta klasifikavimo sistema.

— ∞: neklasifikuojama.

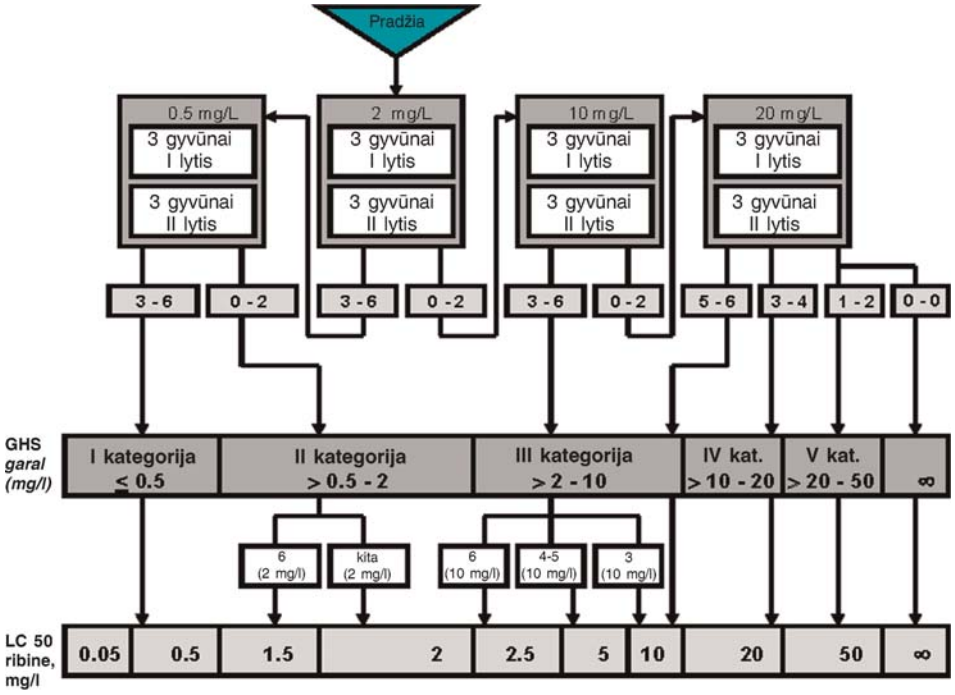
— Bandymai taikant didesnę kaip 20 000 ppm/4 h koncentraciją: žr. Rekomendacinį dokumentą Nr. 39 (8).

▼M4

3b priedėlis

Ūmus inhaliacinis toksiškumas.

Bandymų procedūra taikant pradinę 2 mg/l/4 h garų koncentraciją



— Kiekvienam lygiui naudojami 3 patinai ir 3 patelės arba 6 jautresniosios lyties gyvūnai.

— 0–6: taikant bandomąją koncentraciją nustatytas gaištančių arba nu gaisusių gyvūnų skaičius.

— GHS: visuotinai suderinta klasifikavimo sistema.

— ∞: neklasifikuojama.

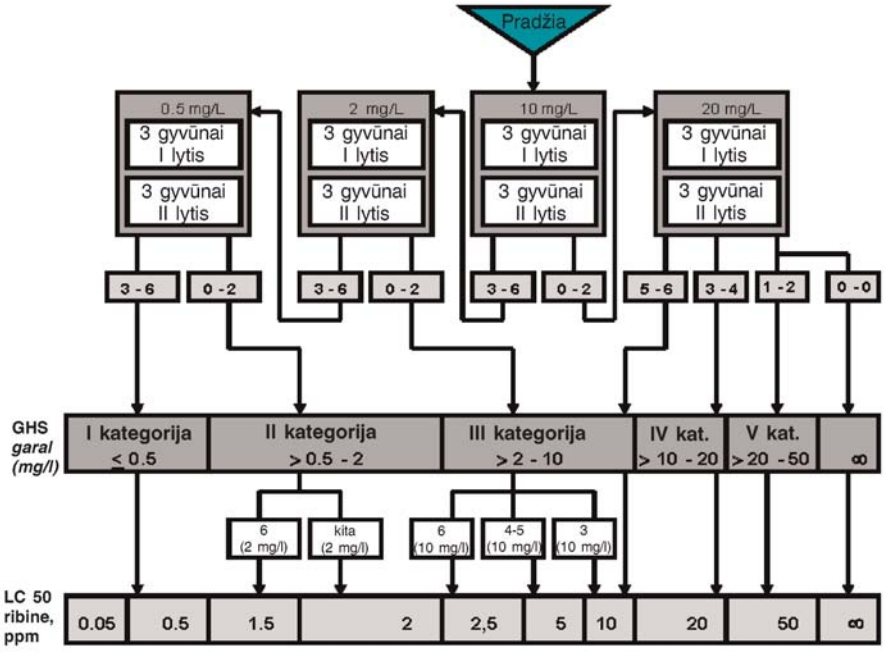
— Bandymai taikant didesnę kaip 20 000 ppm/4 h koncentraciją: žr. Rekomendacinį dokumentą Nr. 39 (8).

▼M4

3c priedėlis

Ūmus inhaliacinis toksiškumas.

Bandymų procedūra taikant pradinę 10 mg/l/4 h garų koncentraciją



— Kiekvienam lygiui naudojami 3 patinai ir 3 patelės arba 6 jautresniosios lyties gyvūnai.

— 0–6: taikant bandomąją koncentraciją nustatytas gaištančių arba nu gaisusių gyvūnų skaičius.

— GHS: visuotinai suderinta klasifikavimo sistema.

— ∞: neklasifikuojama.

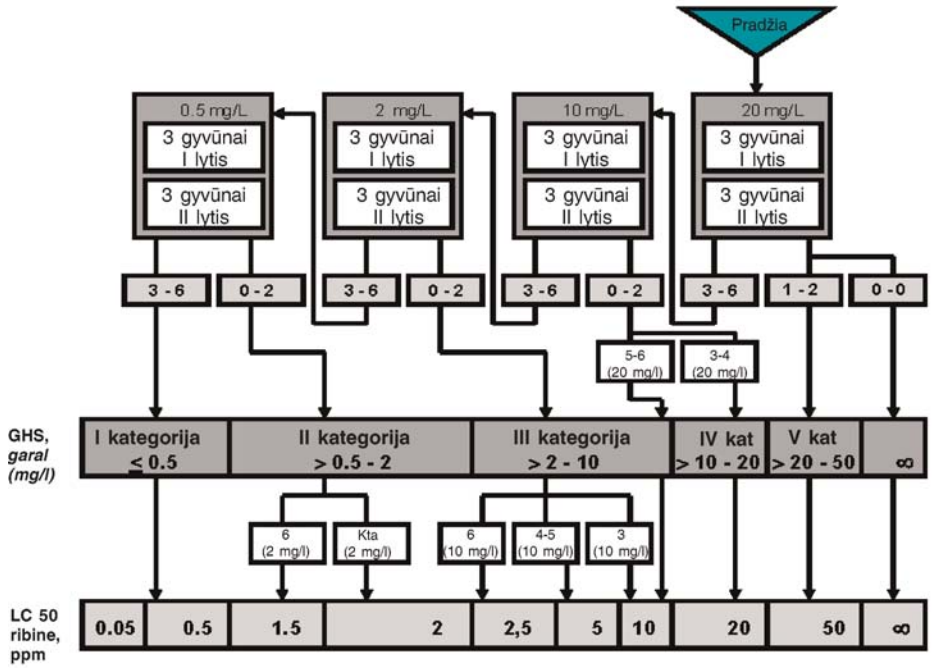
— Bandymai taikant didesnę kaip 20 000 ppm/4 h koncentraciją: žr. Rekomendacinį dokumentą Nr. 39 (8).

▼M4

3d priedėlis

Ūmus inhaliacinis toksiškumas.

Bandymų procedūra taikant pradinę 20 mg/l/4 h garų koncentraciją



— Kiekvienam lygiui naudojami 3 patinai ir 3 patelės arba 6 jautresniosios lyties gyvūnai.
— 0-6: taikant bandomąją koncentraciją nustatytas gaišusių gyvūnų skaičius.
— GHS: visuotinai suderinta klasifikavimo sistema.
— ∞: neklasifikuojama.
— Bandymai taikant 50 mg/l/4 h koncentraciją: žr. rekomendacinį dokumentą Nr. 39 (8).

▼M4

4 priedėlis

Procedūra, atliktina taikant kiekvieną pradinę aerozolių koncentraciją (mgl/l/4 h)

Bendros pastabos ([1])

Šiame priede kiekvienai pradinei koncentracijai pateiktos atitinkamos bandymų schemos, kuriomis nurodytos taikytinos procedūros.

4a priedėlis. Pradinė koncentracija – 0,05 mg/l.

4b priedėlis. Pradinė koncentracija – 0,5 mg/l.

4c priedėlis. Pradinė koncentracija – 1 mg/l.

4d priedėlis. Pradinė koncentracija – 5 mg/l.

Atsižvelgiant į humaniškai numarintų arba nugaišusių gyvūnų skaičių, bandymų procedūra vykdoma vadovaujantis pateiktomis rodyklėmis.

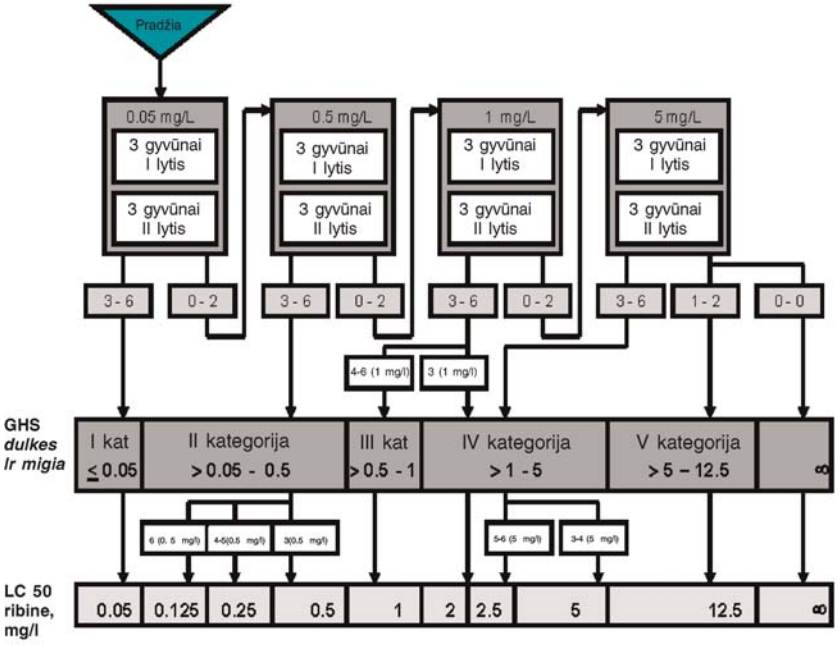
([1]) Toliau pateiktose lentelėse pateiktos nuorodos į visuotinai suderintą cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemą (angl. GHS). ES atitikmuo – Reglamentas (EB) Nr. 1272/2008. Reglamentu (EB) Nr. 1272/2008 (9) nereglamentuojamas 5 kategorijos cheminių medžiagų ūmus toksiškumas įkvėpus.

▼M4

4a priedėlis

Ūmus inhaliacinis toksiškumas.

Bandymų procedūra taikant pradinę 0,05 mg/l/4 h garų koncentraciją



— Kiekvienam lygiui naudojami 3 patinai ir 3 patelės arba 6 jautresniosios lyties gyvūnai.

— 0-6: taikant bandomąją koncentraciją nustatytas gaišusių gyvūnų skaičius.

— GHS: visuotinai suderinta klasifikavimo sistema.

— ∞: neklasifikuojama.

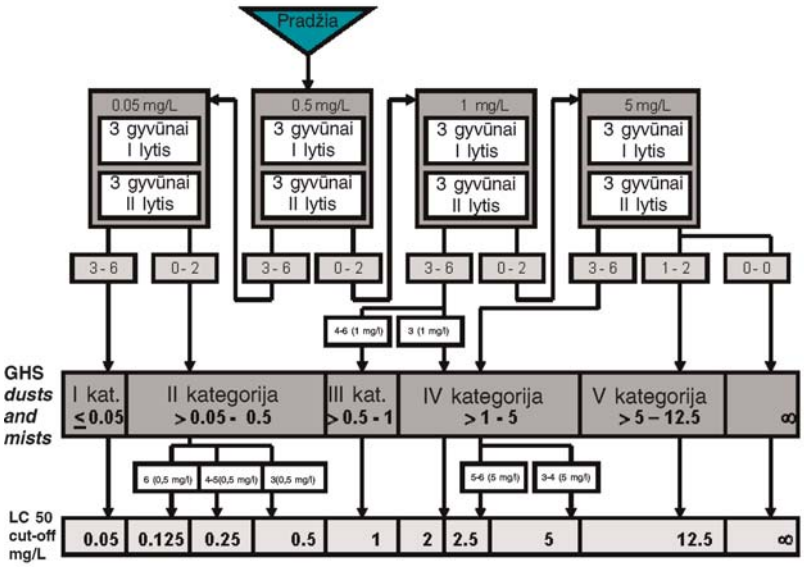
— Bandymai taikant 12,5 mg/l/4 h koncentraciją: žr. rekomendacinį dokumentą Nr. 39 (8).

▼M4

4b priedėlis

Ūmus inhaliacinis toksiškumas.

Bandymų procedūra taikant pradinę 0,5 mg/l/4 h aerozolių koncentraciją



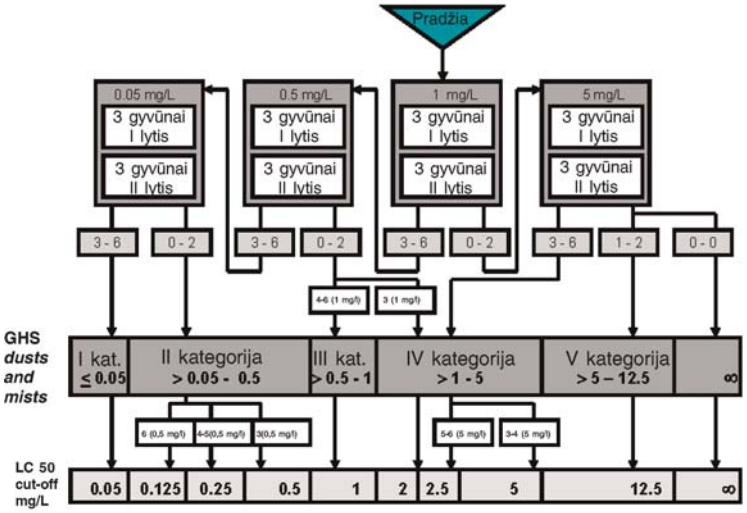
— Kiekvienam lygiui naudojami 3 patinai ir 3 patelės arba 6 jautresniosios lyties gyvūnai.
— 0-6: taikant bandomąją koncentraciją nustatytas gaišusių gyvūnų skaičius.
— GHS: visuotinai suderinta klasifikavimo sistema.
— ∞: neklasifikuojama.
— Bandymai taikant didesnę kaip 20 000 ppm/4 h koncentraciją: žr. Rekomendacinį dokumentą Nr. 39 (8).

▼M4

4c priedėlis

Ūmus inhaliacinis toksiškumas.

Bandymų procedūra taikant pradinę 1 mg/l/4 h aerozolių koncentraciją



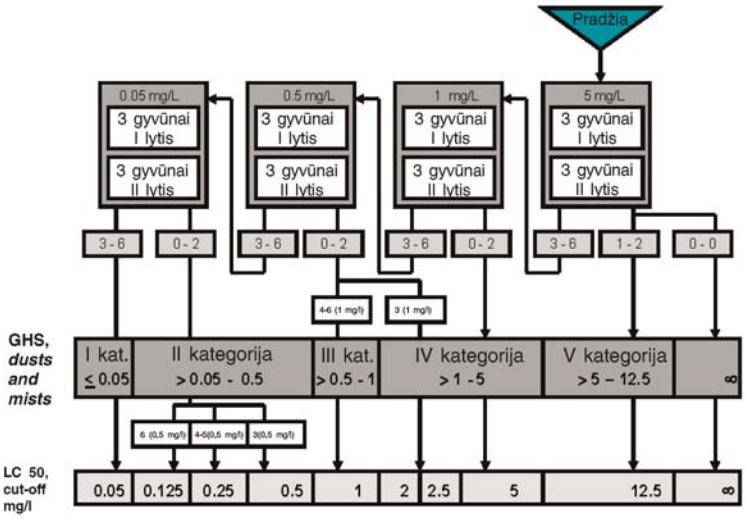
— Kiekvienam lygiui naudojami 3 patinai ir 3 patelės arba 6 jautresniosios lyties gyvūnai.
— 0-6: taikant bandomąją koncentraciją nustatytas gaišusių gyvūnų skaičius.
— GHS: visuotinai suderinta klasifikavimo sistema.
— ∞: neklasifikuojama.
— Bandymai taikant didesnę kaip 20 000 ppm/4 h koncentraciją: žr. Rekomendacinį dokumentą Nr. 39 (8).

▼M4

4d priedėlis

Ūmus inhaliacinis toksiškumas.

Bandymų procedūra taikant pradinę 5 mg/l/4 h aerozolių koncentraciją



— Kiekvienam lygiui naudojami 3 patinai ir 3 patelės arba 6 jautresniosios lyties gyvūnai.
— 0-6: taikant bandomąją koncentraciją nustatytas gaišusių gyvūnų skaičius.
— GHS: visuotinai suderinta klasifikavimo sistema.
— ∞: neklasifikuojama.
— Bandymai taikant didesnę kaip 20 000 ppm/4 h koncentraciją: žr. Rekomendacinį dokumentą Nr. 39 (8).“

▼M5

B.53. TOKSINIO POVEIKIO NERVŲ SISTEMOS VYSTYMUISI TYRIMAS

ĮŽANGA

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO Bandymų gaires (angl. OECD *Test Guideline (TG)*) Nr. 426 (2007). 1995 m. birželio mėn. Kopenhagoje EBPO Toksinio poveikio dauginimuisi ir vystymuisi tyrimo darbo grupė aptarė poreikį atnaujinti esamas EBPO toksinio poveikio dauginimuisi ir vystymuisi bandymų gaires ir parengti naujas dar neaptartų vertinamųjų baigčių bandymų gaires (1). Darbo grupė rekomendavo toksinio poveikio nervų sistemos vystymuisi bandymų gaires rengti remiantis JAV aplinkos apsaugos agentūros (angl. US EPA) gairėmis; šios gairės nuo to laiko buvo pakeistos (2). 1996 m. birželio mėn. Kopenhagoje įvyko antras konsultacinis posėdis, surengtas siekiant padėti Sekretoriatui rengti naujų toksinio poveikio nervų sistemos vystymuisi bandymo gairių projektą, taip pat patarti dėl pagrindinių šių gairių punktų, pavyzdžiui, dėl dalykų, susijusių su gyvūnų rūšių pasirinkimu, dozių davimo laikotarpiu, bandymo laikotarpiu, vertinamosiomis baigtimis ir rezultatų vertinimo kriterijais. JAV toksinio poveikio nervų sistemai rizikos vertinimo gairės paskelbtos 1998 m. (3). EBPO ekspertų konsultacinis posėdis ir Tarptautinio gyvybės mokslų instituto (angl. ILSI) Rizikos mokslų instituto seminaras surengtas 2000 m. spalio mėn., ekspertų konsultacinis posėdis įvyko 2005 m. Tokijuje. Šie posėdžiai surengti moksliniams ir techniniams klausimams, susijusiems su esamomis bandymų gairėmis, aptarti; rengiant šį bandymų metodą atsižvelgta į per posėdžius pateiktas rekomendacijas (4) (5) (6) (7). Papildoma informacija apie šio bandymų metodo taikymą, aiškinimą ir terminus pateikiama EBPO Rekomendaciniame dokumente (angl. OECD *Guidance Document*) Nr. 43 ‘Reproductive Toxicity Testing and Assesment’ (8) ir Nr. 20 ‘Neurotoxicity Testing’ (9).

PRADINIAI ASPEKTAI

2. Yra žinoma, kad kai kurios cheminės medžiagos daro toksinį poveikį žmonių ir kitų rūšių gyvūnų nervų sistemos vystymuisi (10) (11) (12) (13). Galimą cheminės medžiagos toksinį poveikį nervų sistemos vystymuisi gali prireikti nustatyti tam, kad būtų galima nustatyti ir įvertinti cheminės medžiagos toksines savybes. Toksinio poveikio nervų sistemos vystymuisi tyrimų tikslas – surinkti duomenis, įskaitant duomenis apie dozių ir atsako ryšio ypatumus, apie galimą funkcinį ir morfologinį poveikį palikuonių nervų sistemos vystymuisi, galintį atsirasti toms medžiagoms palikuonis veikiant gimdoje ir gyvenimo pradžioje.

3. Toksinio poveikio nervų sistemos vystymuisi tyrimą galima atlikti kaip atskirą tyrimą, įtraukti į toksinio poveikio dauginimuisi ir (arba) toksinio poveikio suaugusių gyvūnų nervų sistemai tyrimą (pvz., B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16) bandymų metodai) arba sujungti su toksinio poveikio prenataliniam vystymuisi tyrimu (pvz., B.31 bandymų metodas (17)). Jeigu toksinio poveikio nervų sistemos vystymuisi tyrimas įtraukiamas į kitą tyrimą arba sujungiamas su kitu tyrimu, būtina išlaikyti abiejų rūšių tyrimų vientisumą. Visi bandymai turėtų atitikti taikomus teisės aktus, valdžios institucijų ir įstaigų gaires dėl laboratorinių gyvūnų naudojimo moksliniams tyrimams (pvz., 18).

4. Bandymų laboratorijos darbuotojai, prieš atlikdami tyrimą, turėtų susipažinti su visa turima informacija apie bandomąją cheminę medžiagą. Ši informacija – tai cheminės medžiagos tapatumas ir struktūra, jos fizikinės ir cheminės savybės, visų kitų cheminės medžiagos *in vitro* arba *in vivo* toksinio poveikio bandymų rezultatai, gimininges struktūros cheminių medžiagų toksikologiniai duomenys ir numatomas (-i) medžiagos naudojimo būdas (-ai). Ši informacija yra reikalinga, kad visiems suinteresuotiesiems asmenims būtų įrodyta, jog bandymas yra svarbus žmonių sveikatai saugoti ir padės pasirinkti tinkamą pradinę dozę.

▼M5

BANDYMŲ METODO PRINCIPAS

5. Bandomoji cheminė medžiaga duodama gyvūnams gestacijos ir laktacijos laikotarpiu. Bandymai su motininėmis patelėmis atliekami siekiant įvertinti poveikį vaikingoms ir žindančioms patelėms, jie taip pat gali suteikti palyginamosios informacijos (motininės patelės *versus* palikuonys). Palikuonys toksiniam poveikiui nervų sistemos vystymuisi įvertinti atrenkami iš vadų atsitiktine tvarka. Vertinimą sudaro stebėjimai, kuriais siekiama nustatyti bendras neurologines ir elgsenos anomalijas, įskaitant fizinį vystymąsi, elgsenos ontogenezę, motorinį aktyvumą, motorinę ir jutiminę funkcijas, mokymąsi ir atmintį; jį taip pat sudaro galvos smegenų masės ir neuropatologinis vertinimas postnatalinio vystymosi ir brandos laikotarpiais.

6. Kai bandymų metodas yra taikomas kaip atskiras tyrimas, papildomai turimi kiekvienos grupės gyvūnai gali būti panaudoti konkretiems neurobihevioristiniams, neuropatologiniams, neurocheminiams arba elektrofiziologiniams bandymams, kurių rezultatais galima papildyti duomenis, gautus atliekant pagal šį bandymų metodą rekomenduojamus tyrimus (16) (19) (20) (21). Papildomi bandymai gali būti ypač naudingi, kai praktiniai stebėjimai, numatomas poveikis arba veikimo mechanizmo/būdo duomenys atskleidžia, kad neurotoksiškumas yra specifinio pobūdžio. Šie papildomi bandymai gali būti taikomi ir motininėms patelėms, ir jaunikliams. Be to, dar galima atlikti *ex vivo* arba *in vitro* bandymus, jei jais nekeičiamas *in vivo* bandymų vientisumas.

PASIRENGIMAS BANDYMUI

Gyvūnų rūšies parinkimas

7. Tinkamiausia bandomųjų gyvūnų rūšis yra žiurkės; jei reikia, galima naudoti kitas gyvūnų rūšis. Tačiau reikėtų atkreipti dėmesį, kad pagal šį bandymų metodą nurodytas gestacinio ir postnatalinio laikotarpių dienų skaičius yra būdingas būtent dažniausiai naudojamų veislių žiurkėms; jeigu pasirenkama kita gyvūnų rūšis arba ne dažniausiai naudojama veislė, reikėtų atitinkamai pakoreguoti dienų skaičių. Kitos rūšies naudojimas turėtų būti pagrįstas toksikologiniais, farmakokinetikos ir (arba) kitais duomenimis. Į pagrindimą reikėtų įtraukti informaciją apie tai, ar yra atlikti tos rūšies postnatalinis neurobihevioristinis ir neuropatologinis vertinimai. Jeigu anksčiau buvo atliktas bandymas, per kurį kilo rūpestį keliančių klausimų, reikėtų atkreipti dėmesį į rūšis/veislę, dėl kurios kilo rūpestį keliantis klausimas. Dėl skirtingų veislių žiurkėms būdingų skirtingų elgsenos savybių reikėtų surinkti įrodymus, kad pasirinktos veislės žiurkės yra pakankamai vaisingos ir pakankamai jautrios. Kitų rūšių patikimumą ir jautrumą tiriant toksinį poveikį nervų sistemos vystymuisi reikėtų pagrįsti dokumentais.

Laikymo ir šėrimo sąlygos

8. Bandomųjų gyvūnų patalpos temperatūra turėtų būti 22 ± 3 °C. Nors santykinė oro drėgmė turėtų būti mažiausiai 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikėtų siekti, kad ji būtų 50–60 %. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, jo seka: 12 h šviesos ir 12 h tamsos. Apšvietimo ciklą taip pat galima keisti prieš poravimąsi ir per tyrimą, siekiant įvertinti funkcines ir elgsenos tamsoje (šviečiant raudonai šviesai), t. y. laikotarpiu, kada gyvūnai paprastai būna aktyvūs, vertinamąsias baigtis (22). Darant bet kokius šviesos ir tamsos ciklo pakeitimus, reikėtų numatyti pakankamai laiko aklimatizavimuisi, kad gyvūnai galėtų prisitaikyti prie naujo ciklo. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, o geriamojo vandens kiekis neribojamas. Pašaro ir vandens pobūdį reikėtų aprašyti, abu reikėtų ištirti, ar juose nėra teršalų.

▼M5

9. Gyvūnai narveliuose gali būti laikomi atskirai arba mažomis tos pačios lyties grupėmis. Poruojama turėtų būti šiam tikslui pritaikytuose narveliuose. Pasitvirtinus susiporavimui arba ne vėliau kaip 15 gestacijos dieną suporuoti gyvūnai turėtų būti atskiriami ir laikomi po vieną atsivedimo arba veisimo narveliuose. Narveliai išdėstomi taip, kad būtų kiek įmanoma sumažintas bet koks galimas poveikis dėl narvelio buvimo vietos. Artėjant atsivedimui, suporuotos patelės turėtų būti aprūpinamos tinkamomis ir nustatytomis gūžtos sukimo medžiagomis. Gerai žinoma, kad netinkamas elgesys su gyvūnais arba stresas gestacijos metu gali turėti neigiamų padarinių, tarp jų – būti prenatalinio vados netekimo, vaisiaus arba postnatalinio vystymosi pakitimų priežastimi. Siekiant apsisaugoti nuo vaisiaus praradimo dėl veiksnių, nesusijusių su bandomosios cheminės medžiagos davimu, su gyvūnais gestacijos laikotarpiu reikėtų elgtis atsargiai ir vengti išorės veiksnių, pavyzdžiui, pernelyg didelio išorės triukšmo, keliamo streso.

Gyvūnų paruošimas

10. Reikėtų naudoti sveikus dar bandymams nenaudotus ir prie laboratorijos sąlygų pripratintus gyvūnus, nebent tyrimas yra įtrauktas į kitą tyrimą (žr. 3 punktą). Bandomieji gyvūnai turėtų būti aprašomi nurodant jų rūšį, veislę, šaltinį, lytį, masę ir amžių. Kiekvienam gyvūnui reikėtų priskirti unikalų identifikavimo numerį ir kiekvieną gyvūną juo pažymėti. Kiek įmanoma, visų bandymo grupių gyvūnai turėtų būti vienodos masės ir amžiaus ir atitikti normalias tiriamos rūšies ir veislės savybes. Kiekvienu dozės lygmeniu turėtų būti naudojamos jaunos, suaugusios, palikuonių neturėjusios patelės. Reikėtų vengti vienų tėvų palikuonių poravimo ir pasirūpinti, kad taip nenutiktų. 0 gestacijos diena (GD) yra vaginalinio kamščio ir (arba) spermos atsiradimo diena. Jeigu iš tiekėjo įsigyjamos jau vaikingos patelės, reikėtų joms leisti kurį laiką aklimatizuotis (pvz., 2–3 dienas). Apvaisintos patelės atsitiktinės atrankos būdu suskirstomos į kontrolinę ir bandomąją grupes ir kuo tolygiau paskirstomos po visas grupes (pvz., norint užtikrinti vienodą paskirstymą po visas grupes, rekomenduojama taikyti stratifikuotą atsitiktinę atranką, pavyzdžiui, pagal kūno masę). Grupėse turėtų būti po vienodą skaičių to paties patino apvaisintų patelių.

BANDYMO PROCEDŪRA

Gyvūnų skaičius ir lytis

11. Kiekvienoje bandymo ir kontrolinėje grupėje turėtų būti pakankamas vaikingų patelių, kurios bus veikiamos bandomąja chemine medžiaga, skaičius tam, kad būtų gauta pakankamai palikuonių neurotoksiškumui vertinti. Kiekvienu dozės lygmeniu iš viso rekomenduojama naudoti po 20 vadų. Grupėms galima taikyti kartotinio arba šachmatinio dozavimo modelį, jeigu kiekvienoje grupėje užtikrinamas reikiamas bendras vadų skaičius ir taikomi tinkami statistiniai modeliai kartotinio dozavimo rezultatams apskaityti.

12. 4 postnatalinę dieną (PND) arba prieš tai (atsivedimo diena yra 0 PND) kiekvienos vados jauniklių skaičius pakoreguojamas išimant atsitiktine tvarka atrinktus perteklinius jauniklius, kad visos vados būtų vienodo dydžio (23). Vados dydis neturėtų viršyti naudojamos veislės graužikų vidutinio vados dydžio (8–12). Vadoje turėtų būti, jeigu tik tai įmanoma, po vienodą skaičių vyriškos ir moteriškos lyties jauniklių. Selektyvus jauniklių eliminavimas, pvz., pagal kūno masę, nepriimtinas. Vadas standartizavus (atlikus brokavimą) prieš atliekant tolesnį funkcinių vertinamųjų baigčių bandymą, tie konkretūs jaunikliai, kuriuos ketinama tirti prieš nujunkymą, ir tie, kuriuos ketinama tirti po nujunkymo, turėtų būti pažymėti unikalia žyma, naudojant bet kurį tinkamą humanišką jauniklių ženklinimo metodą (pvz., 24).

▼M5

Gyvūnų suskirstymas funkciniams ir elgsenos bandymams, galvos smegenų masės ir neuropatologiniam įvertinimui

13. Pagal šį bandymų metodą galima taikyti įvairius būdus gyvūnams, kuriems *in utero* ir laktacijos laikotarpiu bus atliekami funkciniai ir elgsenos bandymai, vertinamas lytinis subrendimas, nustatoma galvos smegenų masė ir atliekamas neuropatologinis vertinimas, suskirstyti (25). Tam tikrais atvejais papildomai galima atlikti ir kitus neurobihevioristinės funkcijos (pvz., socialinės elgsenos), neurocheminius arba neuropatologinius bandymus, jeigu dėl to nebus pažeistas pagrindinių reikalingų bandymų vientisumas.

14. Jaunikliai atrenkami iš kiekvienos dozės grupės ir paskirstomi vertinamosioms baigtims vertinti 4 PND arba vėliau. Jauniklius reikėtų atrinkti taip, kad per kiekvieną bandymą kiekvienos dozės grupėje iš kiekvienos vados būtų, kiek tai yra įmanoma, paimta po lygiai abiejų lyčių gyvūnų. Atliekant motorinio aktyvumo bandymą, bandymai visais amžiaus etapais iki nujunkymo atliekami su ta pačia vyriškos ir moteriškos lyties jauniklių pora (žr. 35 punktą). Atliekant visus kitus elgsenos bandymus, galima imti tas pačias arba skirtingas vyriškos ir moteriškos lyties gyvūnų poras. Atliekant nujunkytų jauniklių *versus* suaugusių gyvūnų kognityvinės funkcijos bandymus, gali tekti paskirti skirtingus jauniklius, taip siekiant išvengti rezultatų iškraipymo dėl amžiaus ir dėl išsidresavimo per ankstesnius tų rodiklių matavimus (26) (27). Pradėjus nujunkymą (21 PND) bandymams neatrinktus jauniklius galima humaniškai numarinti. Visus jauniklių suskirstymo pakeitimus reikėtų nurodyti. Statistinis mato vienetas turėtų būti vada (arba motininė patelė), ne jauniklis.

15. Tyrimams iki ir po nujunkymo, kognityviniams bandymams, patologiniams tyrimams ir t. t. jauniklius galima suskirstyti įvairiais būdais (1 pvz., parodyta bendra struktūra, 1 priedėlyje pateikti paskirstymo pavyzdžiai). Rekomenduojamas minimalus gyvūnų skaičius kiekvienos dozės grupėje atliekant tyrimus iki ir po nujunkymo yra toks:

Klinikiniai stebėjimai ir kūno masė	Visi gyvūnai
Išsamūs klinikiniai stebėjimai	Po 20 kiekvienos lyties (po 1 kiekvienos lyties iš vados)
Galvos smegenų masė (po fiksavimo) 11–22 PND	Po 10 kiekvienos lyties (po 1 iš vados)
Galvos smegenų (nefiksuotų) masė ~70 PND	Po 10 kiekvienos lyties (po 1 iš vados)
Neuropatologija (panardinimas arba perfuzinė fiksacija) 11–22 PND	Po 10 kiekvienos lyties (po 1 iš vados)
Neuropatologija (perfuzinė fiksacija) ~70 PND	Po 10 kiekvienos lyties (po 1 iš vados)
Lytinis subrendimas	Po 20 kiekvienos lyties (po 1 kiek vienos lyties iš vados)
Kiti vystymosi parametrai (pasirinktinai)	Visi gyvūnai
Elgsenos ontogenezė	Po 20 vienos lyties (po 1 kiekvienos lyties iš vados)
Motorinis aktyvumas	Po 20 vienos lyties (po 1 kiekvienos lyties iš vados)
Motorinė ir jutiminė funkcijos	Po 20 vienos lyties (po 1 kiekvienos lyties iš vados)
Mokymasis ir atmintis	Po 10 kiekvienos lyties ([a]) (po 1 iš vados)

([a]) Pagal tai, kokio jautrumo kognityvinės funkcijos bandymas yra atliekamas, reikėtų apsvarstyti galimybę tirti didesnio gyvūnų skaičiaus grupę, pvz., po vieną vyriškos ir moteriškos lyties gyvūną iš kiekvienos vados (gyvūnų suskirstymas parodytas 1 priedėlyje) (daugiau informacijos apie imties dydį pateikta EBPO Rekomendaciniame dokumente Nr. 43 (8)).

▼M5

Dozavimas

16. Turėtų būti naudojamos mažiausiai trijų dydžių dozės ir lygiagrečiai naudojama viena kontrolinė grupė. Dozės turėtų būti išskirstomos intervalais taip, kad toksinis poveikis būtų laipsniškas. Jei nėra apribojimų dėl fizikinio ir cheminio cheminės medžiagos pobūdžio arba biologinių jos savybių, turi būti pasirenkama tokia didžiausia dozė, kuri sukeltų tam tikrą toksinį poveikį motininei patelei (pvz., klinikinius požymius, kūno masės augimo sumažėjimą (ne daugiau kaip 10 %) ir (arba) būtų gauta duomenų apie dozės apribojimus dėl jos toksiškumo tiksliniam organui). Didelės dozės riba pagal kūno masę gali būti 1000 mg vienam kūno masės kg per dieną su tam tikromis išimtimis. Pavyzdžiui, jei numatomas žmonių sąlytis su bandomąja chemine medžiaga, gali paaiškėti, kad reikia naudoti didesnio dydžio dozę. Taip pat reikėtų atlikti parengtinius tyrimus arba preliminarius dozės dydžio intervalo nustatymo tyrimus ir jais nustatyti, iki kokio dydžio dozė motininei patelei yra minimaliai toksiška. Jeigu atlikus standartinį toksiškumo vystymuisi tyrimą arba parengtinį tyrimą yra nustatoma, kad bandomoji cheminė medžiaga yra toksiška vystymuisi, didžiausia dozė turėtų būti maksimali dozė, kuri nesukelia pernelyg didelio toksinio poveikio palikuonims, mirties *in utero* ir ką tik gimusių jauniklių mirties arba išsigimimų, pakankamų, kad kliudytų atlikti prasmingą toksinio poveikio nervų sistemai vertinimą. Reikėtų stengtis, kad mažiausia dozė būtų tokia, kuri nesukeltų jokių toksinio poveikio motininei patelei arba vystymuisi, įskaitant nervų sistemos, požymių. Kitus dozės dydžius reikėtų pasirinkti mažėjančia tvarka taip, kad būtų pastebėtas kiekvienas su doze susijęs atsakas ir būtų nustatyta nepastebėto neigiamo poveikio riba (NOAEL) arba aptikimo ribai artimas dozės dydis, kad pagal tai būtų galima nustatyti etaloninę dozę. Nustatant dozės dydį mažėjančia tvarka, intervalas, kai dozės dydis skiriasi 2–4 kartus, dažnai būna optimalus; vietoj didelių intervalų tarp dozių (pvz., kai jų dydis skiriasi daugiau kaip 10 kartų) dažnai geriau naudoti papildomą ketvirtą bandomąją grupę.

17. Dozės dydžiai turėtų būti pasirenkami atsižvelgiant į visus turimus toksiškumo duomenis ir į papildomą informaciją apie bandomosios cheminės medžiagos arba gimininguų medžiagų metabolizmo ir toksikokinetines savybes. Ši informacija taip pat gali padėti pagrįsti dozavimo režimo tinkamumą. Galimybę dozes jaunikliams duoti tiesiogiai reikėtų svarstyti atsižvelgiant į sąlyčio su bandomąja chemine medžiaga ir farmakokinetinę informaciją (28) (29). Prieš pradedant tyrimus, per kuriuos dozės būtų duodamos tiesiogiai, reikėtų atidžiai įvertinti naudą ir trūkumus (30).

18. Lygiagrečiai tiriama kontrolinė grupė turėtų būti medžiagos negaunanti kontrolinė grupė arba nešiklį gaunanti kontrolinė grupė, jei bandomajai cheminei medžiagai duoti naudojamas nešiklis. Visiems gyvūnams paprastai turėtų būti duodamas vienodas, matuojant pagal kūno masę, cheminės medžiagos arba nešiklio tūris. Jei dozių ruošimui palengvinti naudojamas nešiklis arba kitas priedas, reikėtų atsižvelgti į tokias jo charakteristikas: poveikį bandomosios cheminės medžiagos absorbcijai, pasiskirstymui, metabolizmui ar sulaikymui; poveikį bandomosios cheminės medžiagos cheminėms savybėms, dėl kurio gali pasikeisti jos toksiškumas; poveikį pašaro ar vandens suvartojimui arba gyvūnų įmitimui. Nešiklis neturėtų kelti poveikio, kuris trukdytų aiškinti tyrimo rezultatus, neurobihevioristiniu požiūriu jis taip pat neturėtų būti toksiškas ir neturėtų veikti dauginimosi ar vystymosi. Jei nešiklis yra naujas, turėtų būti naudojama ne tik nešiklį gaunanti kontrolinė grupė, bet ir nieko negaunanti kontrolinė grupė. Su kontrolinės (-ių) grupės (-ių) gyvūnais reikia elgtis lygiai taip pat, kaip ir su bandymo grupės gyvūnais.

▼M5

Dozių davimas

19. Bandomoji cheminė medžiaga arba nešiklis turėtų būti duodamas tokiu būdu, kuris yra artimiausias galimo žmogaus sąlyčio su ta medžiaga būdui, remiantis turima metabolizmo ir pasiskirstymo bandomųjų gyvūnų organizme informacija. Dažniausiai duodama per virškinamąjį traktą (pvz., per zondą, kartu su pašaru, geriamuoju vandeniu), bet kiti būdai (pvz., per odą, kvėpavimo takus) taip pat gali būti taikomi atsižvelgiant į tai, kokie yra žmogaus sąlyčio su ta medžiaga ypatumai, tikėtinas arba žinomas būdas (išsamesni paaiškinimai pateikti Rekomendaciniame dokumente Nr. 43(8)). Pasirinktą davimo būdą reikėtų pagrįsti. Bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti duodama kiekvieną dieną maždaug tuo pačiu laiku.

20. Dozė kiekvienam gyvūnui paprastai turėtų būti nustatoma atsižvelgiant į patį paskutinį jo svėrimą. Tačiau reguliuojant dozės dydį paskutinį gestacijos trimestrą reikia imtis atsargumo priemonių. Jei pastebima, kad toksinis poveikis motininėms patelėms yra per didelis, jos turėtų būti humaniškai numarinamos.

21. Bandomoji cheminė medžiaga arba nešiklis suporuotoms patelėms turėtų būti duodamas ne rečiau kaip kartą per dieną nuo implantacijos dienos (6 GD) iki laktacijos laikotarpio pabaigos (21 PND), kad jaunikliai būtų bandomosios cheminės medžiagos veikiami prenatalinio ir postnatalinio nervų sistemos vystymosi laikotarpiais. Amžius, nuo kurio pradedama duoti dozes, ir dozių davimo trukmė bei dažnumas gali būti koreguojami, jeigu pagal turimus duomenis tokia bandymo struktūra yra artimesnė žmogaus patiriamam poveikiui. Dozių davimo kitų rūšių gyvūnams trukmę reikėtų pakoreguoti taip, kad būtų užtikrinta, kad gyvūnai gautų bandomosios medžiagos visais ankstyvaisiais smegenų vystymosi etapais (t. y. prenatalinį ir ankstyvąjį postnatalinį žmogaus galvos smegenų augimą atitinkančiais laikotarpiais). Dozes galima pradėti duoti nuo gestacijos pradžios (0 GD), tačiau reikėtų atsižvelgti į tai, kad bandomoji cheminė medžiaga gali sukelti priešimplantacinius nuostolius. Jei dozes būtų pradedama duoti 6 GD, šios rizikos būtų išvengiama, bet tada vystymosi etapais nuo 0 iki 6 GD bandymas nevyktų. Jeigu laboratorija įsigyja jau suporuotus gyvūnus, dozes duoti nuo 0 GD yra neįmanoma, taigi 6 GD būtų tinkama pradinė diena. Bandymų laboratorija turėtų nustatyti dozavimo režimą, remdamasi atitinkama informacija apie bandomosios cheminės medžiagos poveikį, ankstesnę patirtį ir logistikos aspektus; be kitų dalykų ji gali pratęsti dozių davimą ir po nujunkymo. Jauniklių atsivedimo dieną gyvūnams dozių reikėtų neduoti, jei jie atsivedė dar ne visus palikuonis. Dažniausiai daroma prielaida, kad jaunikliai bus veikiami per motinos pieną; tačiau, kai neturima pakankamai įrodymų, kad jaunikliai bus veikiami nepertraukiamai, reikėtų svarstyti galimybę dozes duoti jaunikliams tiesiogiai. Nepertraukiamo veikimo įrodymų galima gauti, pvz., iš farmakokinetinės informacijos, toksiškumo palikuonims arba biologinių žymeklių pokyčių (28).

STEBĖJIMAI

Motininių patelių stebėjimas

22. Visas motinines pateles reikėtų bent kartą per dieną apžiūrėti jų sveikatos būklei nustatyti ir patikrinti, ar jos negaišta ir ar nenugaišo.

23. Dozių davimo ir stebėjimo laikotarpiais periodiškai (bent kartą, kai dozės duodamos gestaciniu laikotarpiu, ir dukart, kai dozės duodamos laktaciniu laikotarpiu) reikėtų atlikti išsamesnius klinikinius stebėjimus, stebint bent po dešimt motininių patelių kiekvienu dozės lygmeniu. Gyvūnai turėtų būti stebimi ne narvelyje, kuriame yra laikomi, stebėjimus turi atlikti parengti techniniai darbuotojai, nežinantys apie gyvūnams duodamas dozes, naudodami standartizuotas procedūras, padedančias sumažinti stresą gyvūnams ir stebėtojo šališkumą ir kuo labiau padidinti skirtingų stebėtojų gautų rezultatų patikimumą. Jeigu įmanoma, būtų gerai, jei stebėjimus per vieną tyrimą atliktų tas pats techninis darbuotojas.

▼M5

24. Pastebėjus požymių, juos reikėtų užrašyti. Jeigu įmanoma, taip pat reikėtų užrašyti stebimų požymių stiprumą. Klinikiniai stebėjimai turėtų apimti odos, kailio, akių, gleivinių, sekrecijų dažnį ir autonominį aktyvumą (pvz., ašarojimą, plaukų pašiaušimą, vyzdžių dydį, neįprastą kvėpavimą ir (arba) kvėpavimą per burną, visus neįprastus šlapinimosi arba tuštinimosi požymius), tačiau neapsiriboti vien tuo.

25. Taip pat turėtų būti pažymėta bet kokia neįprasta reakcija, susijusi su kūno padėtimi, aktyvumo lygiu (pvz., naudojimosi tipiniu plotu sumažėjimas arba padidėjimas) ir judesių koordinacija. Turėtų būti užrašomi eisenos (pvz., krypuojanti eisena, ataksija), laikysenos (pvz., kuprojimasis), reakcijos į elgesį su gyvūnu, vietą arba kitus aplinkos dirgiklius pakitimai, taip pat kloninių arba toninių judesių, traukulių arba drebulio buvimas, stereotipinis elgesys (pvz., besaikis valymasis, neįprasti galvos judesiai, nuolatinis sukimasis ratu), keistas elgesys (pvz., kandžiojimasis arba per didelis laižymasis, žalojimasis, vaikščiojimas atbulomis, vokalizacija) arba agresija.

26. Toksinio poveikio požymius, įskaitant jų atsiradimo pradžią, paros metą, laipsnį ir trukmę, reikėtų užrašyti.

27. Gyvūnus reikėtų sverti, kai jiems duodamos dozės, per visą tyrimą: bent kartą per savaitę, jauniklių atsivedimo arba artimą jam dieną ir 21 PND (nujunkymo dieną). Jeigu tyrime naudojamas zondas, motininės patelės turėtų būti sveriamos bent dukart per savaitę. Prireikus po kiekvieno kūno masės matavimo dozes reikėtų koreguoti. Pašaro suvartojimą gestacijos ir laktacijos laikotarpiais reikėtų matuoti bent kartą per savaitę. Vandens suvartojimą reikėtų matuoti bent kartą per savaitę, jeigu gyvūnas yra veikiamas per vandenį.

Palikuonių stebėjimas

28. Visus palikuonis reikėtų bent kartą per dieną atidžiai apžiūrėti, ar nepasireiškia toksinio poveikio požymiai, ar jie negaišta ir ar nenugaišo.

29. Dozių davimo ir stebėjimo laikotarpiais reikėtų atlikti išsamesnius palikuonių klinikinius tyrimus. Palikuonius (bent po vieną kiekvienos lyties jauniklį iš vados) turėtų stebėti parengti techniniai darbuotojai, nežinantys apie gyvūnams duodamas dozes, naudodami standartizuotas procedūras, padedančias sumažinti šališkumą ir kuo labiau padidinti skirtingų stebėtojų gautų rezultatų patikimumą. Jeigu įmanoma, būtų gerai, jei stebėjimus atliktų tas pats techninis darbuotojas. Reikėtų stebėti bent 24 ir 25 punktuose aptartas stebimu vystymosi laikotarpiu aktualias vertinamąsias baigtis.

30. Visus toksinio poveikio palikuonims požymius, įskaitant jų atsiradimo pradžią, paros metą, laipsnį ir trukmę, reikėtų užrašyti.

Fiziniai ir vystymosi parametrai

31. Vystymosi parametrų iki nujunkymo pokyčiai (pvz., ausies kaušelio išsilyginimas, akių atsivėrimas, kandžių prasikalimas) yra glaudžiai susiję su kūno mase (30) (31). Kūno masė gali būti geriausias fizinio vystymosi rodiklis. Todėl atlikti vystymosi parametrų matavimus yra rekomenduojama tik tada, kai turima įrodymų, kad iš šių vertinamųjų baigčių bus gauta papildomos informacijos. Šių parametrų vertinimo laikas nurodytas 1 lentelėje. Pagal tai, kokio poveikio tikimasi, ir tai, kokie yra pradiniai matavimo rezultatai, gali būti tikslinga numatyti papildomus laiko momentus arba matavimus atlikti kitais vystymosi etapais.

▼M5

32. Vertinant fizinį vystymąsi, rekomenduotina tyrimą atlikti postkoitaliniu, o ne postnatalinio amžiaus etapu (33). Jeigu bandymai su jaunikliais atliekami nujunkymo dieną, šiuos bandymus rekomenduojama atlikti iki faktinio nujunkymo, kad dėl patiriamo su nujunkymu susijusio streso rezultatai nebūtų iškreipiami. Be to, dvi dienas po nujunkymo nereikėtų atlikti jokių jauniklių bandymų, atliktinų po nujunkymo.

1 lentelė

Fizinių ir vystymosi parametrų bei funkcinių/elgsenos vertinamųjų baigčių vertinimo laikas ([a])

Amžiaus tarpsniai / Vertinamosios baigtys	Iki nujunkymo ([b])	Paaugę jaunikliai ([b])	Jauni suaugę gyvūnai ([b])
Fiziniai ir vystymosi parametrai			
Kūno masė ir kliniki-niai stebėjimai	Kas savaitę ([c])	Ne rečiau kaip kas dvi savaites	Ne rečiau kaip kas dvi savaites
Galvos smegenų masė	22 PND ([d])		Bandymo pabaigoje
Neuropatologija	22 PND ([d])		Bandymo pabaigoje
Lytinis subrendimas	—	Pagal poreikį	—
Kiti vystymosi parametrai ([e])	Pagal poreikį	—	—
Funkcinės/elgsenos vertinamosios baigtys			
Elgsenos ontogenezė	Ne mažiau kaip du matavimai		
Motorinis aktyvumas (įskaitant įpročių formavimąsi)	1–3 kartus ([f])	—	Vieną kartą
Motorinė ir jutiminė funkcijos	—	Vieną kartą	Vieną kartą
Mokymasis ir atmintis	—	Vieną kartą	Vieną kartą

([a]) Šioje lentelėje nurodoma, kiek mažiausiai kartų reikėtų atlikti matavimus. Pagal tai, kokio poveikio tikimasi, ir tai, kokie yra pradiniai matavimo rezultatai, gali būti tikslinga numatyti papildomus laiko momentus (pvz., senesni gyvūnai) arba matavimus atlikti kitais vystymosi etapais.

([b]) Bandymų su jaunikliais rekomenduojama neatlikti dvi dienas po nujunkymo (žr. 32 punktą). Rekomenduojamas bandymų su paaugusiais jaunikliais amžius: mokymasis ir atmintis = 25 ± 2 PND; motorinė ir jutiminė funkcijos = 25 ± 2 PND. Rekomenduojamas bandymų su jaunais suaugusiais gyvūnais amžius yra 60–70 PND.

([c]) Kūno masę reikėtų matuoti bent du kartus per savaitę, kai dozės jaunikliams duodamos tiesiogiai, kad tuo atveju, jeigu kūno masė sparčiai auga, dozes būtų galima pakoreguoti.

([d]) Galvos smegenų masę ir neuropatologiją, jei reikia, galima vertinti kuriuo nors ankstesniu etapu (pvz., 11 PND) (žr. 39 punktą).

([e]) Kiti vystymosi parametrai, ne tik kūno masė (pvz., akių atsivėrimas) taip pat turėtų būti prireikus užrašomi (žr. 31 punktą).

([f]) Žr. 35 punktą.

33. Reikėtų suskaičiuoti gyvus jauniklius ir nustatyti jų lytį, pvz., vizualiai įvertinti arba išmatuoti anogenitalinį atstumą (34) (35), kiekvieną vados jauniklį reikėtų atskirai pasverti vos atsivestą ar netrukus po atsivedimo, bent kartą per savaitę laktacijos laikotarpiu, o vėliau – bent kartą per dvi savaites. Vertinant lytinį subrendimą, reikėtų nustatyti bent vieno kiekvienos vados patinėlio ir vienos patelės amžių ir kūno masę, kada susiformuoja makštis (35) arba atsiskiria apyvarpė (37).

▼M5

Elgsenos ontogenezė

34. Tiriant pasirinktų elgsenos rodiklių ontogenezę, bent po vieną kiekvienos lyties jauniklį iš vados reikėtų vertinti atitinkamu amžiaus laikotarpiu, visas bandymo dienas visiems elgsenos rodikliams vertinti naudojant tuos pačius jauniklius. Matavimo dienos turėtų būti tolygiai paskirstytos per tą laikotarpį; turėtų būti aprašomi įprasti arba su dozės davimu susiję tos elgsenos ontogenezės pokyčiai (38). Štai keletas elgsenos rodiklių, kurių ontogenezę būtų galima vertinti, pavyzdžių: išsitiesimo refleksas, neigiamas geotaksis (angl. negative geotaxis), motorinis aktyvumas (38) (39) (40).

Motorinis aktyvumas

35. Motorinį aktyvumą reikėtų stebėti (41) (42) (43) (44) (45) laikotarpiu iki nujunkymo ir gyvūnui suaugus. Dėl bandymų nujunkymo laikotarpiu žr. 32 punktą. Bandymo sesija turėtų trukti pakankamai ilgai, kad būtų galima matyti, jog dozių negaunantys kontrolinės grupės gyvūnai priprato prie bandymo sesijos sąlygų. Motorinį aktyvumą itin rekomenduojama naudoti elgsenos ontogenezei vertinti. Kai jis naudojamas kaip elgsenos ontogenezės kriterijus, visose bandymo iki nujunkymo sesijose reikėtų naudoti tuos pačius gyvūnus. Bandymas turėtų būti atliekamas pakankamai dažnai, kad būtų galima įvertinti pripratimo prie sesijos sąlygų ontogenezę (44). Tam iki nujunkymo dienos įskaitytinai gali prireikti įvertinti tris arba daugiau laikotarpių (pvz., 13, 17, 21 PND). Bandymus su tais pačiais arba tos pačios vados gyvūnais dar reikėtų atlikti gyvūnams suaugus, artėjant tyrimo pabaigai (pvz., 60–70 PND). Bandymus kitomis dienomis galima atlikti papildomai pagal poreikį. Motoriniam aktyvumui stebėti reikėtų naudoti automatizuotą aktyvumo fiksavimo prietaisą, kuriuo būtų galima nustatyti aktyvumo didėjimą ir mažėjimą (t. y. pradinė prietaisu išmatuoto aktyvumo reikšmė neturėtų būti nei tokia maža, kad nebūtų galima nustatyti jo sumažėjimo, nei tokia didelė, kad nebūtų galima nustatyti aktyvumo padidėjimo). Kiekvieną prietaisą reikėtų patikrinti pagal standartines procedūras, siekiant, kiek įmanoma, užtikrinti patikimą skirtingų prietaisų veikimą visomis dienomis. Prietaisus bandomosioms grupėms reikėtų paskirstyti kuo proporcingiau. Bandymą reikėtų atlikti atskirai su kiekvienu gyvūnu. Bandymų laiką bandomosioms grupėms reikėtų proporcingai paskirstyti, kad būtų išvengta rezultatų iškraipymo dėl cirkadinio aktyvumo ritmo. Reikėtų stengtis užtikrinti, kad bandymo sąlygos kuo mažiau skirtųsi ir nebūtų sistemiškai susietos su dozių davimu. Tarp kintamųjų, kurie gali paveikti daugelį elgsenos matų, įskaitant motorinį aktyvumą, yra: bandymo narvelio triukšmo izoliacija, dydis ir forma, temperatūra, santykinė drėgmė, apšvietimo sąlygos, kvapai, narvelio, kuriame gyvūnas laikomas nuolat, arba naujo bandymų narvelio naudojimas ir aplinkos dirgikliai.

Motorinė ir jutiminė funkcijos

36. Motorinę ir jutiminę funkcijas reikėtų nuodugniai ištirti bent vieną kartą per paaugusio jauniklio amžiaus laikotarpį ir vieną kartą per jauno suaugusio gyvūno amžiaus laikotarpį (pvz., 60–70 PND). Dėl bandymų nujunkymo laikotarpiu žr. 32 punktą. Bandymų reikėtų atlikti pakankamai – tiek, kad būtų gautas reikiamas skaičius kiekybinių jutiminio modalumo (pvz., somatosensorinio, vestibuliarinio) ir motorinių funkcijų (pvz., jėgos, koordinacijos) pavyzdžių. Keletas motorinės ir jutiminės funkcijų pavyzdžių: ekstenzoriaus ištiesimo reakcija (46), išsitiesimo refleksas (47) (48), pripratimas prie garsinio dirgiklio (40) (49) (50) (51) (52) (53) (54), sukeltasis potencialas (55).

▼M5

Mokymosi ir atminties bandymai

37. Asociatyvaus mokymosi ir atminties bandymą reikėtų atlikti po nujunkymo (pvz., 25 ± 2 dieną) ir tam naudoti jaunus suaugusius gyvūnus (60 PND amžiaus ir vyresnius). Dėl bandymų nujunkymo laikotarpiu žr. 32 punktą. Šiais dviem vystymosi etapais galima atlikti tą patį arba kitą (-us) bandymą (-us). Pasirenkant bandymą (-us) nujunkytų ir suaugusių žiurkių mokymuisi ir atminčiai tirti, leidžiamas tam tikras lankstumas. Tačiau bandymas (-ai) turėtų būti parengtas (-i) taip, kad atitiktų du kriterijus. Pirma, mokymasis turėtų būti vertinamas kaip pokytis, kuris įvyksta per keletą kartojamų bandymų arba sesijų arba, kai bandymas yra vienas, kaip būsenos pokytis dėl neasociatyvaus mokymosi patirties poveikio. Antra, per bandymą (-us) reikėtų tirti ne tik pradinį mokymąsi (įgūdžių įgijimą), bet ir tam tikrą atminties matą (trumpalaikę arba ilgalaikę atmintį), tačiau šio atminties mato negalima aprašyti tol, kol per tą patį bandymą nebus įvertintas įgūdžių įgijimas. Jeigu mokymosi ir atminties bandymas (-ai) atskleidžia bandomosios cheminės medžiagos poveikį, galima apsvarstyti galimybę atlikti papildomą (-us) bandymą (-us), kad remiantis jutiminių, motyvacijos ir (arba) motorinių gebėjimų pokyčiais būtų galima atmesti alternatyvius aiškinimus. Mokymosi ir atminties bandymų metodą, be paminėtų dviejų kriterijų, dar rekomenduojama pasirinkti pagal jo jautrumą tiriamosios cheminės medžiagos klasės medžiagoms, jeigu literatūroje esama tokios informacijos. Jeigu tokios informacijos nėra, tai bandymai, kuriuos būtų galima atlikti laikantis nurodytųjų kriterijų, pavyzdžiui, yra šie: pasyvaus vengimo (angl. *passive avoidance*) (43) (56) (57), gebėjimo prisiminti tam tikrą padėtį po pertraukos (angl. *delayed-matching-to-position*), kai tiriamos suaugusios žiurkės (58) ir žiurkių jaunikliai (59), poveikio per uoslę (angl. *olfactory conditioning*) (43) (60), Morris vandens labirinto (angl. *Morris water maze*) (61) (62) (63), Biel arba Sinsinačio labirinto (angl. *Biel or Cincinnati maze*) (64) (65), radialinių atšakų labirinto (angl. *radial arm maze*) (66), T labirinto (angl. *T-maze*) (43), nuo režimo priklausančios elgsenos susiformavimo ir išlikimo (angl. *acquisition and retention of schedule-controlled behaviour*) (26) (67) (68). Literatūroje aptariami ir kiti bandymai, skirti nujunkytoms (26) (27) ir suaugusioms žiurkėms (19) (20).

Nekroskopija

38. Po palikuonių nujunkymo galima atlikti motininių gyvūnų eutanaziją.

39. Neuropatologinis palikuonių vertinimas bus atliekamas naudojant 22 PND arba anksčiau, 11–22 PND, ir tyrimo pabaigoje humaniškai numarintų gyvūnų audinius. Tiriant 22 PND numarintus palikuonis, reikėtų vertinti jų galvos smegenų audinius; tiriant tyrimo pabaigoje numarintus gyvūnus – ir centrinės nervų sistemos (CNS), ir periferinės nervų sistemos (PNS) audinius. 22 PND arba anksčiau numarinti gyvūnai gali būti fiksuojami panardinant į fiksatyvą arba perfuzinės fiksacijos būdu. Tyrimo pabaigoje numarinti gyvūnai turėtų būti fiksuojami perfuzinės fiksacijos būdu. Visi audinių mėginių paruošimo aspektai nuo gyvūnų perfuzijos iki audinių mėginių išpjovimo, audinių paruošimo ir objektinių stiklelių dažymo turėtų būti tarpusavyje taip suderinti, kad kiekvienoje partijoje būtų reprezentatyvių mėginių iš kiekvienos dozės grupės. Išsamesnės neuropatologinių tyrimų gairės išdėstytos EBPO Rekomendaciniame dokumente Nr. 20 (9), taip pat žr. (103).

Audinių mėginių paruošimas

40. Visas pagrindines per nekroskopiją pastebėtas anomalijas reikėtų registruoti. Paimti audinių mėginiai turėtų atspindėti visas pagrindines nervų sistemos sritis. Audinių mėginius reikėtų laikyti tinkamame fiksatyve ir tirti pagal standartizuotus paskelbtus histologinių tyrimų protokolus (69) (70) (71) (103). CNS ir PNS audinius galima įterpti į parafiną, tačiau kai reikalinga didesnė rezoliucija (pvz., tiriant periferinius nervus, kai įtariama periferinė neuropatija ir (arba) kai atliekama morfometrinė periferinių nervų analizė),

▼M5

po fiksavimo gali būti tikslinga naudoti osmį ir įterpti į epoksidinę dervą. Morfometrinei analizei atlikti visais dozės lygmenimis paimti galvos smegenų audiniai turėtų būti įterpti į tinkamą terpę tuo pačiu metu, siekiant išvengti artefaktų susitraukimo dėl pernelyg ilgo laikymo fiksatyve (6).

Neuropatologinis tyrimas

41. Šio kokybinio tyrimo paskirtis:

i) nustatyti nervų sistemos sritis, kuriose yra neuropatologinių pokyčių požymių;

ii) nustatyti neuropatologinių pokyčių, kurie atsirado dėl veikimo bandomąja chemine medžiaga, pobūdį; ir

iii) nustatyti neuropatologinių pokyčių sunkumo intervalą.

Reprezentatyvius histologiniam tyrimui skirtus audinių mėginių mikroskopu turėtų ištirti tinkamai parengtas patologas, kuris nustatytų, ar esama neuropatologinių pokyčių požymių. Visus neuropatologinius pokyčius reikėtų įvertinti subjektyviu balu, žyminčiu pokyčio dydį. 22 PND arba anksčiau humaniškai numarintų gyvūnų galvos smegenų dalims įvertinti gali pakakti hematoksilino ir eozino dažų. Tačiau tyrimo pabaigoje numarintų gyvūnų CNS ir PNS audinių dalims tirti rekomenduojama naudoti mielino dažus (pvz., *luxol fast blue/cresyl violet*) ir sidabravimo dažus (pvz., *Bielschowsky* arba *Bodian*). Remiantis profesionalia patologo nuomone ir pagal tai, kokio pobūdžio pakitimų pastebėta, galima apsvarstyti galimybę naudoti kitus dažus, skirtus konkretiems pakitimams nustatyti ir apibūdinti (pvz., glialinio fibrilinės rūgšties baltymo (GFAP) arba lektino histocheminį dažymą glialiniams ir mikroglialiniams pokyčiams įvertinti (72), *Fluoro-Jade* dažus nekrozei nustatyti (73) (74) arba sidabravimo dažus, skirtus neuronų degeneracijai nustatyti (75)).

42. Reikėtų atlikti morfometrinį (kiekybinį) vertinimą, nes jo duomenys gali padėti nustatyti su dozės davimu susijusį poveikį ir yra vertingi aiškinant su dozės davimu susijusius galvos smegenų masės arba morfologijos skirtumus (76) (77). Kad būtų galima atlikti morfometrinį vertinimą, reikėtų paimti ir paruošti nervų audinio mėginį. Morfometrinį vertinimą gali sudaryti, pvz., konkrečių smegenų sričių tiesiniai arba zoniniai matavimai (78). Tiesiniams arba zoniniams matavimams atlikti reikia naudoti homologiškus kruopščiai pagal patikimus mikroskopinius parametrus pasirinktus pjūvius (6). Stereologiją galima naudoti, kai norima nustatyti su dozės davimu susijusį poveikį tokiems parametrams kaip konkrečių neuroanatominių sričių dydis ar ląstelių skaičius (79) (80) (81) (82) (83) (84).

43. Smegenis reikėtų ištirti, ar nėra su dozės davimu susijusių neuropatologinių pokyčių; norint užtikrinti, kad tyrimas būtų nuodugnus, iš visų svarbiausių smegenų sričių (pvz., uoslės svogūnėlių, smegenų žievės, hipokampo, bazalinių ganglijų, gumburo, pogumburio, vidurinių smegenų (keturkalnio, smegenų dangčio ir smegenų kojyčių), tilto, pailgųjų smegenų, smegenėlių) reikėtų paimti pakankamai mėginių. Svarbu, kad tiriant visus gyvūnus būtų imami tos pačios plokštumos pjūviai. Iš tyrimo pabaigoje humaniškai numarintų gyvūnų reikėtų paimti reprezentatyvius nugaros smegenų ir PNS pavyzdžius. Tarp tiriamų sričių turėtų būti akis su regos nervu ir tinklaine, nugaros smegenys kaklo ir juosmens sustorėjimų vietose, užpakalinės ir priekinės nugaros smegenų šaknelės pluoštai, proksimalinis sėdmens nervas, proksimalinis blauzdikaulio nervas (prie kelio) ir blauzdikaulio nervo šakos į blauzdos raumenį. Nugaros smegenų ir periferinės nervų sistemos pjūviai turėtų būti ir kryžminiai arba skersiniai, ir išilginiai.

▼M5

44. Atliekant neuropatologinį vertinimą reikėtų tirti ne tik ląstelių pokyčius (pvz., neuronų vakuolizaciją, degeneraciją, nekrozę) ir audinių pokyčius (pvz., gliozę, leukocitinę infiltraciją, cistų susiformavimą), bet ir tai, ar nėra nervų sistemos vystymosi pažeidimų požymių (6) (85) (86) (87) (88) (89). Šiuo požiūriu svarbu, kad su dozės davimu susijęs poveikis būtų atskirtas nuo normalaus vystymosi požymių, kurie atsiranda numarinimo laiką atitinkančiame vystymosi etape (90). Reikšmingų pokyčių, rodančių vystymosi sutrikimus, pavyzdžiai (sąrašas nėra baigtinis):

— uoslės svogūnėlių, didžiųjų galvos smegenų arba smegenėlių bendro dydžio arba formos pokyčiai;

— įvairių galvos smegenų sričių (pvz., smegenėlių išorinio užuomazginio sluoksnio, didžiosios smegenų jungties) santykinio dydžio pokyčiai, įskaitant jų sumažėjimą arba padidėjimą dėl ląstelių populiacijų, kurios paprastai būna kintančios, mažėjimo ir ilgesnio nei įprastai gyvavimo, taip pat dėl aksonų projekcijų;

— proliferacijos, migracijos ir diferenciacijos pokyčiai, kuriuos atspindi pernelyg didelės apoptozės arba nekrozės plotai, ektopinių, sutrikdytos orientacijos arba pakitusios sandaros neuronų populiacijų grupės arba išsklaidytos populiacijos, santykinio įvairių žievės sluoksnių struktūrų dydžio pokyčiai;

— mielino kaupimosi pokyčiai, įskaitant bendrą struktūrų, kuriose kaupiasi mielinas, dydžio sumažėjimą arba pokyčius;

— hidrocefalijos požymiai, ypač skilvelių padidėjimas, smegenų vandentiekio stenozė ir smegenų pusrutulių suplonėjimas.

Dozės ir atsako tarpusavio ryšys neuropatologinių pokyčių atveju

45. Kokybinei ir kiekybinei neuropatologinei analizei atlikti rekomenduojama taikyti toliau aptartą nuoseklųjį metodą. Iš pradžių lyginami didelės dozės ir kontrolinės grupės gyvūnų audinių dalys. Jeigu didelės dozės grupės gyvūnams neuropatologinių pakitimų nenustatoma, toliau analizuoti nereikia. Jeigu didelės dozės gyvūnų grupėje nustatomi neuropatologiniai pokyčiai, tada tiriami vidutinės ir mažos dozės grupių gyvūnai. Jeigu didelės dozės grupė nebetiriama dėl nugaišimo arba kito rezultatus iškreipiančio toksiškumo, reikėtų tirti, ar neuropatologinių pokyčių nėra didelės ir vidutinės dozės grupėse. Jeigu mažesnių dozių grupėse pastebima toksinio poveikio nervų sistemai požymių, atliekama šių grupių gyvūnų neuropatologinė analizė. Jeigu atliekant kokybinius arba kiekybinius tyrimus yra nustatomi su dozės davimu susiję neuropatologiniai pokyčiai, reikėtų, remiantis visų dozių grupių gyvūnų vertinimu, nustatyti pažeidimų arba morfometrinių pokyčių pasireiškimo, dažnumo ir laipsnio priklausomybę nuo dozės. Per šį vertinimą reikėtų vertinti visas galvos smegenų sritis, kuriose pastebėta neuropatologinių pokyčių požymių. Apibūdinant kiekvieno pobūdžio pažeidimą reikėtų apibrėžti kriterijus, pagal kuriuos yra nustatomas kiekvienas pažeidimo laipsnis, ir nurodyti požymius, pagal kuriuos kiekvienas laipsnis yra atskiriamas. Kiekvieno pobūdžio pažeidimo dažnumą ir sunkumo laipsnį reikėtų užrašyti, paskui atlikti statistinę analizę ir įvertinti dozės ir atsako tarpusavio ryšio pobūdį. Rekomenduojama naudoti koduotus objektinius stiklelius (91).

DUOMENYS IR ATASKAITA

Duomenys

46. Duomenys pateikiami atskirai ir apibendrinami lentelėse, nurodant kiekvienos bandymo grupės pakitimų pobūdį, motininių patelių skaičių, palikuonių skaičių pagal lytis ir vadas, kuriose atsirado kiekvienos rūšies pakitimų. Jeigu palikuonys buvo tiesiogiai veikiami postnataliniu laikotarpiu, reikėtų nurodyti veikimo būdą, trukmę ir laikotarpį.

▼M5

Rezultatų įvertinimas ir aiškinimas

47. Neurotoksiškumo vystymuisi tyrimas suteiks informacijos apie kartotinio sąlyčio su chemine medžiaga poveikį *in utero* ir ankstyvuoju postnatalinio vystymosi laikotarpiu. Kadangi akcentuojamos ir bendrojo toksiškumo, ir toksiškumo vystymuisi vertinamosios baigtys, tyrimo rezultatai leis atskirti poveikį nervų sistemos vystymuisi, kai nėra bendrojo motininės patelės toksiškumo, ir poveikį, kuris sukeliamas tik esant koncentracijai, kuri toksiška ir motininiam gyvūnui (27). Kadangi tyrimo struktūra, statistinė analizė ir biologinis duomenų reikšmingumas yra susiję sudėtingais ryšiais, norint tinkamai interpretuoti neurotoksiškumo vystymuisi duomenis, reikės remtis ekspertų vertinimu (107) (109). Bandymo rezultatams aiškinti reikėtų taikyti įrodomosios vertės analizę (20) (92) (93) (94). Reikėtų aptarti elgsenos arba morfologinių duomenų, jei tokių gauta, modelius, taip pat duomenis apie dozės ir atsako ryšį. Į šį apibūdinimą reikėtų įtraukti duomenis visų tų tyrimų, kurie būtų svarbūs vertinant neurotoksiškumą vystymuisi, įskaitant žmonių epidemiologinius tyrimus arba konkrečių atvejų ataskaitas, tyrimus su bandomaisiais gyvūnais (pvz., toksikokinetinius duomenis, informaciją apie struktūrą ir aktyvumą, kitų toksiškumo tyrimų duomenis). Taip pat reikėtų įtraukti duomenis apie bandomosios cheminės medžiagos dozės ir neurotoksiškumo kiekvienos lyties gyvūnams tarpusavio ryšio buvimą arba nebuvimą, dažnumą ir mastą (20) (95).

48. Vertinant duomenis reikėtų aptarti ir biologinį, ir statistinį reikšmingumą. Į statistinę analizę reikėtų žvelgti kaip į priemonę, kuri duomenis padeda aiškinti, o ne nulemia jų aiškinimą. Tai, kad statistinio reikšmingumo nepakanka, negali būti vienintelis kriterijus padaryti išvadai, kad su dozių davimu susijusio poveikio nėra, kaip ir statistinio reikšmingumo buvimas neturėtų būti vienintelis kriterijus padaryti išvadai, kad su dozių davimu susijusio poveikio esama. Siekiant išvengti galimų klaidingų neigiamų išvadų ir sunkumų, kurių kyla, kai reikia įrodyti nesamą dalyką, reikėtų aptarti turimus teigiamus ir ankstesnius kontrolinius duomenis, ypač tais atvejais, kai su dozių davimu susijusio poveikio nėra (102) (106). Klaidingų teigiamų duomenų tikimybę reikėtų aptarti atsižvelgiant į bendrą statistinį duomenų įvertinimą (96). Be kitų dalykų, taip pat reikėtų įvertinti neuropatologinių ir elgsenos pakitimų tarpusavio ryšį, jei jis pastebėtas.

49. Visus rezultatus reikėtų analizuoti naudojant pagal bandymo struktūrą tinkamus statistinius modelius (108). Parametrinės arba neparametrinės analizės metodus reikėtų rinktis atsižvelgiant į tokius veiksnius kaip duomenų pobūdis (transformuoti ar ne), jų pasiskirstymas, santykinis pasirinktos statistinės analizės patikimumas. Statistinę analizę reikėtų pasirinkti pagal tyrimo tikslą ir struktūrą, siekiant minimizuoti I tipo (klaidingi teigiami rezultatai) ir II tipo (klaidingi neigiami rezultatai) klaidų kiekį (96) (97) (104) (105). Kai vystymosi tyrimams yra naudojamos po keletą palikuonių vienu metu atsivedančių gyvūnų rūšys ir tiriama po keletą vienos vados jauniklių, į statistinį modelį reikėtų įtraukti ir vadą ir taip apsisaugoti nuo pernelyg didelių I tipo klaidų (98) (99) (100) (101). Statistinis mato vienetas turėtų būti vada, ne jauniklis. Bandymus reikėtų suplanuoti taip, kad tos pačios vados gyvūnai nebūtų laikomi nepriklausomais stebėjimo objektais. Visos pakartotinai vertinamos to paties subjekto vertinamosios baigtys turėtų būti analizuojamos taikant tokius statistinius modelius, kuriuose atsižvelgiama į tai, kad šie matai nėra savarankiški.

Bandymo ataskaita

50. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— fizikinė būsena ir, jei reikia, fizikinės ir cheminės savybės;

— tapatumo duomenys, įskaitant šaltinį;

▼M5

— preparato grynumas ir žinomos ir (arba) numanomos priemaišos.

Nešiklis (jei naudojamas):

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei tai ne vanduo ir ne fiziologinis tirpalas.

Bandomieji gyvūnai:

— naudojamos rūšys ir veislės ir pagrindimas, jei pasirinktos ne žiurkės;

— bandomųjų gyvūnų tiekėjas;

— gyvūnų skaičius, amžius bandymo pradžioje ir lytis;

— šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras, vanduo ir t. t.;

— kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje.

Bandymo sąlygos:

— pagrindinė priežastis, nulėmusi dozės dydžio pasirinkimą;

— pagrindinė priežastis, nulėmusi dozės davimo būdo ir laikotarpio pasirinkimą;

— duodamos dozės specifikacija, įskaitant išsamią informaciją apie nešiklį, duodamos medžiagos tūrį ir fizikinį pavidalą;

— duomenys apie bandomosios cheminės medžiagos preparato ruošimą ir (arba) jos dėjimą į pašarą, gautą preparato koncentraciją, stabilumą ir vienalytiškumą;

— metodas, taikytas motininėms patelėms ir jaunikliams paženklinti unikalia žyma;

— atsitiktinės atrankos, taikytos motininėms patelėms suskirstyti į dozes gaunančias grupes, jaunikliams brokuoti ir suskirstyti į bandymo grupes, išsamus aprašas;

— informacija apie bandomosios cheminės medžiagos davimo būdą;

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos pašaruose, geriamajame vandenyje arba įkvepiamos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos (ppm) perskaičiavimas į tikrąją dozę (mg/kg kūno masės per parą), jei reikia;

— aplinkos sąlygos;

— duomenys apie pašaro ir vandens (pvz., vandentiekio, distiliuotas) kokybę;

— tyrimo pradžios ir pabaigos datos.

Stebėjimo ir bandymo procedūros:

— išsamus stebėjimų ir procedūrų standartizavimo aprašas ir naudotos apibrėžtys stebėjimų rezultatams įvertinti balais;

— taikytų bandymo procedūrų sąrašas ir jų taikymo pagrindimas;

— duomenys apie taikytas elgsenos/funkcinių, patologinių, neurocheminių arba elektropsichologinių bandymų procedūras, taip pat informacija ir išsamūs duomenys apie automatizuotus prietaisus;

— prietaisų kalibravimo procedūros ir procedūros, skirtos užtikrinti, kad prietaisų parodymai būtų lygiaverčiai ir kad bandymai su dozes gaunančiomis grupėmis būtų atliekami proporcingai;

— glaustas pagrindimas paaiškinant sprendimus, kuriuos priimant remtasi profesionaliu vertinimu.

▼**M5**

Rezultatai (pavieniai ir suvestiniai, jei reikia, nurodant vidurkį ir dispersiją):

— gyvūnų skaičius tyrimo pradžioje ir tyrimo pabaigoje;

— gyvūnų ir vadų skaičius, naudotas bandymui pagal kiekvieną metodą;

— kiekvieno gyvūno ir vados, iš kurios jis kilęs, identifikavimo numeris;

— vados dydis ir vidutinė atsivestų jauniklių masė pagal lytį;

— kūno masė ir duomenys apie kūno masės pokyčius, įskaitant motininių patelių ir jauniklių kūno masę numarinimo etapu;

— duomenys apie pašaro ir vandens, jei reikia (pvz., jeigu bandomoji cheminė medžiaga yra duodama su vandeniu), suvartojimą;

— duomenys apie toksinį atsaką pagal lytį ir dozės dydį, taip pat apie toksiškumo požymius arba nugaišusius gyvūnus, įskaitant, jei reikia, nugaišimo laiką ir priežastį;

— išsamių pastebėtų klinikinių požymių tipas, sunkumas, trukmė, pradžios data, paros laikas, tolesnė eiga;

— kiekvieno vystymosi parametro (masės, lytinio subrendimo ir elgsenos ontogenezės) balas kiekvienu stebėjimo momentu;

— išsamus nustatytų elgsenos, funkcinių, neuropatologinių, neurocheminių, elektropsichologinių požymių aprašas pagal lytį, įskaitant padidėjimą ir sumažėjimą dėl kontrolės;

— nekroskopijos duomenys;

— smegenų masė;

— visos diagnozės pagal neurologinius požymius ir pažeidimus, įskaitant natūraliai atsirandančias ligas arba būsenas;

— požymių pavyzdžių nuotraukos;

— mažo padidinimo mikroskopinės nuotraukos morfometrijai naudotų pjūvių homologijai įvertinti;

— absorbcijos ir metabolizmo duomenys, taip pat papildomi duomenys iš atskirų toksikokinetinių tyrimų, jei turimi;

— statistinis rezultatų apdorojimas, įskaitant duomenims ir rezultatams, nepaisant to, ar jie buvo reikšmingi, ar ne, analizuoti taikytus statistinius modelius;

— tyrimo grupės narių sąrašas, įskaitant profesinį parengimą.

Rezultatų aptarimas:

— informacija apie dozės ir atsako santykį pagal lytį ir grupę;

— tai, kiek visas kitas toksinis poveikis turėjo įtakos išvadai dėl bandomosios cheminės medžiagos galimo neurotoksiškumo, pagal lytį ir grupę;

— tai, kiek toksikokinetiniai duomenys turėjo įtakos išvadai;

— panašumas į kitų žinomų neurotoksiškų medžiagų poveikį;

▼M5

— duomenys, kuriais pagrindžiamas bandymų metodo patikimumas ir jautrumas (t. y. teigiami ir ankstesni kontroliniai duomenys);

— neuropatologinio ir funkcinio poveikio ryšys, jei yra;

— NOAEL arba etaloninė dozė motininėms patelėms ir jaunikliams pagal lytį ir grupę.

Išvados:

— bendras duomenų aiškinimas remiantis rezultatais, įskaitant išvadą, ar bandomoji cheminė medžiaga sukėlė neurotoksinį poveikį vystymuisi, ir NOAEL.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

(1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Denmark, 13–14 June 1995.

(2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98–239. Paskelbta: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].

(3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Paskelbta: [http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479].

(4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. Environ. Health Perspect., 109:79–91.

(5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Environ. Health Perspect., 109:101–111.

(6) Garman, R.H., Fix,A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. Environ. Health Perspect., 109:93–100.

(7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23–25 October 2000.

(8) OECD (2008). OECD Environment, Health and SAFEty Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. July 2008. Paskelbta: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage = en].

(9) OECD (2003). OECD Environment, Health and SAFEty Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Paskelbta: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].

(10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol., 12: 173–292.

(11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition,* ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

▼M5

(12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 8:188–197.

(13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, *1st Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

(14) Šio priedo B.34 skyrius „Toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymas“.

(15) Šio priedo B.35 skyrius „Toksiškumo dviejų kartų dauginimuisi bandymas“.

(16) Šio priedo B.43 skyrius „Neurotoksiškumo graužikams bandymas“.

(17) Šio priedo B.31 skyrius „Toksiškumo prenataliniam vystymuisi bandymas“.

(18) 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos. OL L 276, 2010 10 20, p. 33.

(19) WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Paskelbta: [http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm].

(20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches,* (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Paskelbta: [http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm].

(21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods*, *1st Edition*, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.

(22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. Neurotoxicol. Teratol., 19:499–509.

(23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. Fundam. Appl. Toxicol., 38:2–6.

(24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. Lab. Animal Sci., 27:110–112.

(25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. Fundam. Appl. Toxicol., 13:118–136.

(26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.

(27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective.* Academic Press, Orlando.

(28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.

(29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. Int. J. Toxicol., 24:87–94.

(30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. Toxicol. Sci., 49: 1–4.

(31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Phamaceuticals for Human Use.

(32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. J. Am. Coll. Toxicol., 6:433–439.

▼**M5**

(33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. Neurotoxicol. Teratol., 20:449–457.

(34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. Reprod. Toxicol., 13:383–390.

(35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. Toxicol. Sci., 58:350–365.

(36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:579–586.

(37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol. Reprod., 17:298–303.

(38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. Neurotoxicol. Teratol., 12:489–95.

(39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim. Behav., 23:896–920.

(40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: *Handbook of Behavioral Teratology.* Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, pp. 67–100.

(41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. Neurobehav. Toxicol., 1:53–66.

(42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) 'Plenum Press', New York, pp. 37–82.

(43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3′-iminodipropionitrile in the rat. Neurotoxicol. Teratol., 15:117–129.

(44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. Dev. Psychobiol., 18:247–260.

(45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13:599–609.

(46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 19:1997. 405–411.

(47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals.Physiol. Behav., 64:661–669.

(48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 40:589–591.

(49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), 'Plenum Press', New York, pp. 287–351.

(50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. Prog. Neurobiol., 59:107–128.

(51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). 'Raven Press', New York, pp. 181–211.

▼**M5**

(52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. J. Am. Coll. Toxicol., 8:199–211.

(53) Crofton, K.M., Lassiter, T.L., Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. Hear. Res.,80:25–30.

(54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 6:437–445.

(55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), 'Raven Press', New York. pp. 125–145.

(56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3′-iminopropionitrile. Toxicol. Appl. Pharmacol., 105:321–332.

(57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. Neurosci. Behav. Rev., 6:247–296.

(58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 10:237–244.

(59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. Behav. Neurosci., 103:98–105.

(60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. Develop. Psychobiol., 17:465–479.

(61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods, 11:47–60.

(62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. Int. J. Neurosci., 48:29–69.

(63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res. Rev, 36:60–90.

(64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. Neurotoxicol. Teratol., 9:235–241.

(65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. Drug Chem. Toxicol., 20:387–399.

(66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. Neurotoxicol. Teratol., 10:327–332.

(67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. Toxicol. Appl. Pharmacol., 71:342–352.

(68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. *J. Gerontol.,* 36:338–341.

(69) Fix, A.S., Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. Toxicol. Pathol., 28: 122–131.

(70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, pp. 84–107.

(71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, 'Churchill Livingstone', London.

▼**M5**

(72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. Toxicol. Pathol., 24: 291–304.

(73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. Brain Res., 874:123–130.

(74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. Exp. Toxic. Pathol., 53:365–372.

(75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. Neurotoxicol. Teratol., 16, 545–561.

(76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. Environ. Toxicol. Pharmacol., 19:745–755.

(77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. Reprod. Toxicol., 20:417–432.

(78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. Neurobehav. *Toxicol.*, 1:129–135.

(79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.

(80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 57: 305–310.

(81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. Brain Res., 609: 262–268.

(82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. J. Neurocytol., 26:707–710.

(83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. Trends Neurosci., 22:51–61.

(84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience, 130: 813–831.

(85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). Teratology, 49:113–121.

(86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. Develop. Brain Res., 84:294–298.

(87) Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, pp. 3–41.

(88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. „Science“, 283:70–74.

▼M5

(89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. 'Science', 287:1056–1060.

(90) Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. 'Springer-Verlag', Berlin.

(91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. Toxicol. Let., 63:127–133.

(92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. Environ. Health Perspect., 104:401–405.

(93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644A.

(94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274–56322.

(95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology*. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.

(96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. Neurotoxicology, 5:113–126.

(97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. J. Am. Coll. Toxicol., 8:21–27.

(98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. Dev. Psychobiol., 6:329–335.

(99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. Teratology, 12:165–172.

(100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. Neurotoxicol. Teratol., 14: 221–228.

(101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:587–90.

(102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. Neurotoxicol. Teratol., 26:345–352.

(103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing – for today. Toxicol. Pathol. 34:296–313.

(104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. Neurotoxicol. Teratol., 14(3):205–210.

(105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. Biometrics, 41:295–301.

(106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):266–287.

(107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology, 30(4):288–325*.

▼**M5**

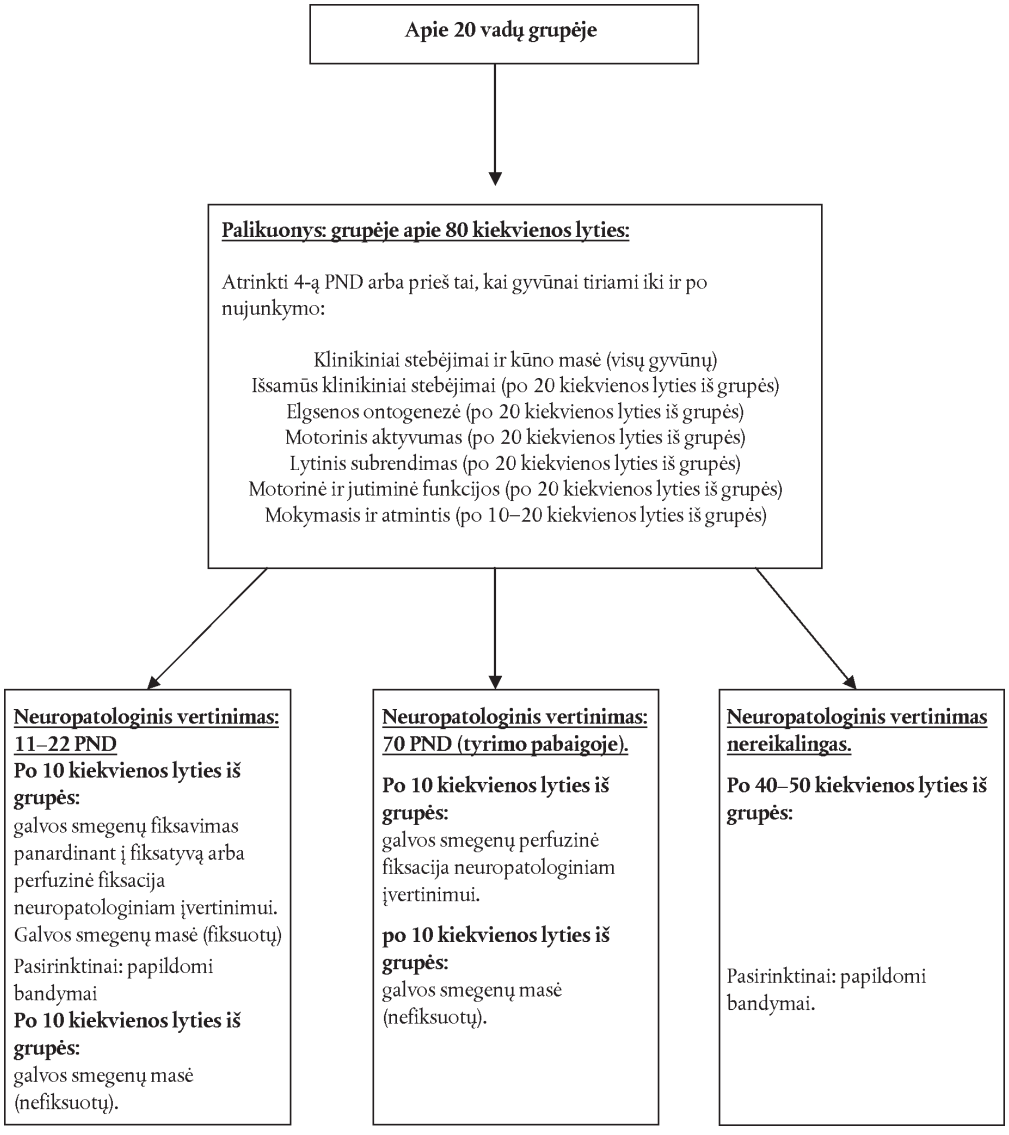
(108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):326–348.

(109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):349–381.

▼M5

1 pvz.

Bendra funkcinių ir (arba) elgsenos bandymų, neuropatologinio vertinimo ir galvos smegenų masės tyrimo schema. Ši diagrama parengta pagal 13–15 punktuose pateiktą aprašą (PND = postnatalinė diena). Gyvūnų suskirstymo pavyzdžiai pateikti 1 priedėlyje.



▼M5

1 priedėlis

1. Galimo suskirstymo pavyzdžiai aptarti ir išdėstyti lentelėje toliau. Šie pavyzdžiai pateikti norint parodyti, kad tiriamuosius gyvūnus pagal įvairias bandymų paradigmas galima suskirstyti įvairiais būdais.

1 pavyzdys

2. Elgsenos ontogenezės bandymams iki nujunkymo naudojama viena grupė, kurią sudaro po 20 kiekvienos lyties jauniklių (po 1 patiną ir 1 patelę iš vados) vienam dozės lygmeniui. Iš šių gyvūnų po 10 kiekvienos lyties ir dozės lygmens jauniklių (t. y. po 1 patinėlį arba 1 patelę iš vados) yra humaniškai numarinami 22 PND. Galvos smegenys išimamos, pasveriamos ir parengiamos histopatologiniam vertinimui. Galvos smegenų masės duomenys taip pat yra renkami naudojant likusių to paties dozės lygmens 10 patinėlių ir 10 patelių nefiksuotas galvos smegenis.

3. Kita grupė, kurią sudaro po 20 kiekvienos lyties jauniklių (po 1 patinėlį ir 1 patelę iš vados) vienam dozės lygmeniui, yra naudojama funkciniams ir (arba) elgsenos bandymams po nujunkymo (atliekami išsamūs klinikiniai stebėjimai, vertinamas motorinis aktyvumas, paaugusių jauniklių reakcija į garsinius dirgiklius ir atliekamas kognityvinės funkcijos bandymas). Iš šių gyvūnų po 10 kiekvienos lyties ir dozės lygmens jauniklių (t. y. po 1 patinėlį arba 1 patelę iš vados) tyrimo pabaigoje (apie 70 PND) duodama anestetiko, jie fiksuojami perfuzijos būdu. Po papildomo fiksavimo *in situ* galvos smegenys išimamos ir parengiamos neuropatologiniam vertinimui.

4. Jaunų suaugusių gyvūnų (pvz., 60–70 PND amžiaus) kognityvinės funkcijos bandymams naudojama trečia grupė, kurią sudaro po 20 kiekvienos lyties jauniklių (t. y. po 1 patinėlį ir 1 patelę iš vados) vienam dozės lygmeniui. Iš šių gyvūnų po 10 kiekvienos lyties ir dozės lygmens gyvūnų (t. y. po 1 patinėlį arba 1 patelę iš vados) tyrimo pabaigoje humaniškai numarinami, jų galvos smegenys išimamos ir pasveriamos.

5. 20 likusių kiekvienos lyties iš grupės gyvūnų yra paliekami galimiems papildomiems bandymams atlikti.

1 lentelė

Jauniklio nr. [a]		Bandymui paskirtų jauniklių skaičius	Tyrimas/Bandymas
V	M		
1	5	20 V + 20 M	Elgsenos ontogenezė
		10 V + 10 M	22 PND galvos smegenų masė/neuropatologinė morfometrija
		10 V + 10 M	22 PND galvos smegenų masė
2	6	20 V + 20 M	Išsamūs klinikiniai stebėjimai
		20 V + 20 M	Motorinis aktyvumas
		20 V+ 20 M	Lytinis subrendimas
		20 V + 20 M	Motorinė ir jutiminė funkcijos
		20 V + 20 M	Mokymasis ir atmintis (25 PND)
		10 V + 10 M	Jaunų suaugusių gyvūnų galvos smegenų masė/neuropatologinė morfometrija ~ 70 PND

▼**M5**

Jauniklio nr. [a]		Bandymui paskirtų jauniklių skaičius	Tyrimas/Bandymas
V	M		
3	7	20 V + 20 M	Mokymasis ir atmintis (jauni suaugę gyvūnai)
		10 V + 10 M	Jaunų suaugusių gyvūnų galvos smegenų masė ~ 70 PND
4	8	—	Rezerviniai gyvūnai kitiems gyvūnams pakeisti arba papildomiems bandymams atlikti

[a] Šiame pavyzdyje vados yra išbrokuotos, kad liktų po 4 patinėlius ir 4 pateles; patinėliai žymimi numeriais nuo 1 iki 4, patelės – nuo 5 iki 8.

2 pavyzdys

6. Elgsenos ontogenezės bandymams iki nujunkymo naudojama viena grupė, kurią sudaro po 20 kiekvienos lyties jauniklių (po 1 patinėlį ir 1 patelę iš vados) vienam dozės lygmeniui. Iš šių gyvūnų po 10 kiekvienos lyties ir dozės lygmens jauniklių (t. y. po 1 patinėlį arba 1 patelę iš vados) yra humaniškai numarinami 11-ą PND. Galvos smegenys išimamos, pasveriamos ir parengiamos histopatologiniam vertinimui.

7. Kita grupė, kurią sudaro po 20 kiekvienos lyties jauniklių (po 1 patinėlį ir 1 patelę iš vados) vienam dozės lygmeniui, yra naudojama bandymams po nujunkymo (atliekami išsamūs klinikiniai stebėjimai, vertinamas motorinis aktyvumas, lytinio subrendimo amžius, motorinė ir jutiminė funkcijos). Iš šių gyvūnų po 10 kiekvienos lyties ir dozės lygmens jauniklių (t. y. po 1 patinėlį arba 1 patelę iš vados) tyrimo pabaigoje (apie 70 PND) duodama anestetiko, jie fiksuojami perfuzijos būdu. Po papildomo fiksavimo *in situ* galvos smegenys išimamos, pasveriamos ir parengiamos neuropatologiniam vertinimui.

8. Paaugusių jauniklių ir jaunų suaugusių gyvūnų kognityvinės funkcijos bandymams naudojama grupė, kurią sudaro po 10 kiekvienos lyties jauniklių (t. y. po 1 patinėlį arba 1 patelę iš vados) vienam dozės lygmeniui. 23 PND amžiaus gyvūnų ir jaunų suaugusių gyvūnų kognityvinei funkcijai bandyti yra naudojami skirtingi gyvūnai. Tyrimo pabaigoje po 10 kiekvienos lyties iš grupės gyvūnų, su kuriais atlikti suaugusiems gyvūnams skirti bandymai, yra numarinami, jų galvos smegenys išimamos ir pasveriamos.

9. 20 likusių kiekvienos lyties iš grupės gyvūnų, kurie nebuvo pasirinkti bandymams, yra numarinami ir sunaikinami po nujunkymo.

2 lentelė

Jauniklio nr. [a]		Bandymui paskirtų jauniklių skaičius	Tyrimas/bandymas
V	M		
1	5	20 V + 20 M	Elgsenos ontogenezė
		10 V + 10 M	11 PND galvos smegenų masė/ neuropatologinė morfometrija
2	6	20 V + 20 M	Išsamūs klinikiniai stebėjimai
		20 V + 20 M	Motorinis aktyvumas
		20 V + 20 M	Lytinis subrendimas
		20 V + 20 M	Motorinė ir jutiminė funkcijos
		10 V + 10 M	Jaunų suaugusių gyvūnų galvos smegenų masė/neuropatologinė morfometrija ~ 70 PND

▼M5

Jauniklio nr. (a)		Bandymui paskirtų jauniklių skaičius	Tyrimas/bandymas
V	M		
3	7	10 V + 10 M (b)	Mokymasis ir atmintis (23 PND)
3	7	10 V + 10 M (b)	Mokymasis ir atmintis (jauni suaugę gyvūnai) Jaunų suaugusių gyvūnų galvos smegenų masė
4	8	—	Gyvūnai numarinami ir sunaikinami 21 PND

(a) Šiame pavyzdyje vados yra išbrokuotos, kad liktų po 4 patinėlius ir 4 pateles; patinėliai žymimi skaičiais nuo 1 iki 4, patelės – nuo 5 iki 8.
(b) Kognityviniams bandymams yra naudojami skirtingi 23 PND amžiaus jaunikliai ir jauni suaugę gyvūnai (pvz., lyginės arba nelyginės vados, kurių iš viso yra 20).

3 pavyzdys

10. Smegenų masės ir neuropatologiniam vertinimui 11 PND naudojama viena grupė, kurią sudaro po 20 kiekvienos lyties jauniklių (po 1 patinėlį ir 1 patelę iš vados) vienam dozės lygmeniui. Iš šių gyvūnų po 10 kiekvienos lyties ir dozės lygmens jauniklių (t. y. po 1 patinėlį arba 1 patelę iš vados) yra humaniškai numarinami 11 PND. Jų galvos smegenys išimamos, pasveriamos ir parengiamos histopatologiniam vertinimui. Galvos smegenų masės duomenys taip pat yra renkami naudojant likusių to paties dozės lygmens 10 patinėlių ir 10 patelių nefiksuotas galvos smegenis.

11. Kita grupė, kurią sudaro po 20 kiekvienos lyties jauniklių (po 1 patinėlį ir 1 patelę iš vados) vienam dozės lygmeniui, yra naudojama elgsenos ontogenezės (motorinio aktyvumo) tyrimams, tyrimams po nujunkymo (motoriniam aktyvumui ir lytinio subrendimo amžiui vertinti), paaugusių jauniklių kognityvinei funkcijai bandyti.

12. Motorinės ir jutiminės funkcijų (reakcijos į garsinius dirgiklius) bandymams ir išsamiems klinikiniams stebėjimams atlikti naudojama viena grupė, kurią sudaro po 20 kiekvienos lyties jauniklių (po 1 patinėlį ir 1 patelę iš vados) vienam dozės lygmeniui. Iš šių gyvūnų po 10 kiekvienos lyties ir dozės lygmens jauniklių (t. y. po 1 patinėlį arba 1 patelę iš vados) tyrimo pabaigoje (apie 70 PND) duodama anestetiko, jie fiksuojami perfuzijos būdu. Po papildomo fiksavimo *in situ* galvos smegenys išimamos, pasveriamos ir parengiamos neuropatologiniam vertinimui.

13. Jaunų suaugusių gyvūnų kognityvinės funkcijos bandymams yra naudojama grupė, kurią sudaro po 20 kiekvienos lyties jauniklių (t. y. po 1 patinėlį ir 1 patelę iš vados) vienam dozės lygmeniui. Iš šių gyvūnų po 10 kiekvienos lyties ir dozės lygmens gyvūnų (t. y. po 1 patinėlį arba 1 patelę iš vados) tyrimo pabaigoje humaniškai numarinami, jų galvos smegenys išimamos ir pasveriamos.

3 lentelė

Jauniklio nr. (a)		Bandymui paskirtų jauniklių skaičius	Tyrimas/bandymas
V	M		
1	5	10 V + 10 M	11 PND galvos smegenų masė/neuropatologinė morfometrija
		10 V + 10 M	11 PND galvos smegenų masė
2	6	20 V + 20 M	Elgsenos ontogenezė (motorinis aktyvumas)
		20 V + 20 M	Motorinis aktyvumas
		20 V + 20 M	Lytinis subrendimas
		20 V + 20 M	Mokymasis ir atmintis (27-ą PND)

▼**M5**

Jauniklio nr. [a]		Bandymui paskirtų jauniklių skaičius	Tyrimas/bandymas
V	M		
3	7	20 V + 20 M	Reakcija į garsinį dirgiklį (paaugusiems jaunikliams ir jauniems suaugusiems gyvūnams)
		20 V + 20 M	Išsamūs klinikiniai stebėjimai
		10 V + 10 M	Jaunų suaugusių gyvūnų galvos smegenų masė/neuropatologija 70 PND morfometrija
4	8	20 V + 20 M	Mokymasis ir atmintis (jauni suaugę gyvūnai)
		10 V + 10 M	Jaunų suaugusių gyvūnų smegenų masė

[a] Šiame pavyzdyje vados yra išbrokuotos, kad liktų po 4 patinėlius ir 4 pateles; patinėliai žymimi numeriais nuo 1 iki 4, patelės – nuo 5 iki 8.

▼**M5**

2 priedėlis

Sąvokos

Cheminė medžiaga : medžiaga arba mišinys.

Bandomoji cheminė medžiaga : bet kuri pagal šį bandymų metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

▼M5

B.54. POVEIKIU GRAUŽIKŲ GIMDAI PAGRĮSTA BIOANALIZĖ. TRUMPALAIKIS ESTROGENINIŲ SAVYBIŲ ATRANKOS BANDYMAS

ĮVADAS

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO Bandymų gaires (angl. *OECD Test Guideline* (TG)) Nr. 440 (2007). 1998 m. EBPO iniciatyva pradėtas didelės svarbos darbas – peržiūrėti esamas gaires ir parengti naujas galimai endokrininę sistemą ardančių medžiagų atrankos ir bandymo gaires. Viena iš šio darbo dalių – parengti poveikiu graužikų gimdai pagrįstos bioanalizės gaires. Paskui buvo įgyvendinta plati poveikiu graužikų gimdai pagrįstos bioanalizės tinkamumo patvirtinimo programa, be kita ko, buvo parengtas dokumentas su išsamia įvadine informacija (2) (3), atlikti platūs tyrimai vienoje laboratorijoje ir skirtingose laboratorijose siekiant parodyti bioanalizės su stipriu etaloniniu estrogenu, silpnais estrogenų receptorių agonistais, stipriu estrogenų receptorių antagonistu ir neigiama etalonine chemine medžiaga aktualumą ir atkuriamumą (4) (5) (6) (7) (8) (9). Šis bandymų metodas B.54 yra paremtas patirtimi, įgyta įgyvendinant tinkamumo patvirtinimo bandymo programą, ir per šią programą gautais estrogenų agonistų tyrimo rezultatais.

2. Poveikiu gimdai pagrįsta bioanalizė yra trumpalaikis atrankos bandymas, sukurtas 4-ajame dešimtmetyje (27) (28), pirmą kartą ekspertų komitetas jį standartizavo atrankai atlikti 1962 m. (32) (35). Jis pagrįstas gimdos masės didėjimu arba poveikį gimdai turinčiu atsaku (jei norite susipažinti išsamiau, žr. 29). Jį atliekant vertinama, ar cheminė medžiaga gali paskatinti biologinį aktyvumą, atitinkantį natūralių estrogenų (pvz., 17ß-estradiolio) agonistų arba antagonistų veikimą, tačiau šis bandymas antagonistams nustatyti taikomas daug rečiau negu agonistams. Gimda į estrogenus reaguoja dvejopai. Pirminis atsakas yra masės padidėjimas dėl vandens sugėrimo. Paskui audiniui augant ima didėti masė (30). Žiurkių ir pelių gimdos atsakas kokybiniu požiūriu yra panašus.

3. Ši bioanalizė yra *in vivo* atrankos analizė, jos taikymą reikėtų vertinti pagal EBPO Konceptualią endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo sistemą (angl. *Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals*) (2 priedėlis). Pagal šią konceptualią sistemą poveikiu gimdai pagrįsta bioanalizė yra 3 lygmens *in vivo* analizė, kurią atliekant gaunama duomenų apie vieną endokrininės sistemos mechanizmą, t. y. estrogeninį poveikį.

4. Poveikiu gimdai pagrįsta bioanalizė yra sukurta kaip *in vitro* ir *in vivo* bandymų serijos dalis, ji yra skirta cheminėms medžiagoms, kurios gali sąveikauti su endokrinine sistema, nustatyti ir taip padėti atlikti rizikos žmogaus sveikatai ir aplinkai vertinimą. EBPO tinkamumo patvirtinimo programoje buvo naudojami ir stiprūs, ir silpni estrogenų agonistai siekiant įvertinti, kaip analizė padeda nustatyti estrogenines chemines medžiagas (4) (5) (6) (7) (8). Šia programa buvo aiškiai parodytas bandymų metodo jautrumas estrogenų agonistams nustatyti ir gauti geri atkuriamumo toje pačioje laboratorijoje ir skirtingose laboratorijose rezultatai.

5. Kalbant apie neigiamas chemines medžiagas, į tinkamumo patvirtinimo programą įtraukta tik viena etaloninė cheminė medžiaga, poveikiu gimdai pagrįsta analize ir *in vitro* rišimosi prie receptorių bei receptorių analize patvirtinta kaip „neigiama“; taip pat buvo įvertinti papildomi bandymų duomenys, nesusiję su EBPO tinkamumo patvirtinimo programa, kuriais dar išsamiau patvirtintas poveikiu gimdai pagrįstos bioanalizės tinkamumas estrogenų agonistų atrankai atlikti (16).

▼M5

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

6. Estrogenų agonistai ir antagonistai veikia kaip estrogenų receptorių a ir b ligandai ir gali atitinkamai skatinti arba slopinti transkripcinę receptorių veiklą. Dėl to gali kilti pavojus sveikatai, įskaitant poveikį dauginimuisi ir vystymuisi. Dėl to cheminę medžiagą reikia greitai įvertinti ir nustatyti, ar ji gali veikti kaip estrogeno agonistas arba antagonistas. Nors ligandų rišimosi prie estrogenų receptorių afiniškumas arba reporterinių genų transkripcijos aktyvinimas *in vitro* yra informatyvus veiksnys, jis yra tik vienas iš keleto galimo pavojaus determinantų. Kiti galimi determinantai – tai metabolinis aktyvavimas ir deaktyvavimas patekus į organizmą, pasiskirstymas tikslinuose audiniuose, pašalinimas iš organizmo, priklausantis, bent jau iš dalies, nuo bandomosios cheminės medžiagos ir jos davimo būdo. Dėl to reikia atlikti galimo cheminės medžiagos veikimo *in vivo* atitinkamomis sąlygomis atrankos bandymą, išskyrus tuos atvejus, kai reikiama informacija jau būna turima iš cheminės medžiagos absorbcijos, pasiskirstymo, metabolizmo, pašalinimo (ADME) charakteristikos. Gimdos audiniai, ypač laboratorinių graužikų, kurių rujos ciklas trunka apie 4 dienas, reaguoja į stimuliavimą estrogenais sparčiai ir energingai augdami. Įvairių rūšių graužikai, ypač žiurkės, taip pat plačiai naudojami toksiškumo tyrimuose pavojingumui apibūdinti. Todėl graužiko gimda yra tinkamas tikslinis organas estrogenų agonistų ir antagonistų *in vivo* atrankos bandymui atlikti.

7. Šis bandymų metodas yra pagrįstas tais EBPO tinkamumo patvirtinimo tyrime naudotais protokolais, kurie ir vienos laboratorijos, ir skirtingų laboratorijų tyrimuose patvirtinti kaip patikimi ir atkartojami (5) (7). Šiuo metu galima taikyti du metodus, tai yra: suaugusių patelių, kurioms atlikta ovariektomija, t. y. OVX suaugusių patelių metodą ir nesubrendusių patelių, kurioms neatlikta ovariektomija, t. y. nesubrendusių patelių metodą. Per EBPO tinkamumo patvirtinimo bandymo programą buvo įrodyta, kad abiejų metodų jautrumas ir atkuriamumas yra panašūs. Tačiau, kadangi nesubrendusio gyvūno pogumburio–hipofizės–lytinių liaukų (angl. HPG) ašis dar neaktyvi, šis metodas yra ne toks specifiškas, bet apima platesnį tyrimą negu tada, kai naudojamas gyvūnas, kuriam atlikta ovariektomija, nes nesubrendęs gyvūnas gali reaguoti į chemines medžiagas, kurios sąveikauja su pogumburio–hipofizės–lytinių liaukų ašimi, ne tik su estrogeno receptoriumi. Žiurkių pogumburio–hipofizės–lytinių liaukų ašis ima funkcionuoti maždaug 15 dieną po atsivedimo. Iki tol paspartinti subrendimo duodant, pavyzdžiui, GnRH, negalima. Artėjant patelių lytinio subrendimo laikui, iki makšties atsivėrimo patelei įvyksta keli tušti ciklai, per kuriuos makštis neatsiveria ir ovuliacija neįvyksta, tačiau būna tam tikrų hormoninių svyravimų. Jeigu chemine medžiaga pogumburio–hipofizės–lytinių liaukų ašis yra tiesiogiai arba netiesiogiai stimuliuojama, patelė anksti subręsta, anksti vyksta ovuliacija, spartėja makšties atsivėrimo procesas. Tokį poveikį daro ne tik cheminės medžiagos, kurios veikia pogumburio–hipofizės–lytinių liaukų ašį, – kai kurie pašarai, kurių metabolizuojančios energijos lygis yra didesnis, skatina augimą ir spartina makšties atsivėrimą, nors nėra estrogeniniai. Tokios cheminės medžiagos OVX suaugusiems gyvūnams nesukels poveikį gimdai turinčio atsako, nes jų pogumburio–hipofizės–lytinių liaukų ašis nefunkcionuoja.

8. Rūpinantis gyvūnų gerove reikėtų taikyti tą metodą, pagal kurį naudojamos nesubrendusios žiurkės, vengti chirurginio gyvūnų paruošimo, stengtis, jei galima, nenaudoti tų gyvūnų, kurie turi kokių nors rujos pradžios požymių (žr. 30 punktą).

▼M5

9. Poveikį gimdai turintis atsakas būna ne vien estrogeninės kilmės, t. y. atsaką gali sukelti ir kitos cheminės medžiagos, ne vien estrogenų agonistai arba antagonistai. Pavyzdžiui, santykinai didelės progesterono, testosterono arba įvairių sintetinių progestinų dozės gali daryti stimuliuojamąjį poveikį (30). Bet kurį atsaką galima ištirti histologiškai ir patikrinti, ar makščiai daromas keratinizavimo ir ragėjimo poveikis (30). Kad ir kokios kilmės būtų galimas atsakas, teigiami poveikiu gimdai pagrįstos bioanalizės rezultatai paprastai turėtų paskatinti imtis tolesnių aiškinimosi tyrimų. Papildomų duomenų apie estrogeninį poveikį galima gauti atliekant *in vitro* analizę, pavyzdžiui, rišimosi prie ER, transkripcijos aktyvinimo analizę, arba *in vivo* analizę, pavyzdžiui, patelių lytinio subrendimo analizę.

10. Atsižvelgiant į tai, kad poveikiu gimdai pagrįsta bioanalizė yra *in vivo* atrankos analizė, pasirinktas tinkamumo patvirtinimo metodas padėjo ir atsižvelgti į gyvūnų gerovę, ir laikytis daugiapakopių bandymų strategijos. Todėl atliekant analizę buvo stengiamasi tiksliai patvirtinti estrogeninio poveikio – tai svarbiausias rūpestis, kylantis dėl daugelio cheminių medžiagų, – rezultatų atkuriamumą ir jautrumą, bet mažai dėmesio skirta antiestrogeninio poveikio aspektams. Buvo išbandytas tik vienas stipriai veikiantis antiestrogenas, nes akivaizdžiai antiestrogeninio pobūdžio (kurio nenustelbia tam tikras estrogeninis poveikis) cheminių medžiagų yra labai nedaug. Šis bandymų metodas taikomas pagal estrogeninio poveikio protokolą, o protokolas, kuriame aptariamas antagonistų analizės būdas, yra pateiktas Rekomendaciniame dokumente (37). Cheminių medžiagų, darančių grynai antiestrogeninį poveikį, analizės atkuriamumas ir jautrumas bus išsamiau apibrėžtas vėliau, bandymų metodikai tapus įprasta, kurį laiką ją panaudojus ir nustačius daugiau tokio pobūdžio poveikį turinčių cheminių medžiagų.

11. Pripažįstama, kad visos procedūros, kurioms naudojami gyvūnai, turi atitikti gyvūnų priežiūros vietinius reikalavimus; toliau nurodyti gyvūnų priežiūros ir elgesio su gyvūnais reikalavimai yra būtiniausi veiklos reikalavimai ir už juos viršesni yra vietiniai reikalavimai, pavyzdžiui, 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos (38). Daugiau humaniško elgesio su gyvūnais gaires galima rasti EBPO (25).

12. Kaip ir prieš bet kurią kitą analizę, kuriai atlikti naudojami gyvi gyvūnai, prieš pradedant šią analizę itin svarbu įsitikinti, kad duomenys tikrai reikalingi. Pavyzdžiui, dvi sąlygos, kada duomenys gali būti reikalingi, yra tokios:

— yra didelė sąlyčio tikimybė (konceptualios sistemos (2 priedėlis) 1 lygmuo) arba estrogeninio poveikio požymiai (2 lygmuo) ir siekiama nustatyti, ar toks poveikis gali pasireikšti *in vivo*;

— atliekant 4 arba 5 lygmens *in vivo* bandymus nustatoma estrogeninio poveikio požymių ir yra siekiama pagrįsti, kad šis poveikis yra susijęs su estrogenų mechanizmu, kurio *in vitro* bandymu išsiaiškinti neįmanoma.

13. Sąvokos, vartojamos šiame bandymų metodo aprašyme, pateiktos 1 priedėlyje.

▼M5

BANDYMŲ METODO PRINCIPAS

14. Poveikiu gimdai pagrįstos bioanalizės jautrumas paremtas bandymų su gyvūnais sistema, pagal kurią pogumburio–hipofizės–kiaušidžių ašis nefunkcionuoja, dėl to endogeninis cirkuliuojančių estrogenų lygis yra žemas. Taip užtikrinama maža pradinė gimdos masė ir didžiausias galimas atsako į duodamus estrogenus spektras. Yra dvi šį reikalavimą atitinkančios graužikų patelių būsenos, kada jos yra jautrios estrogenams:

i) kol patelės yra nesubrendusios, po nujunkymo iki lytinio subrendimo, ir

ii) jaunos suaugusios patelės, kurioms atlikta ovariektomija, praėjus pakankamai laiko, kad gimdos audiniai galėtų regresuoti.

15. Bandomoji cheminė medžiaga duodama kasdien per virškinamąjį traktą, naudojant zondą, arba poodinėmis injekcijomis. Skirtingos bandomosios cheminės medžiagos dozės duodamos ne mažiau kaip dviem dozes gaunančioms bandomųjų gyvūnų grupėms (paaiškinimai pateikti 33 punkte), kiekvienai grupei duodant po vieno dydžio dozę: pagal nesubrendusių gyvūnų metodą – tris dienas iš eilės, pagal OVX suaugusių gyvūnų metodą – ne trumpiau kaip tris dienas iš eilės. Gyvūnų nekroskopija atliekama praėjus maždaug 24 valandoms po paskutinės dozės davimo. Tiriant estrogenų agonistus vertinama, ar dozes gaunančių grupių gyvūnų gimdos masės padidėjimo vidurkis yra statistiškai reikšmingas, palyginti su nešiklio grupe. Statistiškai reikšmingas dozes gaunančios grupės gyvūnų gimdos masės vidurkio padidėjimas rodo, kad per šią bioanalizę gautas teigiamas atsakas.

METODO APRAŠYMAS

Gyvūnų rūšies parinkimas

16. Galima naudoti dažniausiai naudojamų veislių laboratorinius graužikus. Pavyzdžiui, tinkamumo patvirtinimo tikslais naudotos Sprague-Dawley ir Wistar veislių žiurkės. Jei žinoma arba įtariama, kad kai kurių veislių gyvūnų gimda reaguoja ne taip jautriai, tokių gyvūnų naudoti nereikėtų. Laboratorija turėtų įrodyti naudojamos veislės gyvūnų jautrumą taip, kaip aptarta 26 ir 27 punktuose.

17. Poveikiu gimdai pagrįstai bioanalizei atlikti nuo 4-ojo dešimtmečio dažniausiai buvo naudojamos žiurkės ir pelės. EBPO tinkamumo patvirtinimo tyrimai buvo atliekami tik su žiurkėmis, laikantis nuomonės, kad abi rūšys turėtų būti lygiavertės ir kad, siekiant saugoti išteklius ir gyvūnus, tinkamumui visame pasaulyje patvirtinti turėtų pakakti vienos rūšies. Toksiškumo dauginimuisi ir vystymuisi tyrimuose dažniausiai pasirenkama rūšis yra žiurkės. Kadangi jau anksčiau sukaupta plati duomenų apie peles bazė, siekiant poveikiu graužikų gimdai pagrįstą bioanalizės metodą išplėsti pritaikant jį pelėms, kaip bandomųjų gyvūnų rūšiai, su pelėmis atliktas riboto masto kontrolinis tinkamumo patvirtinimo tyrimas. Laikantis pradinio siekio saugoti išteklius ir gyvūnus, pasirinktas tarpinis metodas, pagal kurį buvo panaudota nedaug bandomųjų cheminių medžiagų, dalyvavo nedaug laboratorijų ir nebuvo naudoti koduotų mėginių bandymai. Iš šio tarpinio tinkamumo patvirtinimo tyrimo matyti, kad poveikiu jaunų suaugusių pelių, kurioms atlikta ovariektomija, gimdai pagrįsta bioanalizė ir kokybiniu, ir kiekybiniu požiūriu tiksliai atitinka žiurkių tyrimo duomenis. Jei poveikiu gimdai pagrįsta bioanalizė yra pradinė, atliekama prieš ilgalaikį tyrimą, abiem tyrimams galima naudoti tos pačios veislės ir to paties šaltinio gyvūnus. Pagal tarpinį metodą naudotos tik OVX pelės ir ataskaitoje nėra pateikiama pakankamai tvirtų duomenų nesubrendusių pelių modelio tinkamumui patvirtinti, todėl šiame bandymų metode į nesubrendusių pelių modelį nebuvo atsižvelgta.

▼M5

18. Taigi kai kuriais atvejais vietoj žiurkių galima naudoti peles. Jeigu pasirenkama ši gyvūnų rūšis, pasirinkimą reikėtų pagrįsti pagal toksikologinius, farmakokinetinius ir (arba) kitus kriterijus. Jei naudojamos pelės, protokolą gali tekti pakeisti. Pavyzdžiui, pelių pašaro suvartojimas pagal kūno masę yra didesnis už žiurkių, todėl fitoestrogeno kiekis pelėms duodamuose pašaruose turėtų būti mažesnis negu žiurkėms duodamuose pašaruose (9) (20) (22).

Laikymo ir šėrimo sąlygos

19. Visos procedūros turėti atitikti vietos laboratorinių gyvūnų priežiūros standartus. Šiose nuostatose pateikti būtiniausi gyvūnų priežiūros ir elgesio su gyvūnais reikalavimai, vietos taisyklės, pavyzdžiui, 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos, yra už juos viršesnės. Bandomųjų gyvūnų patalpos temperatūra turi būti 22 °C (gali svyruoti ± 3 °C). Santykinė drėgmė turėtų būti mažiausiai 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką. Reikėtų siekti, kad santykinė drėgmė būtų 50–60 %. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis. Per parą apšvietimo seka turėtų būti 12 h šviesos ir 12 h tamsos.

20. Laboratorinis pašaras ir vanduo turėtų būti duodami *ad libitum*. Jauni suaugę gyvūnai narveliuose gali būti laikomi atskirai arba tos pačios lyties grupėmis po tris. Dėl jauno nesubrendusių gyvūnų amžiaus juos laikyti rekomenduojama socialinėmis grupėmis.

21. Yra žinoma, kad didelis fitoestrogenų kiekis laboratoriniuose pašaruose pakankamai smarkiai skatina graužikų gimdos masę didėti – tiek, kad tai gali trukdyti atlikti poveikiu gimdai pagrįstą bioanalizę (13) (14) (15). Kai naudojami nesubrendę gyvūnai, didelis fitoestrogenų kiekis laboratoriniuose pašaruose ir jų metabolizuojanti energija taip pat gali paskatinti ankstyvą lytinį subrendimą. Fitoestrogenų pašaruose visų pirma atsiranda dėl to, kad į juos dedama sojos ir alfalfa produktų, ištirta, kad fitoestrogenų kiekis įvairiose laboratorinių pašarų partijose būna skirtingas (23). Kūno masė yra svarbus kintamasis, nes vartojamo pašaro kokybė yra susijusi su kūno mase. Todėl su tokiais pačiais pašarais faktiškai suvartojamas fitoestrogenų kiekis, lyginant skirtingų rūšių ir amžiaus gyvūnus, gali skirtis (9). Nesubrendusios žiurkių patelės pašaro pagal kūno masę gali suvartoti maždaug dukart daugiau negu jaunos suaugusios patelės, kurioms atlikta ovariektomija. Jaunos suaugusios pelės pašaro pagal kūno masę gali suvartoti maždaug keturiskart daugiau negu jaunos suaugusios žiurkių patelės, kurioms atlikta ovariektomija.

22. Tačiau poveikiu gimdai pagrįstos bioanalizės rezultatai (9) (17) (18) (19) rodo, kad nedidelis fitoestrogenų kiekis pašaruose yra priimtinas ir nemažina bioanalizės jautrumo. Rekomenduojama, kad fitoestrogenų kiekis jaunoms Sprague Dawley ir Wistar veislių žiurkėms duodamuose pašaruose sudarytų ne daugiau kaip 350 µg genisteino ekvivalentų vienam laboratorinio pašaro gramų (6) (9). Tokį pašarą taip pat tiktų naudoti, kai bandymas atliekamas su jaunomis suaugusiomis žiurkių patelėmis, kurioms atlikta ovariektomija, nes jauni gyvūnai, palyginti su nesubrendusiais gyvūnais, pašaro pagal kūno masę suvartoja mažiau. Jeigu reikia naudoti peles, kurioms atlikta ovariektomija, arba fitoestrogenams jautresnes žiurkes, reikėtų apsvarstyti galimybę proporcingai sumažinti fitoestrogenų kiekį pašaruose (20). Be to, dėl skirtingos įvairių pašarų metabolinės energijos gali keistis lytinio brendimo pradžios laikas (21) (22).

▼M5

23. Prieš tyrimą reikėtų kruopščiai pasirinkti pašarus, kad jų fitoestrogenų (paaiškinimai pateikti (6) (9)) arba metabolizuojančios energijos kiekis nebūtų padidintas, nes tai gali iškreipti rezultatus (15) (17) (19) (22) (36). Tam, kad laboratorijos taikoma bandymo sistema veiktų tinkamai, taip, kaip nurodyta 26 ir 27 punktuose, svarbu patikrinti abu šiuos veiksnius. Kaip gerą laboratorijos praktiką (GLP) atitinkanti apsauginė priemonė turėtų būti paimtas reprezentatyvus kiekvienos pašarų, duodamų per tyrimą, partijos mėginys, kad būtų galima ištirti juose esančių fitoestrogenų kiekį (pvz., kai gimdos kontrolinis svoris, palyginti su ankstesniais kontroliniais duomenimis, yra didelis arba kai atsakas į etaloninį estrogeną, 17 alfa-etinilestradiolį, yra neadekvatus). Alikvotines dalis reikėtų išanalizuoti per tyrimą arba užšaldyti – 20 °C temperatūroje ar taip, kad mėginys iki analizės nesuirtų.

24. Kai kurio kraiko sudėtyje gali būti natūraliai susidariusių estrogeninių arba antiestrogeninių cheminių medžiagų (pvz., yra žinoma, kad kukurūzų burbuolės kotai veikia žiurkių rujos ciklišKumą ir yra antiestrogeniniai). Pasirinktame kraike turėtų būti kuo mažesnis fitoestrogenų kiekis.

Gyvūnų paruošimas

25. Bandomieji gyvūnai, neturintys ligos arba fizinių anomalijų požymių, yra atsitiktine tvarka suskirstomi į kontrolinę ir dozes gaunančias grupes. Narveliai turėtų būti išdėstomi taip, kad būtų kiek įmanoma sumažintas bet koks galimas poveikis dėl narvelio vietos. Gyvūnus reikėtų paženklinti unikaliomis žymomis. Nesubrendusius gyvūnus aklimatizacijos laikotarpiu iki nujunkymo geriau laikyti viename narvelyje su motininėmis arba kitomis žindančiomis patelėmis. Jaunų suaugusių gyvūnų ir nesubrendusių gyvūnų, kurie pristatyti kartu su motininėmis patelėmis arba kitomis žindančiomis patelėmis, aklimatizacijos laikotarpis iki tyrimo pradžios turėtų trukti apie 5 dienas. Jeigu nesubrendę gyvūnai yra įsigyti jau nujunkyti ir be motininių patelių, aklimatizacijos laikotarpį gali tekti sutrumpinti, nes dozes reikėtų pradėti duoti iškart po nujunkymo (žr. 29 punktą).

BANDYMO PROCEDŪRA

Laboratorijos kompetencijos patikrinimas

26. Laboratorijos kompetenciją patikrinti galima dvejopai:

— periodiškai tikrinti pagal pradinio bazinio teigiamo kontrolinio tyrimo rezultatus (žr. 27 punktą). Ne rečiau kaip kas 6 mėnesius ir kaskart, kai atsiranda pokytis, galintis paveikti analizės eigą (pvz., nauji pašarai, skrodimus atliekančio personalo pasikeitimas, gyvūnų veislės arba tiekėjo pasikeitimas ir t. t.), reikėtų patikrinti bandymo sistemos (gyvūnų modelio) jautrumą, tam panaudojant atitinkamą etaloninio estrogeno 17a-etinilestradiolio (CAS Nr. 57–63–6) (EE) dozę (remiantis 27 punkte nurodyto bazinio teigiamo kontrolinio tyrimo rezultatais);

— vykdyti lygiagrečią kontrolę, į kiekvieną analizę įtraukiant grupę, kuriai duodama atitinkama etaloninio estrogeno dozė.

Jeigu sistema reaguoja ne taip, kaip tikėtasi, bandymo sąlygas reikėtų išnagrinėti ir atitinkamai pakeisti. Rekomenduojama etaloninio estrogeno dozė, kuri būtų naudojama pagal bet kurį iš būdų, sudarytų ED70–80.

▼M5

27. **Bazinis teigiamas kontrolinis tyrimas** – laboratorija prieš pirmą kartą atlikdama tyrimą pagal šį bandymų metodą turėtų patikrinti savo kompetenciją, t. y. išbandyti gyvūnų modelio jautrumą nustatydama atsaką į etaloninio estrogeno 17a-etinilestradiolio (CAS Nr. 57–63–6) (EE) dozę, kai skiriamos ne mažiau kaip keturios dozės. Gimdos masės atsakas bus palygintas su turimais ankstesniais duomenimis (žr. literatūros sąrašo 5 punktą). Jeigu šis bazinis teigiamas kontrolinis tyrimas neduoda lauktų rezultatų, bandymo sąlygas reikėtų išnagrinėti ir atitinkamai pakeisti.

Gyvūnų skaičius ir būklė

28. Kiekvienoje dozes gaunančioje ir kontrolinėje grupėje turėtų būti mažiausiai 6 gyvūnai (ir pagal nesubrendusių gyvūnų, ir pagal OVX suaugusių gyvūnų metodo protokolus).

Nesubrendusių gyvūnų amžius

29. Kai poveikiu gimdai pagrįstai bioanalizei atlikti naudojami nesubrendę gyvūnai, būtina nurodyti jų atsivedimo datą. Dozes reikėtų pradėti duoti pakankamai anksti, siekiant užtikrinti, kad cheminės medžiagos vartojimo pabaigoje fiziologinis endogeninių estrogenų, susijusių su lytiniu brendimu, pakilimas dar nebūtų prasidėjęs. Kita vertus, turima duomenų, kad labai jauni gyvūnai gali būti ne tokie jautrūs. Apibrėždama optimalų amžių kiekviena laboratorija turėtų atsižvelgti į savo pačios turimus brendimo duomenis.

Bendra rekomendacija – žiurkėms dozes pradėti duoti iš karto po ankstyvo nujunkymo 19 postnatalinę dieną (atsivedimo diena yra žymima kaip 0 postnatalinė diena). Žiurkėms dozes baigti duoti geriausia 21 postnatalinę dieną ir bet kokiu atveju – iki 25 postnatalinės dienos, nes sukakus šiam amžiui pradeda funkcionuoti pogumburio-hipofizės–kiaušidžių ašis ir endogeniniai estrogeno lygiai gali pradėti kilti, kartu gali padidėti pradinė gimdos masė ir grupės standartiniai nuokrypiai (2) (3) (10) (11) (12).

Ovariektomijos procedūra

30. Kai naudojamos žiurkių ir pelių patelės (dozes gaunanti ir kontrolinė grupės), kurioms reikia atlikti ovariektomiją, tai turėtų būti atlikta 6–8 jų amžiaus savaitę. Kai ovariektomija atliekama žiurkėms, nuo ovariektomijos iki pirmos dozės davimo turėtų praeiti ne mažiau kaip 14 dienų, kad gimda regresuotų iki minimalios, stabilios pradinės būklės. Nuo pelėms atliktos ovariektomijos iki pirmos dozės davimo turėtų praeiti bent 7 dienos. Kadangi nedidelis kiaušidžių audinio kiekis yra pakankamas, kad pasigamintų reikšmingas cirkuliuojančių estrogenų (3) kiekis, prieš naudojant gyvūnus reikėtų patikrinti – bent penkias dienas iš eilės (pvz., 10–14 dieną po ovariektomijos, kai ji atlikta žiurkėms) stebėti iš makšties paimto tepinėlio epitelines ląsteles. Jeigu yra kokių nors požymių, kad prasideda gyvūnų ruja, šių gyvūnų nereikėtų naudoti. Vėliau per nekroskopiją reikėtų ištirti kiaušidžių pašalinimo vietas ir patikrinti, ar nėra kiaušidžių audinio likučių. Jei yra, to gyvūno reikėtų neįskaityti į atliekamus skaičiavimus (3).

31. Ovariektomijos procedūra pradedama gyvūnui esant pilvo (kniūbščioje) gulimojoje padėtyje, jį tinkamai nuskausminus. Pjūvis dorsolateralinei pilvo sienelei atverti turėtų būti apie 1 cm ilgio ir daromas per vidurį tarp šonkaulių krašto ir kryžkaulio, per kelis milimetrus atitrauktas į šoną link lateralinės strėnų raumens ribos. Kiaušides iš pilvo ertmės reikėtų išimti ant sterilaus paviršiaus. Kiaušides reikėtų atskirti kiaušintakių ir gimdos susijungimo vietose. Įsitikinus, kad nėra didelio kraujavimo, pilvo sienelę reikėtų susiūti, odą sukabinti chirurginėmis kabėmis arba atitinkamai susiūti. Perrišimo taškai schematiškai parodyti 1 pvz., Po operacijos reikėtų taikyti tinkamą analgeziją pagal graužikų gydymo patirties turinčio veterinarijos gydytojo rekomendacijas.

▼M5

Kūno masė

32. Kai taikomas OVX suaugusio gyvūno metodas, kūno masė ir gimdos masė nekoreliuoja, nes gimdos masę veikia hormonai, pavyzdžiui, estrogenai, o ne augimo veiksniai, nuo kurių priklauso kūno dydis. Kai taikomas nesubrendusių gyvūnų modelis, kol gyvūnas bręsta, kūno masė, priešingai, būna susijusi su gimdos mase (34). Taigi, kai taikomas nesubrendusių gyvūnų modelis, naudojamų gyvūnų masės variacija tyrimo pradžioje turi būti kuo mažesnė ir neviršyti ± 20 % vidutinės masės. Tai reiškia, kad veisėjas turėtų standartizuoti vados dydį ir taip užtikrinti, kad skirtingų motininių gyvūnų palikuonys būtų šeriami maždaug vienodai. Gyvūnus reikėtų suskirstyti į grupes (kontrolinę ir gaunančią dozes) atsitiktine tvarka pagal masę, kad kiekvienos grupės kūno masės vidurkis statistiškai nesiskirtų nuo kitų grupių. Reikėtų stengtis į tą pačią dozes gaunančią grupę, jei įmanoma, neskirti tos pačios vados gyvūnų nepadidinus tyrimui naudojamų vadų skaičiaus.

Dozavimas

33. Norint nustatyti, ar bandomoji cheminė medžiaga gali daryti estrogeninį poveikį *in vivo*, paprastai pakanka dviejų dydžių dozės grupių ir kontrolinės grupės, todėl rūpinantis gyvūnų gerove tokiai struktūrai yra teikiama pirmenybė. Jeigu yra siekiama nubrėžti dozės ir atsako tarpusavio ryšio kreivę arba duomenis ekstrapoliuoti mažesnėms dozėms, reikalingos bent trijų dydžių dozės grupės. Jeigu reikalinga informacija ne tik apie estrogeninį veikimą (pavyzdžiui, reikia įvertinti stiprumą), reikėtų pasirinkti kitokį dozavimo režimą. Kontrolinės grupės gyvūnai turėtų būti laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip ir bandomieji gyvūnai, išskyrus tai, kad jiems neduodama bandomosios cheminės medžiagos. Jei bandomajai cheminei medžiagai duoti yra naudojamas nešiklis, kontrolinė grupė turėtų gauti tokį patį nešiklio kiekį, koks yra duodamas dozes gaunančioms grupėms (arba didžiausią jo kiekį iš duodamo dozes gaunančioms grupėms, kai šis kiekis skirtingose grupėse yra skirtingas).

34. Kai atliekama poveikiu gimdai pagrįsta bioanalizė, reikia parinkti tokias dozes, kad būtų užtikrinta, jog gyvūnas nenugaiš, ir kad praėjus trims dienoms iš eilės nuo cheminės medžiagos davimo pradžios dozę didinant iki maksimalaus 1 000 mg/kg per dieną kiekio gyvūnams dar nepasireikštų reikšmingas toksiškas poveikis ir jie nepatirtų didelių kančių. Visus dozės dydžius reikėtų siūlyti ir pasirinkti atsižvelgiant į jau turimus bandomosios cheminės medžiagos ar jai gimininių medžiagų toksiškumo ir (toksiko)kinetinius duomenis. Pasirenkant didžiausią dozę pirmiausia reikėtų atsižvelgti į LD50 ir (arba) ūmaus toksiškumo informaciją, kad būtų išvengta gyvūnų mirties, didelio skausmo arba kančių (24) (25) (26). Didžiausia dozė turėtų atitikti maksimalią toleruojamą dozę (MTD); tyrimas, atliktas su tokio dydžio doze, kurią duodant pasireiškė teigiamas poveikį gimdai turintis atsakas, taip pat būtų tinkamas. Atrankos tikslais dideli intervalai (pvz., po pusę log vieneto, o tai atitinka dozės progresiją 3,2, arba net po vieną log vienetą) tarp dozių dažniausiai būna priimtini. Jeigu tinkamų duomenų dozėms nustatyti nėra, galima atlikti dozės dydžio intervalo nustatymo tyrimą, kuris padėtų nustatyti, kokias dozes naudoti.

35. Kitu atveju, jeigu agonisto estrogeninio poveikio stiprumą galima įvertinti pagal *in vitro* (arba *in silico*) duomenis, pasirenkant dozę į juos taip pat galima atsižvelgti. Pavyzdžiui, bandomosios cheminės medžiagos kiekis, kuris sukeltų tokį patį poveikį gimdai turintį atsaką kaip etaloninis agonistas (etinilestradiolis), yra įvertinamas pagal jo santykinį *in vitro* poveikio stiprumą, palyginti su etinilestradioliu. Didžiausia bandomoji dozė būtų apskaičiuota padauginus šį dozės ekvivalentą iš atitinkamo koeficiento, pvz., 10 arba 100.

▼M5

Dozės dydžio intervalo nustatymas

36. Jeigu reikia, iš pradžių galima atlikti dozės dydžio intervalo nustatymo tyrimą su keliais gyvūnais. Šiuo tikslu toksiškumo gyvūnams arba kančių klinikiniams požymiams apibūdinti galima remtis EBPO Rekomendaciniu dokumentu Nr. 19 (25). Jeigu pagal šį dozės dydžio intervalo nustatymo tyrimą tai yra įmanoma, po trijų dozės davimo dienų, praėjus 24 valandoms po paskutinės dozės davimo, gimdą galima išpjauti ir pasverti. Šiais duomenimis paskui galima pasinaudoti pagrindiniame tyrime (pasirenkant tinkamą maksimalią ir mažesnę dozes, dozių grupių skaičių).

Dozių davimas

37. Bandomoji cheminė medžiaga duodama per virškinamąjį traktą naudojant zondą arba poodinėmis injekcijomis. Pasirenkant davimo būdą reikia atsižvelgti į gyvūnų gerovės, toksikologinius aspektus, pavyzdžiui, artimumą žmonių sąlyčio su chemine medžiaga būdui (pvz., naudojant zondą atkartojamas sąlytis per virškinamąjį traktą, poodinėmis injekcijomis – sąlytis per kvėpavimo takus arba sugertis per odą), fizikines ir (arba) chemines bandomosios medžiagos savybes, ypač į turimą toksikologinę informaciją ir duomenis apie metabolizmą ir kinetiką (t. y. tai, kad reikia vengti pirmojo pasažo metabolizmo, arba tai, kad poveikis būna didesnis, jei duodama tam tikru būdu).

38. Jei yra įmanoma, pirmiausia rekomenduojama naudoti vandeninį tirpalą ir (arba) suspensiją. Bet dauguma estrogenų ligandų arba jų metabolinių prekursorių dažnai būna hidrofobiniai, todėl dažniausiai naudojamas tirpalas ir (arba) aliejinė suspensija (pvz., su kukurūzų, žemės riešutų, sezamo arba alyvuogių aliejumi). Tačiau šių aliejų kaloringumas ir jų sudėtyje esančių riebalų kiekis yra nevienodas, taigi nešiklis gali paveikti bendrą metabolizuojančios energijos (ME) įsisavinimą ir dėl to pakeisti matuojamas vertinamąsias baigtis, pavyzdžiui, gimdos masę, ypač kai taikomas nesubrendusių gyvūnų metodas (33). Taigi prieš atliekant tyrimą visus ketinamus naudoti nešiklius reikėtų išbandyti per kontrolinius bandymus be nešiklio. Bandomąsias chemines medžiagas galima ištirpinti minimaliame kiekyje 95 % etanolio arba kito atitinkamo tirpiklio ir atskiesti iki darbinės koncentracijos, esančios bandomajame nešiklyje. Toksiškos tirpiklio savybės turi būti žinomos, jas reikėtų išbandyti atskiroje kontrolinėje grupėje, kurioje naudojamas tik tirpiklis. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga yra laikoma stabilia, tam, kad ji lengviau tirptų, galima ją lengvai pakaitinti, greitai mechaniškai pamaišyti. Reikėtų nustatyti bandomosios cheminės medžiagos stabilumą nešiklyje. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga per visą tyrimą išlieka stabili, galima parengti vieną pradinę alikvotinę bandomosios cheminės medžiagos dalį ir kasdien ją skiesti nustatytomis dozėmis.

39. Dozavimo trukmė priklausys nuo taikomo modelio (26 punkte aptartas nesubrendusių gyvūnų modelis, 30 punkte – OVX suaugusių gyvūnų modelis). Nesubrendusioms žiurkių patelėms bandomosios cheminės medžiagos dozės duodamos kasdien tris dienas iš eilės. Dozes duoti tris dienas rekomenduojama ir žiurkių patelėms, kurioms atlikta ovariektomija, bet ilgesnis dozių davimas yra galimas ir gali pagerinti silpnų cheminių medžiagų nustatymo rezultatus. Jei naudojamos pelių patelės, kurioms atlikta ovariektomija, turėtų pakakti dozes duoti tris dienas; kai naudojami stiprūs estrogenų agonistai, šio laikotarpio pratęsimas iki septynių dienų pastebimai didesnės naudos neduoda, tačiau per tinkamumo patvirtinimo tyrimą (16) toks ryšys su silpnais estrogenais nenustatytas, taigi suaugusioms pelėms, kurioms atlikta ovariektomija, dozių davimo laikotarpį galima pratęsti iki 7 dienų iš eilės. Dozė turėtų būti duodama kiekvieną dieną panašiu laiku. Prireikus dozes reikėtų tikslinti, kad būtų išlaikytas pastovus dozės dydis pagal santykį su gyvūno kūno mase (pvz., bandomosios cheminės medžiagos miligramai vienam kūno masės kilogramui per dieną). Kalbant apie bandomosios medžiagos kiekį, reikėtų užtikrinti, kad pagal santykį su kūno mase jis kuo mažiau keistųsi, – tikslinti dozės tirpalo koncentraciją taip, kad visais dozės lygmenimis ir naudojant visus dozės davimo būdus būtų užtikrintas pastovus bandomosios cheminės medžiagos kiekis pagal santykį su kūno mase.

▼M5

40. Kai bandomoji cheminė medžiaga duodama per zondą, gyvūnams per vieną dieną turėtų būti duodama tik viena dozė naudojant skrandžio zondą arba tinkamą intubacinį vamzdelį. Didžiausias gyvūnui vienu metu duodamo skysčio kiekis priklauso nuo bandomojo gyvūno dydžio. Reikėtų laikytis vietos gyvūnų priežiūros taisyklių, tačiau šis kiekis neturėtų būti didesnis kaip 5 ml/kg kūno masės, išskyrus vandeninius tirpalus, kurių galima duoti po 10 ml/kg kūno masės.

41. Kai bandomoji cheminė medžiaga duodama poodinėmis injekcijomis, jos turėtų būti suleidžiamos viena paros doze. Dozės turėtų būti leidžiamos mentikaulio arba strėnų srityje sterilia adata (pvz., 23 arba 25 dydžio) ir tuberkulino švirkštu. Injekcijos vietos nuskusti nebūtina. Jei dozė praran-dama, injekcijos vietoje prateka arba suduodama ne visa, tai reikėtų užrašyti. Vienai žiurkei per parą reikėtų suleisti ne daugiau kaip 5 ml/kg kūno masės injekcijos, injekciją padalijus ir suleidus dviejose vietose, išskyrus tuos atvejus, kai naudojami vandeniniai tirpalai ir galima leisti 10 ml/kg kūno masės injekcijas.

Stebėjimai

Bendri ir klinikiniai stebėjimai

42. Bendrus klinikinius stebėjimus reikėtų atlikti bent kartą per dieną ir dažniau, jei pastebima toksiškumo požymių. Stebėjimus geriausia atlikti tuo pačiu metu, kiekvieną dieną, atsižvelgiant į didžiausio laukiamo poveikio po dozės davimo laiką. Reikėtų visus gyvūnus tikrinti, ar nenugaišo, ar negaišta, vertinti bendrus klinikinius požymius, pavyzdžiui, elgsenos, odos, kailio, akių, gleivinės pakitimus, sekreto ir ekskrecijų dažnį, autonominį aktyvumą (pvz., ašarojimą, plaukų pašiaušimą, vyzdžio dydį, neįprastą kvėpavimą).

Kūno masė ir pašaro suvartojimas

43. Visus gyvūnus reikėtų kasdien pasverti 0,1 g tikslumu, pradedant sverti prieš pat tyrimo pradžią, t. y. kai gyvūnai suskirstomi į grupes. Kitas būdas – galima matuoti per tyrimą kiekvieno narvelio gyvūnų suvartojamo pašaro kiekį sveriant šėrimo įrenginį. Pašaro suvartojimo rezultatus reikėtų išreikšti gramais vienai žiurkei per dieną.

Skrodimas ir gimdos masės matavimas

44. Praėjus dvidešimt keturioms valandoms po paskutinės dozės davimo žiurkės humaniškai numarinamos. Idealiu atveju nekroskopija atliekama gyvūnus imant atsitiktine tvarka iš įvairių grupių, siekiant išvengti tiesioginės didė-jančios ar mažėjančios progresijos kurioje nors dozės grupėje, nes tai galėtų šiek tiek paveikti duomenis. Bioanalizės tikslas – išmatuoti ir dar drėgnos gimdos, ir nusausintos gimdos masę. Dar drėgno organo masę sudaro gimda ir luminalinis skystis. Nusausinto organo masė matuojama iš gimdos nuspaudus ir pašalinus luminalinį turinį.

45. Jei skrodžiami nesubrendę gyvūnai, prieš skrodimą apžiūrima, kokia yra makšties atsivėrimo būklė. Skrodimas pradedamas atveriant pilvo sienelę nuo gaktos simfizio. Paskui nuo dorsalinės pilvo sienelės atskiriami gimdos ragai ir kiaušidės, jei jos yra. Nuo ventralinės ir lateralinės gimdos ir makš-ties pusės atskiriama šlapimo pūslė ir šlapimtakiai. Skaidulinės sąaugos tarp tiesiosios žarnos ir makšties yra atskiriamos, kol bus matoma makšties angos susijungimo su tarpvietės oda vieta. Gimda ir makštis atskiriamos nuo kūno įpjaunant makšties sienelę iš karto virš susijungimo su tarpvietės oda vietos, kaip parodyta 2 pvz., Gimdą reikėtų atskirti nuo kūno sienelės atsargiai nupjaunant gimdos pasaitus jų prisijungimo taškuose per visą kiekvieno

▼M5

gimdos rago dorsolateralinį ilgį. Išimtą iš kūno gimdą reikėtų pakankamai greitai sutvarkyti, kad audiniai neišdžiūtų. Masės praradimas dėl išdžiuvimo tampa dar svarbesnis, kai dirbama su smulkiais audiniais, tokiais kaip gimdos (23). Jeigu yra kiaušidės, jos atskiriamos prie kiaušintakių stengiantis, kad iš gimdos rago neištekėtų luminalinis skystis. Jeigu gyvūnui buvo atlikta ovariektomija, reikėtų patikrinti, ar kiaušidžių pašalinimo vietoje nėra kiaušidžių audinio likučių. Nupjaunamas perteklinis riebalinis sluoksnis ir jungiamieji audiniai. Makštis išpjaunama iš gimdos po gimdos kakleliu taip, kad gimdos kaklelis liktų prie gimdos kūno, kaip parodyta 2 pav.

46. Kiekvieną gimdą reikėtų įdėti į unikalia žyma pažymėtą ir pasvertą indą (pvz., petri lėkštelę arba plastikinę svėrimo vonelę) ir toliau stengiantis, kad iki svėrimo audiniai neišdžiūtų (pvz., į indą galima padėti fiziologiniu skysčiu šiek tiek sudrėkintą filtravimo popierių). Gimda su liminaliniu skysčiu sveriama 0,1 mg tikslumu (dar drėgnos gimdos masė).

47. Kiekviena gimda paskui ruošiama atskirai – pašalinamas luminalinis skystis. Abu gimdos ragai praduriami arba perpjaunami išilgai. Gimda padedama ant šiek tiek sudrėkinto filtravimo popieriaus (pvz., vatmano Nr. 3) ir lengviau prispaudžiama antru šiek tiek sudrėkintu filtravimo popieriaus lakštu, kad luminalinis skystis visiškai pasišalintų. Gimda be luminalinio skysčio pasveriama 0,1 mg tikslumu (nusausintos gimdos masė).

48. Gimdos masės duomenis tyrimo pabaigoje galima panaudoti užtikrinimui, kad nebūtų viršytas atitinkamas nesubrendusių ir neporuotų žiurkių amžius, bet šiuo aspektu lemiamą reikšmę turi ankstesni duomenys apie laboratorijos naudojamą žiurkių veislę (dėl rezultatų aiškinimo žr. 56 punktą).

Neprivalomi tyrimai

49. Pasvertą gimdą galima dėti į 10 % neutralų buferinį formaliną, kad vėliau nudažius hematoksilino ir eozino (HE) dažais būtų galima atlikti histopatologinius tyrimus. Makštį galima atitinkamai tirti (žr. 9 punktą). Kiekybinių palyginimų tikslais dar galima atlikti morfometrinius endometrinio epitelio matavimus.

DUOMENYS IR ATASKAITA

Duomenys

50. Tyrimo duomenis turėtų sudaryti šį informacija:

— gyvūnų skaičius analizės pradžioje;

— gyvūnų, kurie atliekant analizę nugaišo arba dėl humaniškų priežasčių buvo numarinti, skaičius, identifikavimo duomenys, nugaišimo arba humaniško numarinimo data ir laikas;

— gyvūnų, kuriems pasireiškė toksiškas poveikis, skaičius, identifikavimo duomenys ir pastebėtų toksiškumo požymių apibūdinimas, įskaitant duomenis apie kiekvieno toksiškumo požymio pasireiškimo pradžią, trukmę, stiprumą; ir

— gyvūnų, kuriems pasireiškė kokio nors pobūdžio pažeidimai, skaičius, identifikavimo duomenys ir pažeidimo apibūdinimas.

▼M5

51. Reikėtų užrašyti kiekvieno gyvūno kūno masę, dar drėgnos gimdos ir nusausintos gimdos masę. Norint nustatyti, ar bandomosios cheminės medžiagos vartojimas sukėlė statistiškai reikšmingą ($p < 0,05$) gimdos masės didėjimą, reikėtų taikyti vienpusę statistinę agonistų analizę. Reikėtų atlikti atitinkamą statistinę analizę ir nustatyti, kokių su dozių vartojimu susijusių pokyčių įvyko, vertinant dar drėgnos ir nusausintos gimdos masę. Pavyzdžiui, duomenis galima vertinti taikant kovariacinės analizės (ANCOVA) metodą, nes kūno masė nekroskopijos metu yra kovarijuojantis dydis. Prieš analizuojant duomenis galima atlikti gimdos duomenų variacijas stabilizuojančią logaritminę transformaciją. Kiekvienos dozės grupės ir nešiklio kontrolinės grupės duomenų poroms prasmingai palyginti ir patikimumo intervalams apskaičiuoti galima taikyti Dunett ir Hsu metodą. Galimoms išskirtims nustatyti ir variacijų homogeniškumui įvertinti galima naudoti stjudentizuotas netikčių diagramas. Šios procedūros buvo taikomos EBPO tinkamumo patvirtinimo programoje, statistinės analizės sistemoje buvo naudojama PROC GLM procedūra (SAS Institute, Cary, NC) (8 versija) (6) (7).

52. Gautinėje ataskaitoje pateikiama ši informacija:

Bandymą atliekanti įstaiga:

— atsakingi darbuotojai ir jų pareigos atliekant tyrimą;

— bazinio teigiamo kontrolinio bandymo duomenys ir periodinės teigiamos kontrolės duomenys (žr. 26 ir 27 punktus).

Bandomoji cheminė medžiaga:

— bandomųjų cheminių medžiagų apibūdinimas;

— fizikinė būsena ir, jei reikia, fizikinės ir cheminės savybės;

— skiedimo metodas ir periodiškumas;

— visi surinkti duomenys apie stabilumą;

— visų dozavimo sprendimų analizė.

Nešiklis:

— bandomojo nešiklio apibūdinimas (pobūdis, tiekėjas ir partija);

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas (jei nešiklis ne vanduo).

Bandomieji gyvūnai:

— rūšis, veislė ir jų pasirinkimo pagrindimas;

— tiekėjas ir konkreti tiekėjo įranga;

— amžius pristačius ir atsivedimo data;

— jei gyvūnai yra nesubrendę, – ar pristatyti kartu su motinine arba kita žindančia patele ir nujunkymo data;

— gyvūnų aklimatizacijos procedūros duomenys;

— viename narvelyje laikomų gyvūnų skaičius;

— kiekvieno gyvūno ir gyvūnų grupės identifikavimo duomenys ir ženklinimo metodas.

Analizės sąlygos:

— duomenys apie atsitiktinės atrankos eigą (t. y. taikytas metodas);

— pagrindinė priežastis, nulėmusi dozės dydžio pasirinkimą;

▼M5

— duomenys apie bandomosios cheminės medžiagos sudėtį, gautą koncentraciją, stabilumą ir vienalytiškumą;

— išsamūs duomenys apie tai, kaip bandomoji cheminė medžiaga duodama, ir pagrindinė priežastis, nulėmusi davimo būdo pasirinkimą;

— pašarai (pavadinimas, rūšis, tiekėjas, sudėtis ir, jei žinoma, fitoestrogenų kiekis);

— vandens šaltinis (pvz., vandentiekio ar filtruotas vanduo) ir tiekimas (vamzdeliais iš didelio konteinerio, buteliais ir t. t.);

— kraikas (pavadinimas, rūšis, tiekėjas, sudėtis);

— duomenys apie laikymo narvelyje sąlygas, apšvietimo intervalus, patalpos temperatūrą ir drėgmę, patalpos valymą;

— išsamus nekroskopijos ir gimdos svėrimo procedūrų aprašas;

— statistinių procedūrų aprašas.

Rezultatai

Apie kiekvieną gyvūną:

— visi kasdieniai kiekvieno gyvūno kūno masės rodikliai (nuo suskirstymo į grupes iki nekroskopijos (0,1 g tikslumu);

— kiekvieno gyvūno amžius (dienomis, skaičiuojant nuo atsivedimo dienos, kuri laikoma 0 diena), kada pradedama duoti bandomosios cheminės medžiagos;

— kiekvienos dozės davimo data ir laikas;

— apskaičiuotas kiekis ir duodama dozė, pastabos, ar duodant arba po davimo dozė nebuvo prarasta;

— kasdienis gyvūno būsenos registravimas, įskaitant svarbius simptomus ir pastebėtus dalykus;

— įtariama nugaišimo priežastis (jeigu per tyrimą gyvūnas randamas gaištantis arba nugaišęs);

— humaniško numarinimo data ir laikas ir laiko intervalas nuo paskutinės dozės davimo;

— dar drėgnos gimdos masė (0,1 mg tikslumu) ir pastabos dėl luminalinio skysčio praradimo per skrodimą ir paruošimą sverti;

— nusausintos gimdos masė (0,1 mg tikslumu).

Apie kiekvieną gyvūnų grupę:

— dienos kūno masės vidurkis (0,1 g tikslumu) ir standartiniai nuokrypiai (nuo suskirstymo į grupes iki nekroskopijos);

— dar drėgnos gimdos masės vidurkis ir nusausintos gimdos masės vidurkis (0,1 mg tikslumu) bei standartiniai nuokrypiai;

— pašaro suvartojimas per dieną, jei matuojama (skaičiuojamas vieno gyvūno suvartoto pašaro kiekis gramais);

▼M5

— statistinės analizės rezultatai lyginant dozes gaunančių grupių gyvūnų dar drėgnos ir nusausintos gimdos masės rodiklius su tais pačiais nešiklio kontrolinių grupių gyvūnų rodikliais;

— statistinės analizės rezultatai lyginant dozes gaunančių grupių gyvūnų kūno masę ir kūno masės prieaugį su tais pačiais nešiklio kontrolinių grupių gyvūnų rodikliais.

53. Svarbių pagal bandymų metodą rekomenduojamų aspektų santrauka

	Žiurkės	**Pelės**
Gyvūnai		
Veislė	Dažniausiai naudojama laboratorinių graužikų veislė	
Gyvūnų skaičius	Ne mažiau kaip po 6 gyvūnus vienoje dozės grupėje	
Grupių skaičius	Ne mažiau kaip 2 bandymo grupės (paaiškinimai pateikti 33 punkte) ir neigiamos kontrolės grupė Paaiškinimai dėl teigiamos kontrolės grupių pateikti 26 ir 27 punktuose	
Laikymo ir šėrimo sąlygos		
Gyvūnų patalpos temperatūra	22 °C ± 3 °C	
Santykinė drėgmė	50–60 %, ne mažesnė kaip 30 % ir ne didesnė kaip 70 %	
Apšvietimo seka per parą	12 h šviesos, 12 h tamsos	
Pašaras ir geriamasis vanduo	Ad libitum	
Laikymas	Atskirai arba grupėmis ne daugiau kaip po tris gyvūnus (nesubrendusius gyvūnus rekomenduojama laikyti socialinėmis grupėmis)	
Pašaras ir kraikas	Rekomenduojama užtikrinti, kad naudojamuose pašaruose ir kraike būtų mažai fitoestrogenų	
Protokolas		
Metodas	Metodas, kai naudojamos nesubrendusios patelės, kurioms neatlikta evariektomija (šiam metodui teikiama pirmenybė) Metodas, kai naudojamos suaugusios patelės, kurioms atlikta ovariektomija	Metodas, kai naudojamos suaugusios patelės, kurioms atlikta ovariektomija
Nesubrendusių gyvūnų amžius, nuo kurio pradedama duoti dozes	Ne anksčiau kaip 18 PND. Dozes reikėtų baigti duoti iki 25 PND	Šiam bandymų metodui neaktualu
Amžius, kada atliekama ovariektmija	6–8 amžiaus savaitę	
Gyvūnų, kuriems atlikta ovariektomija, amžius, nuo kurio pradedama duoti dozes	Nuo ovariektomijos iki pirmos dozės davimo turi praeiti ne mažiau kaip 14 dienų	Nuo ovariektomijos iki pirmos dozės davimo turi praeiti ne mažiau kaip 7 dienos
Kūno masė	Kūno masės variacija turėtų būti minimali, ne didesnė kaip ± 20 % vidutinės masės	

▼M5

	Žiurkės	Pelės
Dozavimas		
Davimo būdas	Per virškinamąjį traką naudojant zondą arba poodinės injekcijos	
Davimo periodiškumas	Viena dozė per dieną	
Kiekis duodant per zondą ir su injekcija	≤ 5ml/kg kūno masės (arba iki 10 ml/kg kūno masės, kai duodami vandeniniai tirpalai) (jei daromos injekcijos, 2 injekcijos vietos)	
Davimo trukmė	3 dienos iš eilės, kai taikomas nesubrendusių gyvūnų modelis Ne trumpiau kaip 3 dienos iš eilės, kai taikomas OVX gyvūnų modelis	7 dienos iš eilės, kai taikomas OVX gyvūnų modelis
Nekroskopijos laikas	Praėjus apie 24 h nuo paskutinės dozės	
Rezultatai		
Teigiamas atsakas	Statistiškai reikšmingas gimdos (dar drėgnos ir (arba) nusausintos) masės vidurkio paadidėjimas	
Etaloninis estrogenas	17α-etinilestradiolis	

REKOMENDACIJOS DĖL REZULTATŲ AIŠKINIMO IR PRIĖMIMO

54. Apskritai estrogeninio poveikio bandymą reikėtų laikyti teigiamu, jeigu gimdos masės padidėjimas yra statistiškai reikšmingas ($p< 0,05$) bent jau didelės dozės lygmeniu, palyginti su tirpalo kontroline grupe. Teigiamas rezultatas dar patvirtinamas pademonstruojant biologiškai galimą ryšį tarp dozės ir atsako stiprumo, turint omenyje, kad vienu metu pasireiškiantis estrogneninis ir antiestrogeninis bandomosios cheminės medžiagos poveikis gali turėti įtakos reakcijos į dozę kreivės formai.

55. Kad gautus duomenis būtų galima prasmingai aiškinti, reikėtų stengtis neviršyti maksimalios toleruojamos dozės. Kūnos masės sumažėjimą, klinikinius požymius ir kitus gautus duomenis reikėtų šiuo požiūriu kruopščiai įvertinti.

56. Svarbus poveikiu gimdai pagrįstos bioanalizės duomenų priėmimo kriterijus yra nešiklio kontrolinės grupės gyvūnų gimdos masė. Didelės kontrolinės vertės gali kelti abejonių dėl bioanalizės jautrumo ir gebėjimo nustatyti labai silpnus estrogenų agonistus. Peržvelgus literatūros šaltinius ir duomenis, gautus tvirtinant poveikiu gimdai pagrįstos bioanalizės tinkamumą, matyti, kad dideli kontrolinių verčių vidurkiai tikrai atsiranda spontaniškai, ypač kai naudojami nesubrendę gyvūnai (2) (3) (6) (9). Nesubrendusių žiurkių gimdos masė priklauso nuo daugelio kintamųjų, pavyzdžiui, veislės arba kūno masės, galutinės aukščiausios gimdos masės ribos nurodyti neįmanoma. Pavyzdžiui, jeigu kontrolinės grupės nesubrendusių žiurkių nusausintos gimdos masė yra 40–45 mg, rezultatus reikėtų vertinti kaip įtartinus, o jei gimdos masė yra didesnė negu 45 mg, bandymą gali tekti pakartoti. Tačiau tai kiekvienu atveju reikia vertinti atskirai (3) (6) (8). Kai bandymai atliekami su suaugusiomis žiurkėmis, ne iki galo atlikus ovariektomiją paliekama kiaušidžių audinio, kuris gali gaminti endogeninius estrogenus ir stabdyti gimdos masės regresiją.

▼M5

57. Jeigu nešiklio kontrolinės grupės gyvūnų nusausintos gimdos masė sudaro: nesubrendusių žiurkių patelių – mažiau negu 0,09 % kūno masės, jaunų suaugusių patelių, kurioms atlikta ovariektomija, – 0,04 % [žr. 31 lentelę (2)], tada tikėtina, kad rezultatai yra priimtini. Jeigu kontrolinės gimdos masės vertės yra didesnės už šias reikšmes, reikėtų nuodugniai patikrinti įvairius veiksnius, tarp jų – gyvūnų amžių, ar tinkamai atlikta ovariektomija, fitoestrogenų kiekį pašaruose ir t. t.; neigiamus tyrimo rezultatus (estrogeninio veikimo požymių nenustatoma) reikėtų vertinti labai atsargiai.

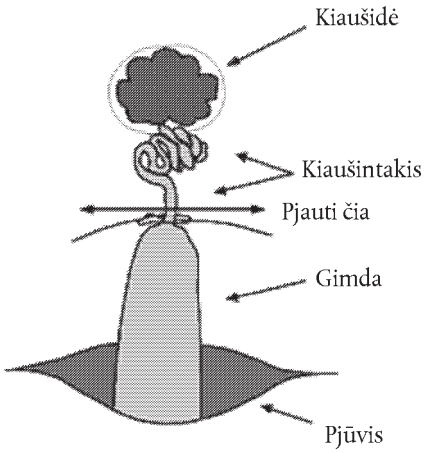
58. Anksčiau surinktus nešiklio kontrolinių grupių duomenis reikėtų saugoti laboratorijoje. Anksčiau surinktus duomenis apie atsaką į teigiamus etalonius estrogenus, pavyzdžiui, 17a-etinilestradiolį, taip pat reikėtų saugoti laboratorijoje. Laboratorijos taip pat gali išbandyti atsaką į žinomus silpnus estrogenų agonistus. Visus šiuos duomenis galima palyginti su turimais duomenimis (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8), kad būtų užtikrinta, jog pagal laboratorijos metodus atliekami tyrimai yra pakankamai jautrūs.

59. Per EBPO tinkamumo patvirtinimo tyrimą nusausintos gimdos masės duomenų variacijos buvo mažesnės, palyginti su dar drėgnos gimdos masės duomenimis (6) (7). Tačiau reikšmingas bet kurio iš šių matų atsakas rodytų, kad bandomoji cheminė medžiaga tikrai daro estrogeninį poveikį.

60. Poveikį gimdai turintis atsakas būna ne vien estrogeninės kilmės, tačiau teigiamus poveikiu gimdai pagrįstos bioanalizės rezultatus paprastai reikėtų aiškinti kaip galimo estrogeninio poveikio *in vivo* įrodymą ir imtis tolesnio aiškinimosi tyrimų (žr. 9 punktą ir EBPO Konceptualią endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo sistemą (2 priedas)).

1 pvz.

Chirurginio kiaušidžių pašalinimo schema



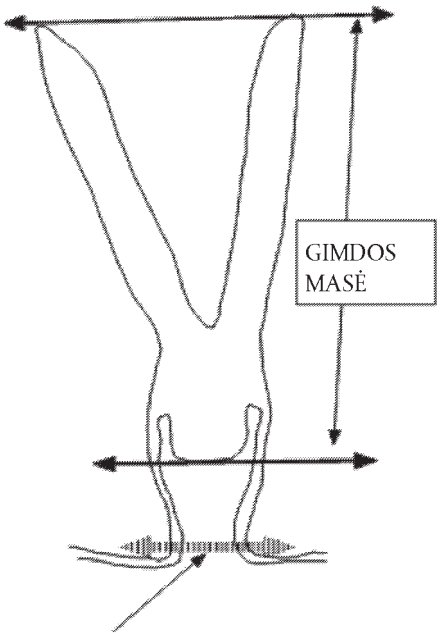
Gimdos pasaitai, kraujagyslės ir riebalinis sluoksnis neparodytas

Procedūra pradedama atveriant dorsolateralinę pilvo sienelę per vidurį tarp šonkaulių krašto ir kryžkaulio, per kelis milimetrus į šoną link lateralinės strėnų raumens ribos. Pilvo ertmėje surandamos kiaušidės. Kiaušidės fiziškai išimamos iš pilvo ertmės ant sterilaus paviršiaus, tarp kiaušidės ir gimdos dedama ligatūra kraujavimui sustabdyti, kiaušidės atskiriamos pjūviu virš ligatūros kiaušintakių ir kiekvieno gimdos rago susijungimo vietose. Įsitikinus, kad nėra didelio kraujavimo, pilvo sienelę reikėtų susiūti, odą sukabinti chirurginėmis kabėmis arba atitinkamai susiūti. Iki naudojimo bandyme reikėtų palaukti bent 14 dienų, kol gyvūnai atsigaus ir gimdos masė regresuos.

▼**M5**

2 pvz.

Gimdos audinių išėmimas ir parengimas masės matavimui



Procedūra pradedama atveriant pilvo sienelę prie gaktos simfizio. Paskui nuo dorsalinės pilvo sienelės atskiriama kiekviena kiaušidė, jei yra, ir gimdos ragai. Nuo pilvinės ir lateralinės gimdos ir makšties pusės atskiriama šlapimo pūslė ir šlapimtakiai. Skaidulinės sąaugos tarp tiesiosios žarnos ir makšties yra atskiriamos taip, kad būtų galima matyti makšties angos ir tarpvietės odos susijungimo vietą. Gimda ir makštis atskiriamos nuo kūno įpjaunant makšties sienelę iš karto virš susijungimo su tarpvietės oda vietos, kaip parodyta 2 pvz., Gimdą reikėtų atskirti nuo kūno sienelės atsargiai nupjaunant gimdos pasaitus jų prisijungimo taškuose per visą kiekvieno gimdos rago dorsolateralinį ilgį. Išėmus iš kūno nupjaunami perteklinis riebalinis sluoksnis ir jungiamasis audinys. Jeigu kiaušidės yra, jos atskiriamos prie kiaušintakių, stengiantis, kad iš gimdos rago neištekėtų luminalinis skystis. Jeigu gyvūnui buvo atlikta ovariektomija, reikėtų patikrinti, ar kiaušidžių pašalinimo vietoje nėra kiaušidžių audinio likučių. Makštis atskiriama nuo gimdos po gimdos kakleliu, kad gimdos kaklelis liktų prie gimdos kūno, kaip parodyta 2 pvz., Paskui gimdą galima pasverti.

▼M5

1 priedėlis

SĄVOKOS

Antiestrogeninis poveikis tai cheminės medžiagos savybė stabdyti 17ß estradiolio veikimą žinduolių organizme.

Cheminė medžiaga tai medžiaga arba mišinys.

Atsivedimo data yra 0 postnatalinė diena.

Dozavimas bendras terminas, apimantis dozės dydį, jos dažnį ir dozės davimo trukmę.

Dozė duodamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis. Atliekant poveikiu gimdai pagrįstą bioanalizę dozė išreiškiama bandomosios cheminės medžiagos mase bandomojo gyvūno masės vienetui per dieną (pvz., mg/kg kūno masės/per dieną).

Maksimali toleruojama dozė (MTD) didžiausias cheminės medžiagos kiekis, kuriam patekus į bandomųjų gyvūnų organizmą gyvūnai nenugaišta (žymima LD_0) (IUPAC, 1993).

Estrogeninis poveikis tai cheminės medžiagos savybė žinduolių organizmą veikti kaip 17ß estradiolis.

X postnatalinė diena X-oji diena nuo atsivedimo.

Jautrumas visų teigiamų/veiklių cheminių medžiagų, kurios yra teisingai suklasifikuojamos pagal bandymo rezultatus, dalis. Tai bandymų metodo, kurį taikant gaunami kategoriški rezultatai, tikslumo matas, kuris yra svarbus kriterijus vertinant bandymų metodo tinkamumą.

Specifiškumas visų neigiamų/neveiklių cheminių medžiagų, kurios yra teisingai suklasifikuojamos pagal bandymo rezultatus, dalis. Tai bandymų metodo, kurį taikant gaunami kategoriški rezultatai, tikslumo matas, kuris yra svarbus kriterijus vertinant bandymų metodo tinkamumą.

Bandomoji cheminė medžiaga bet kuri pagal šį bandymų metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Turintis poveikį gimdai sąvoka vartojama teigiamam poveikiui gimdos audinių augimui apibūdinti.

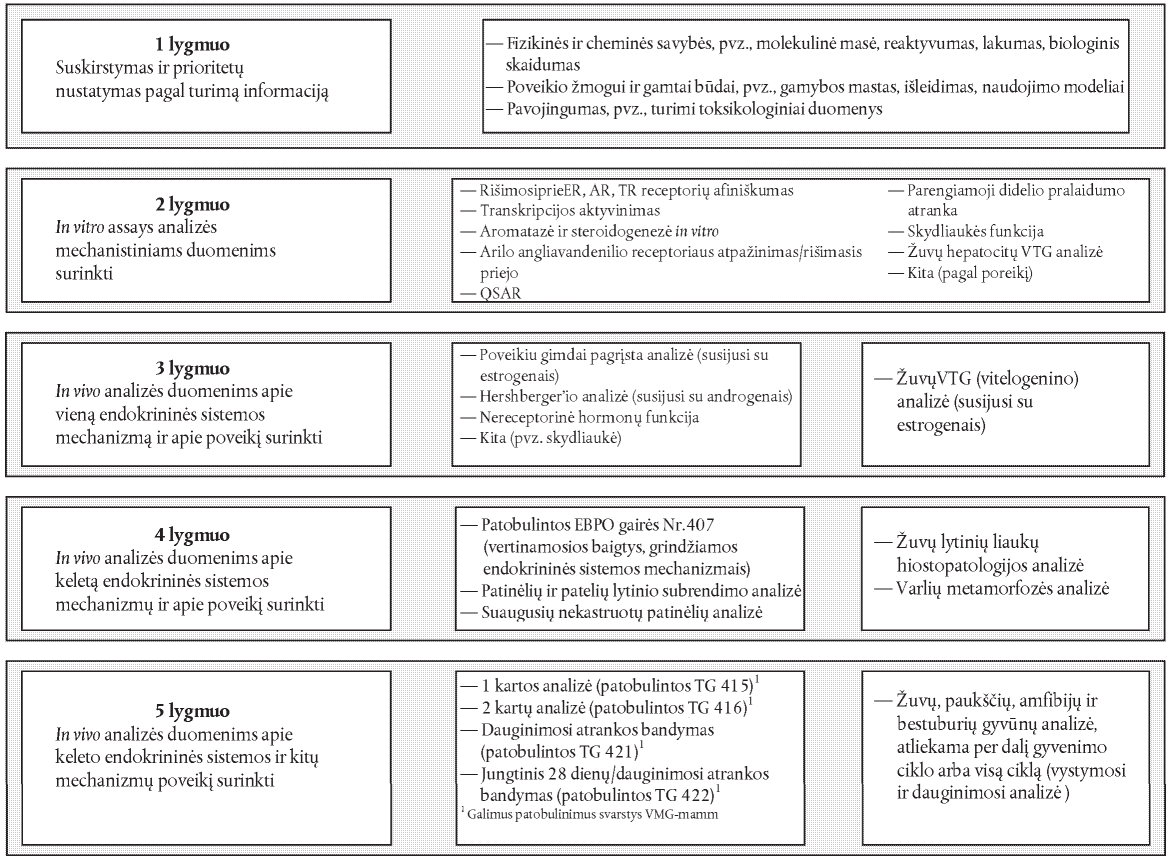
Tinkamumo patvirtinimas mokslinis procesas, kurio paskirtis – aprašyti darbo reikalavimus ir bandymų metodo apribojimus siekiant parodyti metodo patikimumą ir tinkamumą konkrečiam tikslui.

▼M5

2 priedėlis

Pastaba. Šį dokumentą parengė Bandymų gairių programos sekretoriatas pagal 6-ajame EDTA darbo grupės posėdyje sudarytą susitarimą

EBPO konceptuali endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo sistema



VMG-mamm: Bandymų su žinduoliais ir žinduolių vertinimo tinkamumo patvirtinimo valdymo grupė (angl. *Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment*)

▼**M5**

PASTABOS DĖL KONCEPTUALIOS SISTEMOS

1 pastaba. Prisijungti prie tyrimo ir pasitraukti iš tyrimo galima visais lygmenimis; tai priklauso nuo esamų informacijos poreikių pavojingumo ir rizikos vertinimo tikslais.

2 pastaba. 5 lygmeniu ekotoksikologija turėtų apimti vertinamąsias baigtis, kuriomis žymimi žalingo poveikio mechanizmai ir galima žala populiacijai.

3 pastaba. Kai daugialypis modelis apima keleto atskirų vertinamųjų baigčių tyrimą, tas modelis būtų taikomas vietoj pavienių vertinamųjų baigčių analizės.

4 pastaba. Kiekviena cheminė medžiaga turėtų būti vertinama kiekvienu atveju atskirai, atsižvelgiant į visą turimą informaciją ir konceptualios sistemos lygmenis.

5 pastaba. Kol kas šis planas apima ne viską. 3, 4 ir 5 lygmenyse jis apima analizę, kurią vykdyti jau galima arba kurios tinkamumas dar tvirtinamas. Antrosios grupės analizė įtraukta preliminariai. Kai ji bus išplėtota ir patvirtinta, ja planas bus oficialiai papildytas.

6 pastaba. Nereikėtų suprasti, kad 5 lygmuo apima tik baigiamuosius bandymus. Šiuo lygmeniu įtraukiami bandymai laikomi padedančiais įvertinti bendrą pavojingumą ir riziką.

▼M5

LITERATŪROS ŠALTINIAI

(1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10^{th}-11^{th} March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and SAFEty Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.

(3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445–520.

(4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay – Phase 1. OECD Environmental Health and SAFEty Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/-MONO(2006)33.

(5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785–94.

(6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 – Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and SAFEty Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.

(7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Dose Response Studies. Environ. Health Persp.111:1530–1549.

(8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp.111:1550–1558.

(9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559–1567.

(10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [I^{125}]iododeoxyuridine. *Endocrinology* 113:582–587.

(11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17b-estradiol. *Endocrinology* 117:2229–2237.

(12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. *SÖFW-J.* 127:10–15.

(13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science118:650–651.

(14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. Fd. *Cosmet. Toxicol.* 13:425–427.

(15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. *Environ. Health Perspec.* 106:369–373.

▼M5

(16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and SAFEty Publication Series on Testing and Assessment No. 67.

(17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. Toxicol. Lett. 128:145–157.

(18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. Food Chem. Toxicol. 41:1517–1525.

(19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. Arch. Toxicol. 76:613–620.

(20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. Comp. Med. 53:477–485.

(21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. *J. Appl. Toxicol.* 20:343–347.

(22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. Cancer Detect. Prev. 26:381–393.

(23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. Lab. Anim. Sci.37:596–601.

(24) OECD (2008). Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

(25) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. J. Physiol. 85: 320–333.

(28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. Endocrinology 19: 33–41.

(29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. Fundam. Appl. Toxicol. 34: 288–305.

(30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. Fertil. Steril. 24: 284–291.

(31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development – Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92–64–12367–9, Paris.

(32) Dorfman R.I. (1962). Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.

(33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. ILAR J 45(4): 401–416.

▼**M5**

(34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. Toxicol Ind Health. 14 (1–2): 159–184.

(35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. Science 131:1807–1808.

(36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. J. Agric Food Chem. 52, 1410–1414.

(37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.

(38) 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos. OL L 276, 2010 10 20, p. 33).

▼M5

B.55. ŽIURKIŲ *HERSHBERGER* BIOANALIZĖ: TRUMPALAIKĖ (ANTI)ANDROGENINIŲ SAVYBIŲ ATRANKOS ANALIZĖ

ĮVADAS

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO Bandymų gaires (angl. OECD *Test Guideline* (TG)) Nr. 441 (2009). 1998 m. EBPO iniciatyva pradėtas didelės svarbos darbas – peržiūrėti esamas gaires ir parengti naujas endokrininę sistemą galimai ardančių medžiagų atrankos ir bandymų gaires. Viena iš šio darbo dalių – parengti žiurkių *Hershberger* bioanalizės gaires. Ši analizė farmacijos pramonėje taikoma jau keletą dešimtmečių, o oficialaus ekspertų komiteto pirmą kartą buvo standartizuota 1962 m. kaip androgeninių cheminių medžiagų atrankos priemonė (2). 2001–2007 m. įvykdyta plati žiurkių *Hershberger* bioanalizės tinkamumo patvirtinimo programa, per kurią parengtas aiškinamosios informacijos dokumentas (23), išsamios informacijos apie metodus rinkinys (3), skrodimo vadovas (21), atlikti platūs tyrimai vienoje laboratorijoje ir skirtingose laboratorijose, kuriais siekta įrodyti bioanalizės patikimumą ir atkuriamumą. Šie tinkamumo patvirtinimo tyrimai buvo atlikti su stipriu etaloniniu androgenu (testosterono propionatu (TP)), dviem stipriais sintetiniais androgenais (trenbolono acetatu ir metiltestosteronu), stipriu antiandrogeniniu vaistu (flutamidu), stipriu natūralaus androgeno (dihidrotestosterono – DHT) sintezės inhibitoriumi (finasteridu), keliais silpnais antiandrogeniniais pesticidais (linuronu, vinklozolinu, procimidonu, p,p' DDE), stipriu 5α reduktazės inhibitoriumi (finasteridu) ir dviem žinomomis neigiamomis cheminėmis medžiagomis (dinitrofenoliu ir nonilfenoliu) (4) (5) (6) (7) (8). Šis bandymų metodas yra paremtas ilgamete ankstesnio bioanalizės taikymo patirtimi, patirtimi, įgyta įgyvendinant bandymo tinkamumo patvirtinimo programą, taip pat ją įgyvendinant gautais rezultatais.

2. *Hershberger* bioanalizė yra trumpalaikis *in vivo* atrankos bandymas, kuriame naudojami pagalbiniai patinėlių dauginimosi sistemos audiniai. Analizė sukurta 4-ajame dešimtmetyje, 5-ajame dešimtmetyje ji buvo pakeista – į ją įtraukti į androgenus reaguojantys patinėlių dauginimosi sistemos raumenys (2) (9–15). 7-ajame dešimtmetyje remiantis standartizuota protokolo versija (2) (14) buvo įvertinta daugiau kaip 700 galimų androgenų; 7-ajame dešimtmetyje ši analizė buvo laikoma standartiniu ir androgenų, ir antiandrogenų tyrimo metodu (2) (15). Ši bioanalizė grindžiama penkių nuo androgenų priklausomų audinių masės pokyčiais tiriant lytinės brandos amžiaus kastruotus žiurkių patinėlius. Ją atliekant vertinamas cheminės medžiagos gebėjimas paskatinti androgenų agonistų, antagonistų arba 5α-reduktazės inhibitorių veikimą atitinkantį biologinį aktyvumą. Į šį bandymų metodą įtraukti penki tiksliniai nuo androgenų priklausomi audiniai: ventralinė prostatos skiltis (angl. VP), sėklinės pūslelės (angl. SV) (taip pat skysčiai ir koaguliacijos liaukos), išangės pakeliamasis ir stormeninis akytkūnio (angl. LABC) raumuo, abi Kuperio liaukos (angl. COW) ir varpos galva (angl. GP). Tiriant lytinės brandos amžiaus kastruotus žiurkių patinėlius, visi šie penki audiniai reaguoja į androgenus – jų absoliuti masė padidėja. Kai tie patys audiniai stimuliuojami duodant stipraus etaloninio androgeno, kad jų masė padidėtų, davus antiandrogeno visi šie penki audiniai sureaguoja ir jų absoliuti masė sumažėja. Pagal pradinį *Hershberger* bioanalizės modelį buvo numatyta naudoti chirurgiškai kastruotus lytinės brandos amžiaus patinėlius, šis modelis patvirtintas *Hershberger* tinkamumo patvirtinimo programos 1, 2 ir 3 etapais.

3. *Hershberger* bioanalizė yra mechanistinė *in vivo* androgenų agonistų, androgenų antagonistų ir 5a-reduktazės inhibitorių atrankos analizė; jos taikymą reikėtų vertinti pagal EBPO konceptualią endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo sistemą (2 priedėlis). Pagal šią konceptualią sistemą *Hershberger* bioanalizė yra 3 lygmens *in vivo* analizė,

▼M5

kurią atliekant gaunama duomenų apie vieną endokrininės sistemos mechanizmą, t. y. (anti)androgeninį poveikį. Ši bioanalizė sukurta kaip *in vitro* ir *in vivo* bandymų serijos dalis ir yra skirta cheminėms medžiagoms, kurios gali sąveikauti su endokrinine sistema, nustatyti ir taip padėti atlikti pavojingumo ir rizikos žmogaus sveikatai ir aplinkai vertinimą.

4. Kadangi kastravimo procedūra kelia su gyvūnų gerove susijusių abejonių, kaip alternatyvą *Hershberger* bioanalizei bandyta naudoti stimuliuojamus neoperuotus (nekastruotus) nujunkytus patinėlius ir taip išvengti kastracijos etapo. Bandymo su stimuliuojamais nujunkytais gyvūnais metodo tinkamumas buvo patvirtintas (24); tačiau atliekant *Hershberger* bioanalizės modelio, pagal kurį naudojami nujunkyti gyvūnai, tinkamumo patvirtinimo tyrimus, bandomo dydžio silpnų antiandrogenų dozių poveikį nuo androgenų priklausomų organų masei pavyko nustatyti ne visais atvejais. Todėl šis modelis į šį bandymų metodą neįtrauktas. Tačiau pripažįstant, kad šis modelis ne tik gali būti naudingas saugant gyvūnų gerovę, bet ir suteikti informacijos apie kitus veikimo būdus, jis yra aprašytas EBPO Rekomendaciniame dokumente Nr. 115 (25).

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

5. Androgenų agonistai ir antagonistai veikia kaip androgenų receptorių ligandai ir gali atitinkamai aktyvinti arba slopinti receptoriaus kontroliuojamą genų transkripciją. Be to, kai kurios cheminės medžiagos kai kuriuose androgenų veikiamuose audiniuose slopina testosterono virtimą stipresniu natūraliu androgenu dihidrotestosteronu (5a-reduktazės inhibitoriai). Tokios cheminės medžiagos gali kelti pavojų sveikatai, įskaitant poveikį reprodukcijai ir vystymuisi. Dėl to reguliavimo tikslais cheminę medžiagą reikia greitai įvertinti ir nustatyti, ar ji gali veikti kaip androgeno agonistas, antagonistas arba 5a-reduktazės inhibitorius. Nors ligandų rišimosi prie androgenų receptorių afiniškumas, matuojamas pagal rišimąsi prie receptorių arba reporterinių genų transkripcijos aktyvinimą *in vitro*, yra informatyvus veiksnys, jis yra tik vienas iš keleto galimo pavojaus determinantų. Kiti galimi determinantai – metabolinis aktyvavimas ir deaktyvavimas patekus į organizmą, pasiskirstymas veikiamuose audiniuose, pašalinimas iš organizmo. Dėl to reikia atlikti galimos cheminės medžiagos veikimo *in vivo* esant tam tikroms sąlygoms ir tam tikram sąlyčiui atrankos analizę. *In vivo* įvertinimas ne toks svarbus, jeigu cheminės medžiagos savybės (absorbcija, pasiskirstymas, metabolizmas, šalinimas (angl. ADME)) yra žinomos. Nuo androgenų priklausomi audiniai, ypač lytinės brandos amžiaus kastruotų žiurkių patinėlių, į stimuliavimą androgenais reaguoja sparčiai ir energingai augdami. Įvairių rūšių graužikai, ypač žiurkės, taip pat plačiai naudojami toksiškumo tyrimuose pavojingumui apibūdinti. Todėl analizės modelis, pagal kurį naudojamos lytinės brandos amžiaus kastruotos žiurkės ir tiriami penki veikiami audiniai, tinka androgenų agonistų ir antagonistų bei 5a-reduktazės inhibitorių *in vivo* atrankos analizei atlikti.

6. Šis bandymų metodas yra pagrįstas tais EBPO tinkamumo patvirtinimo tyrime naudotais protokolais, kurie pasitvirtino kaip patikimi ir atkartojami ir vienos laboratorijos, ir skirtingų laboratorijų tyrimuose (4) (5) (6) (7) (8). Į šį bandymų metodą yra įtrauktos ir androgenų, ir antiandrogenų bandymo procedūros.

7. Nors TP dozė, skirtingų laboratorijų naudota pagal EBPO *Hershberger* bioanalizės tinkamumo patvirtinimo programą antiandrogenams nustatyti, šiek tiek skyrėsi (0,2 arba 0,4 mg/kg/d, poodinės injekcijos), skirtumas tarp šių dviejų protokolų variantų, lyginant galimybes nustatyti silpną arba stiprų antiandrogenų poveikį, nebuvo didelis. Tačiau, aišku, TP dozė neturėtų būti labai didelė, kad neblokuotų silpnų androgenų receptorių (AR) antagonistų poveikio, arba labai maža, kad androgeninių audinių augimo atsakas nebūtų silpnas, nors antiandrogenai kartu ir nebūtų duodami.

▼M5

8. Atskirų nuo androgenų priklausomų audinių augimo atsakas būna ne vien androgeninės kilmės, t. y. kitos cheminės medžiagos, ne vien androgenų agonistai, gali pakeisti tam tikrų audinių masę. Tačiau keleto audinių lygiagretaus augimo atsakas patvirtina, kad labiau veikia androgenams būdingas mechanizmas. Pavyzdžiui, dėl didelių stiprių estrogenų dozių gali padidėti sėklinių pūslelių masė; tačiau panašus kitų nuo androgenų priklausomų audinių atsakas atliekant analizę nepasireiškia. Antiandrogeninės cheminės medžiagos gali veikti kaip androgenų receptorių antagonistai arba kaip 5a-reduktazės inhibitoriai. 5a-reduktazės inhibitorių poveikis būna įvairus, nes virtimas stipresnio veikimo dihidrotestosteronu skirtinguose audiniuose būna skirtingas. Antiandrogenai, kurie slopina 5α-reduktazę, pavyzdžiui, finasteridas, palyginti su stipriais AR antagonistais, pavyzdžiui, flutamidu, ryškiau veikia ventralinę prostatos skiltį negu kitus audinius. Šiuo skirtingu audinių atsaku galima remtis norint atskirti, ar tam tikro pobūdžio veikimas yra susijęs su AR, ar 5α-reduktaze. Be to, androgenų receptoriai yra laipsniškai susiję su kitų steroidinių hormonų veikla, ir kai kurie kiti hormonai, kai yra duodami didelėmis viršfiziologinio dydžio dozėmis, gali surišti TP ir slopinti jo augimą skatinantį poveikį (13). Dar nuo androgenų priklausomų audinių augimas gali sulėtėti dėl aktyvesnio steroidų metabolizmo ir dėl to rezultato – sumažėjusio testosterono kiekio kraujo serume. Todėl įprastu atveju visus teigiamus *Hershberger* bioanalizės rezultatus reikėtų įvertinti įrodomosios vertės metodais, tarp jų – *in vitro* analize, pavyzdžiui, rišimosi prie androgenų ir estrogenų receptorių (ER) analize, atitinkama transkripcijos aktyvinimo analize arba kitokia *in vivo* analize, kuria tiriami panašūs androgenų veikiami audiniai, pavyzdžiui, patinėlių lytinio brendimo analize, 15 dienų nekastruotų suaugusių patinėlių analize, arba 28 arba 90 dienų kartotinės dozės tyrimais.

9. Patirtis rodo, kad ksenobiotiniai androgenai yra retesni negu ksenobiotiniai antiandrogenai. Todėl numatoma, kad *Hershberger* bioanalizė bus dažniausiai taikoma antiandrogenų atrankai. Tačiau androgenų bandymo procedūras vis dėlto galima rekomenduoti taikyti steroidinėms ar steroidams giminingoms cheminėms medžiagos arba cheminėms medžiagoms, kurių galimo androgeninio poveikio požymių pastebėta taikant konceptualios sistemos (2 priedėlis) 1 arba 2 lygmens metodus. Atliekant 5 lygmens analizę taip pat galima pastebėti su (anti)androgeninėmis savybėmis siejamą neigiamą poveikį, todėl reikia įvertinti, ar cheminės medžiagos poveikis yra endokrininio pobūdžio.

10. Pripažįstama, kad visos procedūros, kuriose naudojami gyvūnai, turėtų atitikti vietinius gyvūnų globos reikalavimus; toliau nurodyti globos ir elgesio su gyvūnais reikalavimai yra būtiniausi veiklos reikalavimai, vietinės taisyklės, pavyzdžiui, 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos (26), yra už juos viršesnės. Išsamesnės humaniško elgesio su gyvūnais gairės pateiktos EBPO (17).

11. Kaip ir kitais atvejais, kai bioanalizei yra naudojami bandomieji gyvūnai, reikėtų kruopščiai įvertinti, ar šis tyrimas tikrai būtinas. Iš esmės toks sprendimas gali būti grindžiamas dviem priežastimis:

— yra didelė sąlyčio tikimybė (konceptualios sistemos 1 lygmuo) arba atliekant *in vitro* analizę pastebėti (anti)androgeninio poveikio požymiai (2 lygmuo), todėl reikia nustatyti, ar toks poveikis gali pasireikšti *in vivo*;

— atliekant 4 arba 5 lygmens *in vivo* bandymus pasireiškia (anti)androgeninį poveikį atitinkantys požymiai, todėl konkretų veikimo būdą reikia ištirti, pvz., nustatyti, ar poveikis pasireiškė dėl (anti)androgeninio mechanizmo.

▼M5

12. Sąvokos, vartojamos šiame bandymų metodo aprašyme, pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMŲ METODO PRINCIPAS

13. *Hershberger* bioanalizės jautrumas užtikrinamas naudojant patinėlius, kurių organizme vyksta minimali endogeninių androgenų gamyba. Tam naudojami kastruoti patinėliai, praėjus pakankamai laiko nuo kastravimo, kad veikiami audiniai regresuotų iki minimalios, vienodos pradinės masės. Taigi atliekant stiprių androgenų atrankos analizę endogeninis cirkuliuojančių androgenų lygis būna žemas ir būna padaryta taip, kad pogumburio–hipofizės–lytinių liaukų ašis nebegalėtų jo kompensuoti atsako mechanizmais, audinių gebėjimas reaguoti būtų kuo didesnis, o pradinės audinio masės skirtumai – kuo mažesni. Atliekant galimo antiandrogeninio veikimo atrankos analizę, nuoseklesnių audinių masės prieaugio rezultatų galima gauti, kai audiniai stimuliuojami etaloniniu androgenu. Todėl *Hershberger* bioanalizei atlikti reikia imti tik po 6 kiekvieno dydžio dozės grupės gyvūnus, o kitais atvejais analizei, kuriai naudojami nekastruoti lytiškai subrendę arba suaugę patinėliai, rekomenduojama naudoti po 15 kiekvieno dydžio dozės grupės patinėlių.

14. Lytinės brandos amžiaus žiurkių patinėlius reikėtų kastruoti reikiamu būdu, tam naudoti patvirtintus anestetikus ir taikyti sterilius metodus. Pirmas kelias dienas po operacijos reikėtų duoti analgetikų, kad gyvūnai nepatirtų pooperacinio diskomforto. Kastracija padidina analizės, skirtos silpniems androgenams ir antiandrogenams nustatyti, tikslumą, nes kastruojant pašalinami kompensaciniai endokrininiai atsakomieji mechanizmai, veikiantys nekastruotų gyvūnų organizme ir galintys sumažinti duodamų androgenų ir antiandrogenų poveikį, ir eliminuojami dideli testosterono kiekio skirtingų gyvūnų kraujo serume skirtumai. Taigi, kai naudojami kastruoti gyvūnai, šio endokrininio veikimo atrankos analizei jų reikia mažiau.

15. Kai atliekama galimo androgeninio veikimo atrankos analizė, bandomoji cheminė medžiaga duodama per virškinamąjį traktą naudojant zondą arba poodinėmis injekcijomis kasdien dešimt dienų iš eilės. Bandomosios cheminės medžiagos duodama ne mažiau kaip dviem dozes gaunančioms bandomųjų gyvūnų grupėms, kiekvienai grupei duodamos to paties dydžio dozės. Gyvūnų nekroskopija atliekama praėjus maždaug 24 valandoms po paskutinės dozės davimo. Statistiškai reikšmingas dviejų arba daugiau veikiamų organų masės padidėjimas bandomosios cheminės medžiagos grupėse, palyginti su nešiklio kontroline grupe, rodo, kad bandomoji cheminė medžiaga gali veikti kaip androgenas (žr. 60 punktą). Androgenų, pavyzdžiui, trenbolono, kurio 5α – reduktazė negali veikti, poveikis, palyginti su TP poveikiu, yra ryškesnis išangės pakeliamajam raumeniui ir stormeniniam akytkūnio raumeniui bei varpos galvai, tačiau turėtų pasireikšti didesnis visų audinių augimas.

16. Kai atliekama galimo antiandrogeninio veikimo atrankos analizė, bandomoji cheminė medžiaga duodama per virškinamąjį traktą naudojant zondą arba poodinėmis injekcijomis kasdien dešimt dienų iš eilės, kartu kasdien sušvirkščiant poodines TP injekcijas (0,2 arba 0,4 mg/kg/d). Per tinkamumo patvirtinimo programą nustatyta, kad galima švirkšti 0,2 arba 0,4 mg/kg/d TP injekcijas, nes abiejų dydžių dozės yra veiksmingos ir padeda aptikti antiandrogenus, todėl atliekant analizę reikėtų pasirinkti tik vieno dydžio dozę, kuri bus naudojama. Skirtingos bandomosios cheminės medžiagos dozės duodamos ne mažiau kaip trims dozes gaunančioms bandomųjų gyvūnų grupėms, kiekvienai grupei duodamos to paties dydžio dozės. Gyvūnų nekroskopija atliekama praėjus maždaug 24 valandoms po paskutinės dozės davimo. Statistiškai reikšmingas dviejų arba daugiau veikiamų organų masės sumažėjimas grupėse, kurių gyvūnams duota bandomosios cheminės medžiagos ir TP, palyginti su kontroline grupe, kurios gyvūnams duota tik TP, rodo, kad bandomoji cheminė medžiaga gali veikti kaip antiandrogenas (žr. 61 punktą).

▼M5

METODO APRAŠYMAS

Rūšių ir veislės parinkimas

17. *Hershberger* bioanalizei nuo 4-ojo dešimtmečio yra naudojamos žiurkės. Nors biologiniu požiūriu gali būti, kad ir žiurkėms, ir pelėms pasireikštų panašus atsakas, bet remiantis 70 metų patirtimi taikant modelį, pagal kurį naudojamos žiurkės, *Hershberger* bioanalizei pasirinktos žiurkės. Be to, kadangi *Hershberger* bioanalizė gali būti pradinė, atliekama prieš ilgalaikį tyrimą, abiem tyrimams galima naudoti tos pačios rūšies, veislės ir to paties šaltinio gyvūnus.

18. Pagal šį protokolą laboratorijoms leidžiama pasirinkti tą žiurkių, kurios bus naudojamos tyrime, veislę, kurią anksčiau naudojo tyrime dalyvaujanti laboratorija. Galima naudoti dažniausiai naudojamų veislių žiurkes; tačiau tų veislių žiurkės, kurios subręsta daug vėliau negu per 42 dienas nuo atsivedimo, neturėtų būti naudojamos, nes kastravus 42 dienų amžiaus patinėlius gali būti neįmanoma išmatuoti varpos galvos masės: ją išmatuoti galima tik tada, kai apyvarpė atsiskiria nuo varpos kūno. Taigi veislių, išvestų iš *Fisher* 344 žiurkių, nereikėtų naudoti, išskyrus retus atvejus. *Fisher* 344 žiurkių lytinio vystymosi laikotarpis yra kitoks negu kitų dažnai naudojamų veislių, pavyzdžiui, *Sprague Dawley* arba *Wistar*, žiurkių (16). Jeigu ketinama naudoti tokią veislę, laboratorija turėtų šios veislės žiurkes kastruoti kiek vyresnio amžiaus ir gebėti įrodyti naudojamos veislės jautrumą. Laboratorija turėtų aiškiai nurodyti pagrindines priežastis, nulėmusias tos veislės žiurkių pasirinkimą. Jeigu atrankos analizė yra pradinė, atliekama prieš kartotinių dozių bandymą per virškinamąjį traktą, dauginimosi ir vystymosi tyrimą arba ilgalaikį tyrimą, geriausia, jei visuose tyrimuose būtų naudojami tos pačios veislės ir to paties šaltinio gyvūnai.

Laikymo ir šėrimo sąlygos

19. Visos procedūros turėtų atitikti laboratorinių gyvūnų priežiūros vietinius reikalavimus. Šiose nuostatose pateikti tik būtiniausi gyvūnų priežiūros ir elgesio su gyvūnais reikalavimai, ir griežtesnės vietinės taisyklės, pavyzdžiui, 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos, yra už juos viršesnės (26). Bandomųjų gyvūnų patalpos temperatūra turėtų būti 22 °C (gali svyruoti apie ± 3 °C). Santykinė oro drėgmė turėtų būti mažiausiai 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką. Reikėtų siekti, kad santykinė drėgmė būtų 50–60 %. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis. Per parą apšvietimo seka turėtų būti 12 h šviesos ir 12 h tamsos.

20. Gyvūnus geriau laikyti grupėmis, o ne izoliuotus, dėl to, kad gyvūnai yra jauni, ir dėl to, kad žiurkės yra socialūs gyvūnai. Kai viename narvelyje gyvūnai laikomi po du arba tris, išvengiama susigrūdimo ir su tuo susijusio streso, kuris gali paveikti hormoninę pagalbinių lyties audinių vystymosi kontrolę. Narvelius reikėtų kruopščiai išvalyti, kad būtų pašalinti galimi teršalai, ir išdėstyti taip, kad būtų kiek įmanoma sumažintas bet koks galimas poveikis dėl narvelio vietos. Gyvūnų susigrūdimo bus išvengta, jei bus naudojami tinkamo dydžio (~ 2 000 kvadratinių centimetrų ploto) narveliai.

21. Kiekvieną gyvūną reikėtų humanišku būdu atskirai paženklinti (pvz., ausies žyma arba įsagu). Tai, koks ženklinimo metodas taikomas, reikėtų užrašyti.

▼M5

22. Laboratorinis pašaras ir vanduo turėtų būti duodami *ad libitum*. *Hershberger* bioanalizę atliekančios laboratorijos turėtų naudoti dažniausiai per bandymus su cheminėmis medžiagomis naudojamus pašarus. Bioanalizės tinkamumo patvirtinimo tyrimuose nepastebėta jokio su pašarais susijusio poveikio arba pokyčių. Tai, kokie pašarai naudojami, užrašoma; vieną laboratorinių pašarų mėginį reikėtų pasilikti, jei ateityje prireiktų jį išanalizuoti.

Nuo androgenų priklausomų organų masės pokyčių rezultatų kriterijai

23. Per tinkamumo patvirtinimo tyrimą negauta duomenų, kad kūno masės mažėjimas turėtų poveikio tiriamų audinių (t. y. audinių, kuriuos per šį tyrimą reikėtų sverti) masės didėjimui arba mažėjimui.

24. Iš įvairių tinkamumo patvirtinimo programoje sėkmingai naudotų veislių žiurkių nuo androgenų priklausomų organų masė yra didesnė sunkesnių veislių žiurkių, palyginti su lengvesnėmis veislėmis. Todėl absoliuti organų masė, kurios reikėtų tikėtis teigiamų ir neigiamų kontrolinių rezultatų atvejais, nėra įtraukta į *Hershberger* bioanalizę kaip rezultatų kriterijus.

25. Kadangi audiniui nustatytas variacijos koeficientas (angl. CV) yra atvirkščiai proporcingas statistinei galiai, *Hershberger* bioanalizės rezultatų kriterijai yra grindžiami didžiausia kiekvienam tiriamam audiniui nustatyta variacijos koeficiento verte (1 lentelė). Variacijos koeficientai nustatyti per EBPO tinkamumo patvirtinimo tyrimus. Jeigu gaunami neigiami rezultatai, laboratorijos turėtų išnagrinėti kontrolinės grupės ir didelę dozę gaunančios grupės variacijos koeficientų vertes ir nustatyti, ar nebuvo viršytos didžiausios šių rezultatų kriterijų – variacijos koeficientų – vertės.

26. Tyrimą reikėtų pakartoti, jeigu: 1) trys arba daugiau iš dešimties galimų atskirų variacijos koeficientų kontrolinėje grupėje ir dideles dozes gaunančioje grupėje viršija maksimalias vertes, nustatytas agonistų ir antagonistų tyrimams, kaip nurodyta 1 lentelėje, ir 2) bent dviejų tiriamų audinių pokytis buvo nereikšmingas, t. y. r vertės buvo 0,05–0,10.

1 lentelė

Didžiausios leidžiamos variacijos koeficientų vertės, pagal EBPO tinkamumo patvirtinimo tyrimus nustatytos veikiamiems pagalbiniams lyties audiniams, kai taikomas kastruotų gyvūnų modelis ([1])

Audinys	Antiandrogeninis poveikis	Androgeninis poveikis
Sėklinės pūslelės	40 %	40 %
Ventralinė prostatos skiltis	40 %	45 %
Išangės pakeliamasis raumuo ir stormeninis akytkūnio raumuo	20 %	30 %
Kuperio liaukos	35 %	55 %
Varpos galva	17 %	22 %

([1]) Atitinkamo audinio variacijos koeficiento apatinė riba buvo nustatyta pagal eilės tvarka nuo mažiausios iki didžiausios išdėstytas variacijos koeficiento vertes – visus per visus tinkamumo patvirtinimo bandymus taikant konkretų modelį (agonistų arba antagonistų) apskaičiuotus vidurkius. Variacijos koeficiento riba brėžta tame taške, kuriame padidėjimo intervalas iki artimiausios didžiausios variacijos koeficiento vertės šioje sekoje yra daug didesnis negu tarp keleto prieš tai išdėstytų variacijos koeficientų verčių – „trūkio taške“. Reikėtų pažymėti, kad nors pagal šią analizę antagonistų modeliui nustatyti santykinai patikimi „trūkio taškai“, agonistų analizės variacijos koeficientų kreivės atspindėjo vienodą didėjimą, todėl apatinės variacijos koeficientų ribos šiuo metodu nustatytos kiek dirbtinai.

▼M5

BANDYMO PROCEDŪRA

Atitiktis taisyklėms ir laboratorijos patikrinimas

27. Kitaip negu poveikiu gimdai pagrįstoje analizėje (šio priedo B.54 skyrius), prieš pradedant *Hershberger* analizę laboratorijos kompetencijos tikrinti nereikia, nes per tyrimą kartu atliekama ir teigiama (testosterono propionatas ir flutamidas), ir neigiama kontrolė.

Gyvūnų skaičius ir būklė

28. Kiekvienoje dozes gaunančioje ir kontrolinėje grupėje turi būti mažiausiai 6 gyvūnai. Tai galioja ir androgenų, ir antiandrogenų protokolams.

Kastracija

29. Gyvūnus priėmus reikėtų leisti jiems keletą dienų aklimatizuotis, siekiant įsitikinti, ar jie yra sveiki ir gyvybingi. Kadangi iki 42 dienų amžiaus arba iki 42-os postnatalinės dienos gyvūnų, kuriuos ketinama kastruoti, apyvarpė dar gali būti neatsiskyrusi, gyvūnus reikėtų kastruoti 42-ą arba vėlesnę PND, ne anksčiau. Gyvūnai kastruojami taikant anesteziją – kapšelis įpjaunamas, abi sėklidės ir antsėklidžiai išimami, kraujagyslės ir sėkliniai latakai perrišami. Įsitikinus, kad kraujavimo nėra, kapšelis užsiuvamas arba sukabinamas chirurginėmis kabėmis. Pirmas kelias dienas po operacijos gyvūnams reikėtų duoti analgetikų pooperaciniam diskomfortui sumažinti. Jeigu iš gyvūnų tiekėjo įsigyjami jau kastruoti gyvūnai, tiekėjas turėtų užtikrinti, kad gyvūnų amžiaus ir lytinio subrendimo etapo duomenys yra teisingi.

Aklimatizavimasis po kastracijos

30. Gyvūnams po kastracijos reikėtų leisti dar bent 7 dienas aklimatizuotis laboratorijos sąlygomis ir tiriamų audinių masei regresuoti. Gyvūnus reikėtų kasdien stebėti ir pašalinti visus gyvūnus, kuriems pasireiškia ligos arba fizinės anomalijos požymių. Taigi dozes galima pradėti duoti (tyrimo metu) jau 49-ą PND, bet ne vėliau kaip 60-ą PND. Gyvūnų amžius nekroskopijos metu turėtų būti ne didesnis kaip 70 PND. Šis lankstumas suteikia galimybę laboratorijai veiksmingai suplanuoti bandymo eigą.

Kūno masė ir grupės sudarymas atsitiktine tvarka

31. Atskirų gyvūnų kūno masės skirtumai nulemia audinių masės skirtumus ir vienoje grupėje, ir tarp skirtingų grupių. Padidėjus audinio masės skirtumams, padidėja variacijos koeficientas (angl. CV) ir sumažėja tyrimo statistinė galia (kartais dar vadinama tyrimo jautrumu). Todėl kūno masės variacijas reikėtų kontroliuoti ir bandymo, ir statistinėmis priemonėmis.

32. Kontrolė bandymo priemonėmis – tai užtikrinimas, kad kūno masės reikšmės ir tarp vienos bandymo grupės, ir tarp skirtingų bandymo grupių gyvūnų skirtųsi nedaug. Pirma, reikėtų vengti naudoti neįprastai mažus arba didelius gyvūnus ir jų neįtraukti į bandymo kohortą. Naudojamų gyvūnų masė bandymo pradžioje neturi skirtis daugiau kaip ± 20 %, palyginti su vidutine mase (pvz., lytinės brandos amžiaus kastruotų žiurkių: 175g ± 35g). Antra, gyvūnus reikėtų suskirstyti į grupes (kontrolinę ir gaunančią dozes) atsitiktine tvarka pagal masę, kad kiekvienos grupės kūno masės vidurkis statistiškai nesiskirtų nuo kitų grupių. Bloko atsitiktinės atrankos procedūrą reikėtų aprašyti.

▼M5

33. Kadangi dėl toksiškumo dozes gaunančios grupės gyvūnų kūno masė, palyginti su kontrolinės grupės, gali sumažėti, kaip statistinį lydintį kintamąjį galima naudoti kūno masę pirmosiomis bandomosios cheminės medžiagos davimo dienomis, o ne nekroskopijos metu.

Dozavimas

34. Norint nustatyti, ar bandomoji cheminė medžiaga gali daryti androgeninį poveikį *in vivo*, paprastai pakanka dviejų dydžių bandomosios cheminės medžiagos dozių grupių, teigiamos kontrolės ir nešiklio (neigiamos) kontrolės grupės (žr. 43 punktą), todėl rūpinantis gyvūnų gerove tokiai struktūrai yra teikiama pirmenybė. Jeigu siekiama nubrėžti dozės ir atsako tarpusavio ryšio kreivę arba duomenis ekstrapoliuoti mažesnėms dozėms, reikalingos bent trijų dydžių dozės grupės. Jeigu reikalinga informacija ne tik apie androgeninį veikimą (pavyzdžiui, reikia įvertinti stiprumą), reikėtų pasirinkti kitokį dozavimo režimą. Atliekant bandymus su antiandrogenais bandomoji cheminė medžiaga duodama kartu su etaloniniu androgenų agonistu. Reikėtų naudoti ne mažiau kaip 3 bandomąsias grupes, kurioms duodamos skirtingos bandomosios cheminės medžiagos dozės, teigiamos ir neigiamos kontrolės grupės (žr. 44 punktą). Kontrolinės grupės gyvūnai turėtų būti laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip ir bandomieji gyvūnai, išskyrus tai, kad jie neveikiami bandomąja chemine medžiaga. Jei bandomoji cheminė medžiaga duodama naudojant nešiklį, kontrolinei grupei turėtų būti duodamas didžiausias nešiklio kiekis iš duodamo bandymo grupėms.

35. Visus dozės dydžius reikėtų siūlyti ir pasirinkti atsižvelgiant į jau turimus bandomosios cheminės medžiagos ar jai giminingos medžiagos toksiškumo ir (toksiko)kinetinius duomenis. Pasirenkant didžiausią dozę reikėtų atsižvelgti, pirma, į LD50 ir (arba) ūmaus toksiškumo informaciją, kad būtų išvengta gyvūnų nugaišimo, didelio skausmo arba kančių (17) (18) (19) (20), ir, antra, į turimą informaciją apie poūmio ir ūmaus toksiškumo bandymuose naudojamas dozes. Apskritai didžiausia dozė neturėtų sukelti galutinės gyvūnų kūno masės sumažėjimo daugiau kaip 10 %, palyginti su kontroline mase. Didžiausia dozė turėtų būti mažesnioji iš šių dozių: 1) didžiausia dozė, kurią duodant 10 dienų iš eilės ir didinant iki maksimalaus 1 000 mg/kg/d dydžio, užtikrinama, kad gyvūnai nenugaiš, jiems nepasireikš reikšmingas toksinis poveikis ir jie nepatirs didelių kančių (žr. 36 punktą), arba 2) dozė, daranti (anti)androgeninį poveikį. Atrankos tikslais dideli intervalai, pvz., po pusę log vieneto (tai atitinka dozės progresiją 3,2) arba net po vieną log vienetą tarp dozių yra priimtini. Jeigu nėra tinkamų duomenų, padedančių nustatyti dozes, galima atlikti dozės dydžio intervalo nustatymo bandymą (žr. 37 punktą).

Ribinis dozės dydis

36. Jeigu atliekant bandymą ir duodant ribinę 1 000 mg/kg kūno masės per dieną dozę ir mažesnę dozę šiame tyrime aptarta tvarka statistiškai reikšmingas dauginimosi organo masės pokytis nesukeliamas, tada galima daryti išvadą, kad papildomų dydžių dozės nereikalingos. Nuostatos dėl ribinės dozės netaikomos tais atvejais, kai, atsižvelgiant į žmonių sąlytį su medžiaga, reikia naudoti didesnio dydžio dozes.

Dozės dydžio intervalo nustatymas

37. Jeigu reikia, iš pradžių galima atlikti dozės dydžio intervalo nustatymo tyrimą su keliais gyvūnais ir pasirinkti reikiamas dozės grupes [taikant ūmaus toksiškumo bandymų metodus (šio priedo B.1 bis, B.1 tris skyriai (27), EBPO Bandymų gairės Nr. 425 (19))]. *Hershberger* biologiniam tyrimui reikia parinkti tokias dozes, kad būtų užtikrinta, jog cheminę medžiagą duodant dešimt dienų iš eilės ir dozę didinant iki maksimalaus

▼M5

1 000 mg/kg/d kiekio gyvūnas nenugaiš, jam nepasireikš reikšmingas toksinis poveikis ir jis nepatirs didelių kančių, kaip pažymėta 35 ir 36 punktuose. Šiuo tikslu toksiškumo gyvūnams arba kančių klinikiniams požymiams apibūdinti galima remtis EBPO Rekomendaciniu dokumentu (17). Jeigu pagal šį dozės dydžio intervalo nustatymo tyrimą tai yra įmanoma, po dešimties dozės davimo dienų, praėjus 24 valandoms po paskutinės dozės davimo, tiriamus audinius galima išpjauti ir pasverti. Tuomet tais duomenimis galima pasinaudoti pasirenkant dozes pagrindiniam tyrimui.

Etaloninės cheminės medžiagos ir nešiklis

38. Etaloninis androgenų agonistas turėtų būti testosterono propionatas (TP), CAS Nr. 57–82–5. Etaloninė TP dozė gali būti 0,2 mg/kg KM/d arba 0,4 mg/kg KM/d. Etaloninis androgenų antagonistas turėtų būti flutamidas (FT), CAS Nr. 1311–84–7. Etaloninė FT dozė turėtų būti 3 mg/kg kūno masės/d, FT reikėtų duoti kartu su etaloninio TP doze.

39. Jeigu yra įmanoma, pirmiausia rekomenduojama naudoti vandeninį tirpalą arba suspensiją. Tačiau, kadangi dauguma androgenų ligandų arba jų metabolinių prekursorių dažnai būna hidrofobiniai, dažniausiai naudojamas tirpalas arba aliejinė suspensija (pvz., su kukurūzų, žemės riešutų, sezamo arba alyvuogių aliejumi). Bandomąsias chemines medžiagas galima ištirpinti minimaliame 95 % etanolio arba kito atitinkamo tirpiklio kiekyje ir atskiesti iki darbinės koncentracijos, esančios bandomajame nešiklyje. Toksinės tirpiklio savybės turėtų būti žinomos, jas reikėtų išbandyti atskiroje kontrolinėje grupėje, kurioje naudojamas tik tirpiklis. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga yra laikoma stabilia, tam, kad lengviau tirptų, galima ją lengvai pakaitinti, greitai mechaniškai pamaišyti. Reikėtų nustatyti bandomosios cheminės medžiagos stabilumą nešiklyje. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga per visą tyrimą išlieka stabili, galima parengti vieną pradinę alikvotinę bandomosios cheminės medžiagos dalį ir kasdien ją skiesti nustatytomis dozėmis, ėmusis atsargumo priemonių, kad mėginiai nebūtų užteršti ir sugadinti.

Dozių davimas

40. TP reikėtų duoti poodinėmis injekcijomis, FT – per virškinamąjį traktą naudojant zondą.

41. Bandomoji cheminė medžiaga duodama per virškinamąjį traktą naudojant zondą arba poodinėmis injekcijomis. Pasirenkant davimo būdą reikia atsižvelgti į gyvūnų gerovę, taip pat į fizikines ir chemines bandomosios cheminės medžiagos savybes. Be to, prieš pradedant intensyvius ilgalaikius bandymus, jei injekcija gaunami teigiami rezultatai, taip pat reikia atsižvelgti į toksikologinius aspektus, pavyzdžiui, artimumą žmonių sąlyčio su chemine medžiaga būdui (pvz., zondu atkartojamas sąlytis per virškinamąjį traktą, poodinėmis injekcijomis – sąlytis per kvėpavimo takus arba sugertis per odą), į turimą toksikologinę informaciją ir duomenis apie metabolizmą ir kinetiką (t. y. tai, kad reikia vengti pirmojo pasažo metabolizmo, arba tai, kad poveikis būna didesnis, jei duodama tam tikru būdu).

42. Gyvūnams dozes reikėtų duoti tokiu pačiu būdu ir periodiškumu dešimt dienų iš eilės maždaug kas 24 valandas. Dozės dydį reikėtų kasdien tikslinti remiantis lygiagrečiai atliekamais kūno masės matavimais. Dozę ir davimo laiką reikėtų kasdien, davus dozę, užrašyti. Kad gautus duomenis būtų galima prasmingai aiškinti, reikėtų stengtis neviršyti maksimalios 35 punkte aptartos dozės. Kūno masės sumažėjimą, klinikinius požymius ir kitus gautus duomenis tuo tikslu reikėtų kruopščiai vertinti. Kaip virškinamojo trakto zondą reikėtų naudoti skrandžio zondą arba atitinkamą intubacijos

▼M5

vamzdelį. Didžiausias gyvūnui duodamas vienkartinis skysčio tūris priklauso nuo bandomo gyvūno dydžio. Reikėtų laikytis vietos gyvūnų priežiūros taisyklių, tačiau šis kiekis neturėtų būti didesnis kaip 5 ml/kg kūno masės, išskyrus vandeninius tirpalus, kurių galima duoti po 10 ml/kg kūno masės. Kai daromos poodinės injekcijos, dozės turėtų būti leidžiamos mentikaulio arba strėnų srityje sterilia adata (pvz., 23 arba 25 dydžio) ir tuberkulino švirkštu. Injekcijos vietos nuskusti nebūtina. Jei dozė prarandama, injekcijos vietoje prateka arba suduodama ne visa, tai reikėtų užrašyti. Bendras vienai žiurkei per dieną sušvirkščiamas injekcijos kiekis neturėtų viršyti 0,5 ml/kg kūno masės.

Specialios androgenų agonistams skirtos procedūros

43. Atliekant bandymus su androgenų agonistais, nešiklio grupė yra neigiamos kontrolės grupė, grupė, kuriai duodama TP dozės, – teigiamos kontrolės grupė. Androgenų agonistų veikimą atitinkanti biologinė veikla yra bandoma duodant bandomąją cheminę medžiagą pasirinktomis dozėmis dozes gaunančioms grupėms 10 dienų iš eilės. Bandomosios cheminės medžiagos grupės gyvūnų penkių pagalbinių lyties audinių masė yra lyginama su nešiklio grupės mase ir tikrinama, ar esama statistiškai reikšmingo masės padidėjimo.

Specialios androgenų antagonistams ir 5α-reduktazės inhibitoriams skirtos procedūros

44. Atliekant bandymus su androgenų antagonistais ir 5α-reduktazės inhibitoriais, grupė, kuriai duodama TP, yra neigiamos kontroles grupė, o grupė, kuriai tuo pat metu duodamos etaloninės TP ir FT dozės yra teigiamos kontrolės grupė. Androgenų antagonistų ir 5α-reduktazės inhibitorių veikimą atitinkančios biologinės veiklos bandymai atliekami duodant etaloninę TP dozę ir bandomosios cheminės medžiagos dozę 10 dienų eilės. Grupės, kuriai duodama ir TP, ir bandomosios cheminės medžiagos, gyvūnų penkių pagalbinių lyties audinių masė yra lyginama su grupės, kuriai duodama tik etaloninė TP dozė, mase ir tikrinama, ar esama statistiškai reikšmingo masės padidėjimo.

STEBĖJIMAI

Klinikiniai stebėjimai

45. Bendrus klinikinius stebėjimus reikėtų atlikti bent kartą per dieną ir dažniau, jei pastebima toksiškumo požymių. Stebėjimus geriausia atlikti tuo pačiu metu, kiekvieną dieną, atsižvelgiant į didžiausio laukiamo poveikio po dozės davimo laiką. Reikėtų tikrinti visus gyvūnus, ar jie nenugaišo, ar negaišta, vertinti bendrus klinikinius požymius, pavyzdžiui, elgsenos, odos, kailio, akių, gleivinės pakitimus, sekreto ir ekskrecijų dažnį, autonominį aktyvumą (pvz., ašarojimą, plaukų pašiaušimą, vyzdžio dydį, neįprastą kvėpavimą).

46. Jeigu gyvūnas randamas nugaišęs, jis išimamas ir sutvarkomas, o jo duomenys toliau neanalizuojami. Duomenis apie gyvūnus, nugaišusius iki nekroskopijos, reikėtų įtraukti į tyrimo duomenis, kartu nurodyti akivaizdžias nugaišimo priežastis. Visus gaištančius gyvūnus reikėtų humaniškai numarinti. Duomenis apie gaišusius ir vėliau numarintus gyvūnus reikėtų įtraukti į tyrimo duomenis, kartu nurodyti akivaizdžias priežastis, dėl kurių gyvūnai ėmė gaišti.

▼M5

Kūno masė ir pašaro suvartojimas

47. Visus gyvūnus reikėtų kasdien pasverti 0,1 g tikslumu, pradedant sverti prieš pat tyrimo pradžią, t. y. kai gyvūnai suskirstomi į grupes. Kitas būdas – galima matuoti per tyrimą kiekvieno narvelio gyvūnų suvartojamo pašaro kiekį sveriant šėrimo įrenginį. Pašaro suvartojimo rezultatus reikėtų išreikšti gramais vienai žiurkei per dieną.

Skrodimas ir audinių bei organų masės matavimas

48. Praėjus maždaug 24 valandoms po paskutinės bandomosios cheminės medžiagos dozės davimo žiurkes reikėtų numarinti, nukraujinti įprasta tyrimą vykdančios laboratorijos taikoma tvarka ir atlikti nekroskopiją. Duomenis apie humaniško numarinimo metodą reikėtų įtraukti į laboratorijos ataskaitą.

49. Idealiu atveju nekroskopijai gyvūnus reikėtų imti atsitiktine tvarka iš įvairių grupių, siekiant išvengti tiesioginės didėjančios ar mažėjančios progresijos kurioje nors dozės grupėje, nes tai galėtų paveikti duomenis. Visus per nekroskopiją gautus duomenis, t. y. apie patologinius pokyčius ir (arba) matomus pažeidimus, reikėtų pažymėti ir nurodyti ataskaitoje.

50. Penkis nuo androgenų priklausomus audinius (ventralinę prostatos skiltį, sėklines pūsleles, išangės pakeliamąjį raumenį ir stormeninį akytkūnio raumenį, Kuperio liaukas, varpos galvą) reikėtų pasverti. Šiuos audinius reikėtų išpjauti, atsargiai pašalinti nereikalingus suaugusius audinius ir riebalinį sluoksnį bei sverti šviežius (nefiksuotus). Kiekvieną audinį reikėtų tvarkyti itin atsargiai, kad jie neprarastų skysčių ir neišdžiūtų, nes dėl to gali rastis reikšmingų klaidų ir padidėti duomenų variacija, kadangi bus užregistruota mažesnė masė. Kai kurie audiniai gali būti labai maži arba juos gali būti sunku išskrosti, jau dėl to atsiras duomenų variacija. Todėl svarbu, kad lyties pagalbinių audinių skrodimą atliekantys asmenys išmanytų standartines šių audinių skrodimo procedūras. EBPO yra parengusi standartinės operavimo tvarkos (angl. SOP) vadovą skrodimams (21). Kruopščiai pasirengus pagal standartinės operavimo tvarkos vadovą galima užtikrinti, kad galimų variacijos šaltinių tyrime būtų kuo mažiau. Idealiu atveju už konkretaus audinio skrodimą turėtų būti atsakingas tas pats prozektorius, siekiant pašalinti skirtumus, galinčius atsirasti dėl to, kad skirtingi prozektoriai audinius tvarko skirtingai. Jeigu to padaryti neįmanoma, nekroskopiją reikėtų suplanuoti taip, kad vienas prozektorius skrostų tam tikrus visų dozes gavusių grupių gyvūnų audinius ir nebūtų taip, kad vienas asmuo skrostų visus kontrolinės grupės gyvūnų audinius, o kitas būtų atsakingas už dozes gavusias grupes. Kiekvieno gyvūno kiekvieną lyties pagalbinį audinį reikėtų pasverti nenusausintą 0,1 mg tikslumu ir mases užrašyti.

51. Kai kurie audiniai gali būti labai maži arba juos gali būti sunku išskrosti, jau dėl to atsiras duomenų variacija. Atliekant ankstesnius darbus nustatyta įvairių variacijos koeficientų, kurie būna skirtingi ir priklauso nuo laboratorijos kompetencijos. Keletu atvejų vienoje konkrečioje laboratorijoje buvo pastebėta didelių tokių audinių kaip ventralinė prostatos skiltis arba Kuperio liaukos absoliučios masės skirtumų.

52. Kepenų, abiejų inkstų ir antinksčių masės matai nėra privalomi. Vėlgi nuo audinių reikėtų pašalinti visą nereikalingą fasciją ir riebalus. Kepenis reikėtų pasverti ir duomenis užrašyti 0,1 g tikslumu, abu inkstus ir antinksčius reikėtų pasverti ir duomenis užrašyti 0,1 mg tikslumu. Kepenys, inkstai ir antinksčiai yra ne tik androgenų veikiami organai; pagal juos taip pat galima ištirti naudingus sisteminio toksiškumo rodiklius.

▼M5

53. Liuteinizuojančio hormono (LH), folikulus stimuliuojančio hormono (FSH) ir testosterono (T) kiekio serume matavimai nėra privalomi. Testosterono lygis serume yra naudingas rodiklis, kai norima nustatyti, ar bandomoji cheminė medžiaga skatina testosterono metabolizmą kepenyse, mažindama jo lygį serume. Neturint testosterono duomenų toks poveikis gali būti priskirtas antiandrogeniniam mechanizmui. Liuteinizuojančio hormono lygiai suteikia informacijos apie antiandrogeno gebėjimą ne tik mažinti organo masę, bet ir paveikti pogumburio–hipofizės funkciją, o tai atliekant ilgalaikius tyrimus gali paskatinti atsirasti sėklidžių auglius. Folikulus stimuliuojantis hormonas yra svarbus spermatogenezės hormonas. T4 ir T3 kiekio serume rodikliai taip pat nėra privalomi, bet suteikia naudingos papildomos informacijos apie gebėjimą ardyti skydliaukės hormonų homeostazę. Jeigu reikia atlikti hormonų matavimus, žiurkėms prieš nekroskopiją reikėtų duoti anestetiko ir atliekant kardialinę punktaciją paimti jų kraujo, anestezijos metodą reikėtų pasirinkti atidžiai – tokį, kuris nedarytų poveikio hormonų matavimui. Serumo paruošimo metodą, radioimunologinę analizę arba kitas matavimo priemones, analizės procedūras ir rezultatus reikėtų aprašyti. Liuteinizuojančio hormono lygius reikėtų nurodyti ng viename serumo ml, testosterono lygį taip pat reikėtų nurodyti ng viename serumo ml.

54. Audinių skrodimas yra aprašytas išsamiame skrodimo vadove, kuriame kaip papildoma medžiaga pateikiamos vykdant tinkamumo patvirtinimo programą padarytos nuotraukos (21). Skrodimo vaizdinė medžiaga yra paskelbta Korėjos maisto ir vaistų administracijos tinklalapyje (22).

— Gyvūną paguldžius ventraline puse į viršų patikrinti, ar apyvarpė yra atsiskyrusi nuo varpos galvos. Jei taip, atitraukti apyvarpę ir atskirti varpos galvą, ją pasverti (0,1 mg tikslumu) ir masę užrašyti.

— Atverti pilvo odą ir sienelę, atidengiant vidaus organus. Jeigu norima pasverti neprivalomus sverti organus, išimti ir 0,1 g tikslumu pasverti kepenis, išimti skrandį ir žarnas, išimti ir 0,1 mg tikslumu pasverti abu inkstus ir antinksčius. Šiuos organus išpjovus atidengiama šlapimo pūslė ir pradedamas tiriamų vyriškųjų pagalbinių audinių skrodimas.

— Norint išpjauti ventralinę prostatos skiltį, šlapimo pūslę reikia atskirti nuo ventralinio raumenų sluoksnio išilgai, per vidurį perpjaunant jungiamąjį audinį. Šlapimo pūslę pastumti į priekį sėklinių pūslelių link, atidengiant kairiąją ir dešiniąją ventralinės prostatos skiltis (dengiamas riebalinio sluoksnio). Atsargiai nupjauti riebalinį sluoksnį nuo dešiniosios ir kairiosios ventralinės prostatos skilčių. Švelniai išstumti ventralinės prostatos dešiniąją skiltį iš šlaplės ir nupjauti. Laikant dešiniąją ventralinės prostatos skiltį, švelniai išstumti ventralinės prostatos kairiąją skiltį iš šlaplės ir nupjauti; 0,1 mg tikslumu pasverti ir masę užrašyti.

— Norint išpjauti sėklines pūsleles ir koaguliacijos liaukas, reikia pastumti šlapimo pūslę uodegos link, atidengiant sėklinį lataką ir dešiniąją bei kairiąją sėklines pūsleles ir koaguliacijos liaukas. Kad neištekėtų skystis, hemostatu užspausti sėklinių pūslelių ir koaguliacijos liaukų pagrindą sėklinio latako ir šlaplės susijungimo vietoje. Atsargiai išpjauti sėklines pūsleles ir koaguliacijos liaukas, nenuėmus hemostato nupjauti riebalus ir jungiamuosius audinius, įdėti į prieš tai pasvertą svėrimo vonelę, nuimti hemostatą, 0,1 mg tikslumu pasverti ir masę užrašyti.

▼M5

— Norint išpjauti išangės pakeliamąjį raumenį ir stormeninį akytkūnio raumenį atidengiami raumenys ir varpos pagrindas. Išangės pakeliamieji raumenys yra išsidėstę aplink gaubtinę žarną, priešakinė išangės pakeliamojo raumens ir stormeninio akytkūnio raumens dalis yra prisitvirtinusi prie varpos stormens. Oda ir jungiamieji audiniai atskiriami nuo tarpvietės, einančios nuo varpos pagrindo iki priekinės išangės dalies. Stormeniniai akytkūnio raumenys laipsniškai nupjaunami nuo stormens ir audinių. Gaubtinė žarna perpjaunama į dvi dalis, tada galima išpjauti ir išimti visą išangės pakeliamojo raumens ir stormeninio akytkūnio raumens bloką. Nuo išangės pakeliamojo raumens ir stormeninio akytkūnio raumens reikėtų nupjauti riebalinį sluoksnį ir jungiamuosius audinius, išangės pakeliamąjį raumenį ir stormeninį akytkūnio raumenį 0,1 g tikslumu pasverti ir masę užrašyti.

— Išėmus išangės pakeliamąjį raumenį ir stormeninį akytkūnio raumenį, abipus ir giliau į dorsalinę pusę nuo varpos stormens yra po Kuperio arba stormeninę šlaplės liauką. Jas reikia išpjauti labai atsargiai, stengiantis nepradurti plonos kapsulės, kad neištekėtų skystis. Abi Kurperio liaukas 0,1 mg tikslumu pasverti, masę užrašyti.

— Jeigu iš kurios nors liaukos per nekroskopiją arba skrodimą išteka skystis, tai taip pat reikėtų užrašyti.

55. Jeigu kiekvienai cheminei medžiagai įvertinti reikia atlikti didesnio kiekio gyvūnų nekroskopiją negu derėtų per vieną dieną, tyrimo pradžią galima išdėstyti dviem iš eilės dienoms, tada nekroskopija ir su ja susiję darbai paskirstomi dviem dienoms. Jeigu darbas taip paskirstomas, per vieną dieną reikėtų panaudoti pusę dozes gaunančios grupės gyvūnų.

56. Po skrodimo gyvūnų kūnus reikėtų tinkamai sutvarkyti.

ATASKAITA

Duomenys

57. Duomenys (t. y. kūno masė, pagalbinių lyties audinių masė, neprivalomi matavimai ir kitos reakcijos bei pastabos) nurodomi apie kiekvieną gyvūną ir apie kiekvieną gyvūnų grupę (visų atliktų matavimų vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai). Duomenys apibendrinami lentelėse. Reikėtų nurodyti gyvūnų skaičių bandymo pradžioje, gyvūnų, kurie vykstant bandymui rasti nugaišę arba kuriems pasireiškė toksiškas poveikis, pastebėto toksiško poveikio požymiai, įskaitant jų pasireiškimo pradžią, trukmę ir stiprumą.

58. Galutinėje ataskaitoje turėtų būti pateikiama ši informacija:

Bandymą atliekanti įstaiga:

— įstaigos pavadinimas, adresas;

— tyrimo vadovas, kitas personalas ir jų pareigos tyrime;

— tyrimo pradžios ir pabaigos datos, t. y. atitinkamai pirma bandomosios cheminės medžiagos davimo diena ir paskutinė nekroskopijos diena.

Bandomoji cheminė medžiaga:

— bandomosios (-ųjų) cheminės (-ių) medžiagos (-ų) šaltinis, partijos/-siuntos numeris, tapatumas, grynumas, visas tiekėjo adresas ir bandomosios (-ųjų) cheminės (-ių) medžiagos (-ų) apibūdinimas;

— fizikinė būsena ir, jei svarbu, fizikinės ir cheminės savybės;

— laikymo sąlygos, skiedimo metodas ir periodiškumas;

— visi surinkti duomenys apie stabilumą;

— visų dozių tirpalų arba suspensijų analizė.

▼M5

Nešiklis:

— nešiklio apibūdinimas (pobūdis, tiekėjas ir partijos numeris);

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas (jei nešiklis ne vanduo).

Bandomieji gyvūnai ir gyvūnų priežiūra:

— rūšis/veislė ir jų pasirinkimo pagrindimas;

— gyvūnų šaltinis arba tiekėjas, įskaitant visą adresą;

— pristatytų gyvūnų skaičius ir amžius;

— laikymo sąlygos (temperatūra, apšvietimas ir t. t.);

— pašarai (pavadinimas, rūšis, tiekėjas, sudėtis ir, jei žinoma, fitoestrogenų kiekis);

— kraikas (pavadinimas, rūšis, tiekėjas, sudėtis);

— laikymo narveliuose sąlygos ir viename narvelyje laikomų gyvūnų skaičius.

Analizės sąlygos:

— amžius kastravimo metu, aklimatizacijos po kastravimo trukmė;

— kiekvieno gyvūno kūno masė bandymo pradžioje (0,1 g tikslumu);

— atsitiktinės atrankos procesas, suskirstymas į nešiklio, etaloninės ir bandomosios cheminės medžiagos grupes ir narvelius;

— kiekvienos grupės gyvūnų kūno masės vidurkis ir standartinis nuokrypis padieniui per visą tyrimą;

— pagrindinė priežastis, nulėmusi dozės dydžio pasirinkimą;

— tai, kaip bandomoji cheminė medžiaga duodama, ir pagrindinė priežastis, nulėmusi davimo būdo pasirinkimą;

— jeigu tiriamas antiandrogeninis poveikis, duodamas TP (dozė ir koncentracija);

— duodama bandomoji cheminė medžiaga (dozė ir koncentracija);

— dozės davimo laikas;

— nekroskopijos procedūros, įskaitant nukraujinimo, anestezavimo priemones;

— jeigu atliekama serumo analizė, reikėtų pateikti duomenis apie metodą. Pavyzdžiui, jeigu taikoma radioimunoanalizė (RIA), reikėtų aprašyti RIA procedūrą, RIA priemonių rinkinio šaltinį, priemonių rinkinio galiojimo pabaigos datas, scintiliacijų skaičiavimo procedūrą, standartizavimą.

Rezultatai:

— kiekvieno gyvūno kasdienio stebėjimo dozių davimo laikotarpiu duomenys, tarp jų:

— kūno masė (0,1 g tikslumu);

— klinikiniai požymiai (jei yra);

— visi pašarų suvartojimo matavimai arba pastabos;

— pastabos apie kiekvieno gyvūno nekroskopiją, tarp jų:

▼M5

— nekroskopijos data;

— dozes gavusi gyvūnų grupė;

— gyvūno identifikavimo žyma;

— prozektorius;

— nekroskopijos ir skrodimo laikas;

— gyvūno amžius;

— galutinė kūno masė nekroskopijos metu, pažymint statistiškai reikšmingą padidėjimą arba sumažėjimą;

— gyvūnų nukraujinimo ir skrodimo per nekroskopiją tvarka;

— penkių tiriamų nuo androgenų priklausomų audinių masė:

— ventralinės prostatos skilties (0,1 mg tikslumu);

— sėklinių pūslelių ir koaguliacijos liaukų su skysčiu (abiejų, 0,1 mg tikslumu);

— išangės pakeliamojo raumens ir stormeninio akytkūnio raumens komplekso (0,1 mg tikslumu);

— Kuperio liaukų (abiejų masė sveriant šviežias, 0,1 mg tikslumu);

— varpos galvos (masė sveriant šviežią, 0,1 mg tikslumu);

— kitų pasirinktų audinių masė, jei audiniai sveriami:

— kepenų (0,1 g tikslumu);

— inkstų (abiejų, 0,1 mg tikslumu);

— antinksčių (abiejų, 0,1 mg tikslumu);

— bendros pastabos ir komentarai.

— Serume esančių hormonų analizė, jei atliekama:

— liuteinizuojančio hormono kiekis serume (neprivaloma – ng/serumo ml) ir

— testosterono kiekis serume (neprivaloma – ng/serumo ml);

— bendros pastabos ir komentarai.

Duomenų apibendrinimas

Duomenis reikėtų apibendrinti lentelėje, kurioje reikėtų nurodyti kiekvienos grupės imties dydį, verčių vidurkį, standartinę vidurkio paklaidą arba standartinį nuokrypį. Lentelėse reikėtų nurodyti kūno masę nekroskopijos metu, kūno masės pokyčius nuo dozių davimo pradžios iki nekroskopijos, tiriamų pagalbinių lyties audinių masę, kitų pasirinktinai tiriamų organų masę.

Rezultatų aptarimas

Rezultatų analizė

59. Kūno ir organo, kurio nekroskopija atliekama, masę reikėtų statistiškai analizuoti, vertinant variacijų vienalytiškumą palyginti su atitinkamomis duomenų transformacijomis, jeigu to reikia. Bandomųjų grupių rezultatus reikėtų lyginti su kontrolinės grupės rezultatais taikant tokius metodus kaip ANOVA, taip pat atliekant porinių duomenų palyginimus (pvz., *Dunett* vienakryptis bandymas) ir analizę pagal statistinio skirtumo kriterijų, pvz., $p \leq 0,05$. Tas grupes, kurios įvertintos kaip statistiškai reikšmingos, reikėtų pažymėti. Tačiau „santykinės organo“ masės reikėtų vengti dėl to, kad statistinės prielaidos, kuriomis grindžiama ši duomenų manipuliacija, yra nepagrįstos.

▼M5

60. Kai tiriamas androgenų agonistų veikimas, kontroline grupe turėtų būti bandymo grupė, kuriai duodamas tik nešiklis. Bandomajai cheminei medžiagai būdingas veikimo būdas gali sukelti santykinai skirtingą audinių atsaką, pavyzdžiui, trenbolonas, kurio 5 alfa-reduktazė negali veikti, daro ryškesnį poveikį išangės pakeliamajam raumeniui, stormeniniam akytkūnio raumeniui ir varpos galvai, palyginti su TP. Statistiškai reikšmingą ($p \leq 0,05$) bet kurių dviejų arba didesnio skaičiaus tiriamų nuo androgenų priklausomų audinių (ventralinės prostatos skilties, išangės pakeliamojo raumens ir stormeninio akytkūnio raumens, varpos galvos, Kuperio liaukų ir sėklinių pūslelių bei koaguliacijos liaukų) masės padidėjimą reikėtų laikyti teigiamu androgenų agonistų tyrimo rezultatu; turėtų pasireikšti kiek didesnis visų tiriamų audinių augimas. Jungtinį visų pagalbinių lyties organų (angl. ASO) audinių atsako įvertinimą galima atlikti taikant atitinkamą daugiavariančių duomenų analizę. Taip galima pagerinti analizę, ypač tais atvejais, kai statistiškai reikšmingas atsakas pastebimas tik viename audinyje.

61. Kai tiriamas androgenų antagonistų veikimas, kontroline grupe turėtų būti bandymo grupė, kuriai duodama etaloninio androgeno (vien testosterono propionato). Bandomajai cheminei medžiagai būdingas veikimo būdas gali sukelti santykinai skirtingą audinių atsaką, pavyzdžiui, 5 alfa-reduktazės inhibitoriai, tokie kaip finasteridas, daro ryškesnį poveikį ventralinei prostatos skilčiai negu kitiems audiniams, palyginti su stipriais androgenų antagonistais, tokiais kaip flutamidas. Statistiškai reikšmingą ($p \leq 0,05$) bet kurių dviejų arba didesnio skaičiaus tiriamų nuo androgenų priklausomų audinių (ventralinės prostatos skilties, išangės pakeliamojo raumens ir stormeninio akytkūnio raumens, varpos galvos, Kuperio liaukų ir sėklinių pūslelių bei koaguliacijos liaukų) masės sumažėjimą vien dėl duoto TP reikėtų laikyti teigiamu androgenų antagonistų tyrimo rezultatu; turėtų pasireikšti kiek mažesnis visų tiriamų audinių augimas. Jungtinį visų pagalbinių lyties organų audinių atsako įvertinimą galima atlikti taikant atitinkamą daugiavariančių duomenų analizę. Taip galima pagerinti analizę, ypač tais atvejais, kai statistiškai reikšmingas atsakas pastebimas tik viename audinyje.

62. Duomenis reikėtų apibendrinti lentelėje, kurioje reikėtų nurodyti kiekvienos grupės imties verčių vidurkį, standartinę vidurkio paklaidą (standartinį nuokrypį taip pat galima nurodyti) ir imties dydį. Taip pat reikėtų pateikti lenteles su kiekvieno gyvūno duomenimis. Kiekvieno gyvūno duomenų vertes, vidurkius, kontrolinių duomenų standartinę paklaidą (standartinį nuokrypį) ir variacijos koeficientą reikėtų išanalizuoti ir patikrinti, ar jie atitinka priimtinus nuoseklaus derėjimo su numatytomis anksčiau surinktų duomenų vertėmis kriterijus. Jeigu variacijos koeficientai viršija 1 lentelėje nurodytas kiekvieno organo masei nustatytų variacijos koeficientų vertes (žr. 25 ir 26 punktus), reikėtų patikrinti šiuos dalykus: gal duomenys buvo klaidingai užrašyti arba įvesti arba laboratorija dar neišmoko tiksliai atlikti nuo androgenų priklausomų audinių skrodimo ir reikalingas tolesnis mokymasis/praktika. Apskritai variacijos koeficientas (standartinis nuokrypis, padalytas iš organo masės vidurkio) yra skirtingose laboratorijose ir tyrimuose atkuriamas rodiklis. Tarp pateiktų duomenų turėtų būti bent šie: ventralinės prostatos skilties, sėklinių pūslelių, išangės pakeliamojo raumens ir stormeninio akytkūnio raumens, Kuperio liaukų, varpos galvos, kepenų, kūno masė ir kūno masės pokytis nuo dozių davimo pradžios iki nekroskopijos. Pateikiant duomenis kūno masę taip pat galima perskaičiuoti pritaikius kovariaciją, tačiau šių duomenų nereikėtų įrašyti vietoj neperskaičiuotų duomenų. Be to, jeigu kurios nors grupės gyvūnų apyvarpė dar neatsiskyrusi, apyvarpės atsiskyrimą reikėtų registruoti ir statistiškai lyginti su kontroline grupe, tam taikant tikslųjį Fišerio (angl. *Fisher Exact*) testą.

▼**M5**

63. Tikrinant kompiuterinių duomenų įvestis ir lyginant su pradiniais duomenų lapais tikslumui užtikrinti, organo masės vertės, kurios biologiškai yra neįmanomos arba kurios daugiau negu trimis standartiniais nuokrypiais skiriasi nuo dozę gavusios grupės vidurkio, turėtų būti atidžiai tikrinamos, kai kurias gali tekti išimti kaip galimas duomenų užrašymo klaidas.

64. Tvirtinant tyrimo rezultatų tinkamumą svarbus rezultatų aiškinimo etapas dažnai būna tyrimo rezultatų palyginimas su EBPO variacijos koeficientų vertėmis (1 lentelė). Ankstesnius nešiklio kontrolinių grupių duomenis reikėtų saugoti laboratorijoje. Ankstesnius duomenis apie atsaką į teigiamas etalonines chemines medžiagas, pavyzdžiui, TP ir FT, taip pat reikėtų saugoti laboratorijoje. Laboratorijos taip pat gali periodiškai išbandyti atsaką į žinomus silpnus androgenų agonistus ir saugoti šiuos duomenis. Šiuos duomenis galima palyginti su turimais EBPO duomenimis, taip užtikrinant, kad pagal laboratorijos metodus atliekami tyrimai būtų pakankamai statistiškai tikslūs ir turėtų pakankamą statistinę galią.

▼M5

1 priedėlis

SĄVOKOS

Androgeninis sąvoka, vartojama teigiamam poveikiui nuo androgenų priklausomų audinių augimui apibūdinti.

Antiandrogeninis poveikis tai cheminės medžiagos savybė stabdyti testosterono propionato veikimą žinduolių organizme.

Cheminė medžiaga tai medžiaga arba mišinys.

Atsivedimo data yra 0 postnatalinė diena.

Dozė duodamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis. Atliekant *Hershberger* biologinį tyrimą dozė išreiškiama bandomosios cheminės medžiagos mase bandomojo gyvūno kūno masės vienetui per dieną (pvz., mg/kg kūno masės/per dieną).

Dozavimas bendras terminas, apimantis dozės dydį, jos dažnį ir dozavimo trukmę.

Gaištantis sąvoka, kuria apibūdinamas gaištantis gyvūnas, t. y. gyvūno, kuris netrukus nugaiš, būsena.

X postnatalinė diena X-oji gyvenimo diena nuo atsivedimo.

Jautrumas galimybė taikant bandymų metodą teisingai identifikuoti savybių, dėl kurių atliekamas bandymas, turinčias chemines medžiagas.

Specifiškumas galimybė taikant bandymų metodą teisingai identifikuoti savybių, dėl kurių atliekamas bandymas, neturinčias chemines medžiagas.

Bandomoji cheminė medžiaga bet kuri pagal šį bandymų metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

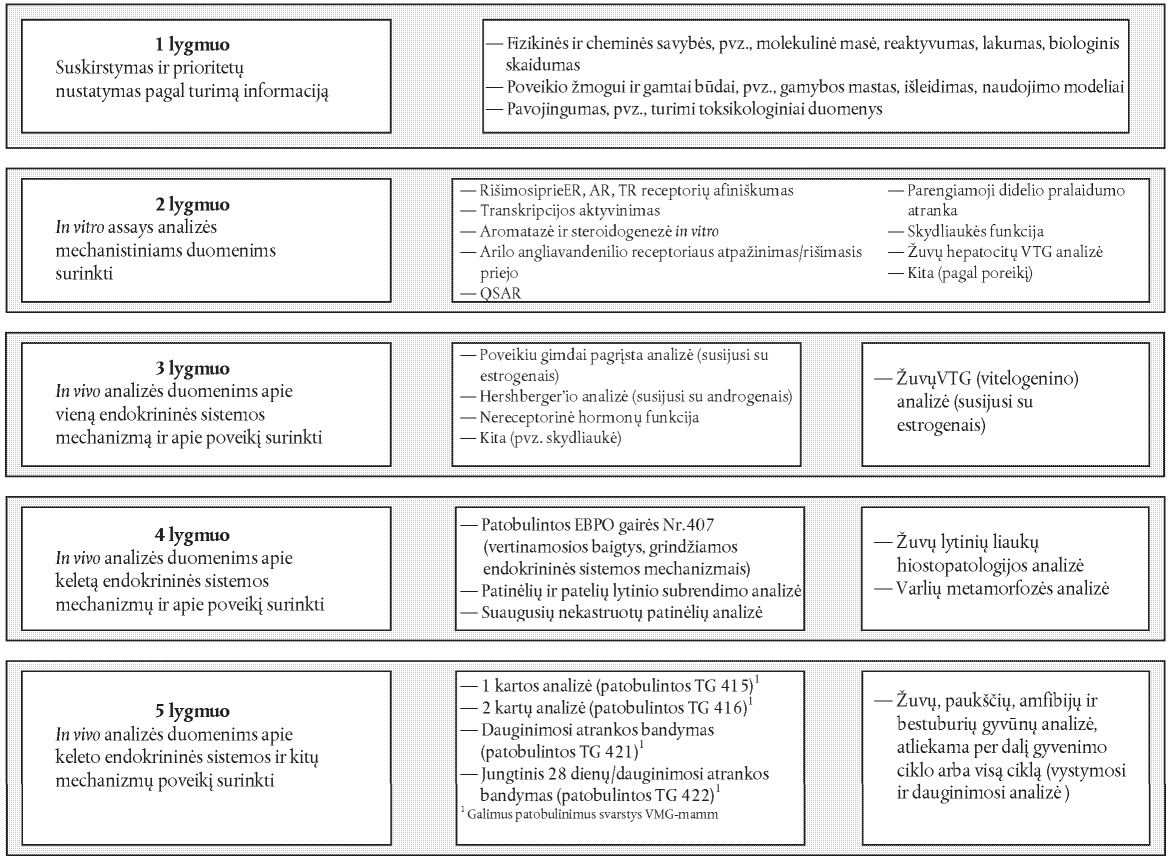
Tinkamumo patvirtinimas mokslinis procesas, kurio paskirtis – aprašyti darbo reikalavimus ir bandymų metodo apribojimus siekiant parodyti metodo patikimumą ir tinkamumą konkrečiam tikslui.

▼M5

2 priedėlis

Pastaba. Šį dokumentą parengė Bandymų gairių programos sekretoriatas pagal 6-ajame EDTA darbo grupės posėdyje sudarytą susitarimą

EBPO konceptuali endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo sistema



VMG-mamm: Bandymų su žinduoliais ir žinduolių vertinimo tinkamumo patvirtinimo valdymo grupė (angl. Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment)

▼M5

PASTABOS DĖL KONCEPTUALIOS SISTEMOS

1 pastaba. Pradėti dalyvauti tyrime ir pasitraukti iš tyrimo galima visais lygmenimis; tai priklauso nuo esamų informacijos poreikių pavojingumo ir rizikos vertinimo tikslais.

2 pastaba. 5 lygmeniu ekotoksikologija turėtų apimti vertinamąsias baigtis, kuriomis žymimi žalingo poveikio mechanizmai ir galima žala populiacijai.

3 pastaba. Kai daugialypis modelis apima keleto atskirų vertinamųjų baigčių tyrimą, tas modelis būtų taikomas vietoj pavienių vertinamųjų baigčių analizės.

4 pastaba. Kiekviena cheminė medžiaga turėtų būti vertinama kiekvienu atveju atskirai, atsižvelgiant į visą turimą informaciją ir konceptualios sistemos lygmenis.

5 pastaba. Kol kas šis planas apima ne viską. 3, 4 ir 5 lygmenyse jis apima analizę, kurią vykdyti jau galima arba kurios tinkamumas dar tvirtinamas. Antrosios grupės analizė įtraukta preliminariai. Kai ji bus išplėtota ir patvirtinta, ja planas bus oficialiai papildytas.

6 pastaba. Nereikėtų suprasti, kad 5 lygmuo apima tik baigiamuosius bandymus. Šiuo lygmeniu įtraukiami bandymai laikomi padedančiais įvertinti bendrą pavojingumą ir riziką.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

(1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10^{th}-11^{th} March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.

(3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and anti-androgenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1–16.9.15. J Wiley and Sons Inc.

(4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and SAFEty, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 62. ENV/JM/MONO(2006)30.

(5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5a-Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and SAFEty, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 86. ENV/JM/MONO(2008)3.

(6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and SAFEty, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 73. ENV/JM/MONO(2007)20.

(7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265–1269.

▼M5

(8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. Environ Health Perspect. 115(5):671–8.

(9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. Biochem J26:413–422.

(10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. Biochem J26:1306–1314.

(11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. J Pharmacol Exp Therap 99:38–44.

(12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for mytrophic activity. Endocrinology 45:113–119.

(13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. Proc Soc Exp Biol Med 83:175–180.

(14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.

(15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151–220.

(16) Massaro EJ (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, p 38.

(17) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(18) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development – Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92–64–12367–9, Paris.

(19) OECD (2008). Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

(20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265–1269. Žr. The dissection guidance provided to the laboratories, II skyrių: http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf.

(22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html.

(23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and SAFEty Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.

(24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.

(25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.

▼**M5**

(26) 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos (OL L 276, 2010 10 20, p. 33).

(27) Šie šio priedo skyriai:

B.1 bis „Ūmus toksiškumas per virškinamąjį traktą. Fiksuotųjų dozių metodas“

B.1 tris „Ūmus toksiškumas per virškinamąjį traktą. Ūmaus toksiškumo klasės metodas“.

▼M5

B.56. IŠPLĖSTINIS TOKSIŠKUMO VIENOS KARTOS DAUGINIMUISI BANDYMAS

ĮVADAS

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO Bandymų gaires (angl. OECD *Test Guideline* (TG)) Nr. 443 (2012). Jis parengtas pagal Tarptautinio gyvybės mokslų instituto (angl. ILSI) Sveikatos ir aplinkos mokslų instituto (angl. HESI) Žemės ūkio cheminių medžiagų saugos įvertinimo (angl. ASCA) techninio komiteto pasiūlymą dėl vienos kartos dauginimosi bandymo, išplėsto iki F_1 gyvenimo etapo, paskelbtą Cooper et al., 2006 (1). Bandymo modelis buvo patobulintas ir išsamiau paaiškintas siekiant, kad jis būtų lankstesnis ir būtų pabrėžta, jog bandymą pradedant yra svarbu remtis turimais duomenimis, o vėliau stebint gyvus gyvūnus bandymą pakreipti reikiama linkme ir pritaikyti pagal poreikius. Pagal šį bandymų metodą pateikiamas išsamus aprašas, kaip vykdomas Išplėstinis toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymas. Pagal bandymų metodą aptariamos trys F_1 gyvūnų kohortos:

1 kohorta : vertinamos dauginimosi/vystymosi vertinamosios baigtys; šį pogrupį galima išplėsti – įtraukti F_2 kartą;

2 kohorta : vertinamas galimas sąveikos su chemine medžiaga poveikis nervų sistemos vystymuisi;

3 kohorta : vertinamas galimas sąveikos su chemine medžiaga poveikis imuninės sistemos vystymuisi.

2. Sprendimai, ar vertinti antrą gyvūnų kartą, ar atsisakyti neurotoksiškumo vystymuisi vertinimo kohortos ir (arba) imunotoksiškumo vystymuisi vertinimo kohortos, priimami pagal turimas žinias apie vertinamą cheminę medžiagą ir pagal įvairių reguliavimo institucijų poreikius. Bandymų metodo tikslas – surinkti išsamius duomenis apie tai, kaip būtų galima atlikti bandymą ir kaip reikėtų vertinti kiekvieną gyvūnų kohortą.

3. Rėmimosi vidaus kriterijais priimant sprendimus dėl antros gyvūnų kartos tvarka, skirta toms reguliavimo institucijoms, kurios tokius kriterijus taiko, aptarta EBPO Rekomendaciniame dokumente (angl. *Guidance Document*) Nr. 117 (39).

PRADINIAI ASPEKTAI IR TIKSLAI

4. Pagrindinis išplėstinio toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymo tikslas – įvertinti tam tikrus per kitokio pobūdžio toksiškumo tyrimus nevertinamus gyvenimo etapus ir išbandyti poveikį, kurį gali sukelti sąlytis su chemine medžiaga prenataliniu ir postnataliniu laikotarpiais. Kai tiriamos dauginimosi vertinamosios baigtys, yra numatyta, kad, norint nustatyti poveikį patinėlių ir patelių dauginimosi organams, pirmiausia pasinaudojama informacija, gauta iš kartotinių dozių tyrimų (įskaitant toksiškumo dauginimosi sistemai atrankos tyrimus, pvz. žr. EBPO Bandymų gaires Nr. 422 (32)) arba trumpalaikių endokrininę sistemą galimai ardančių medžiagų atrankos analizių (pvz., Poveikiu gimdai pagrįstos analizės – bandymų metodas B.54 (36) ir *Hershberger* analizės – bandymų metodas B.55 (37)), jei tokios informacijos turima. Be kita ko gali būti atliekama: patinėliams – rujos ciklų spermatogenezė (sėklidžių histopatologija), patelėms – skaičiuojami folikulai/vertinamas oocitų subrendimas, kiaušidžių vientisumas (histopatologija). Taigi išplėstinis toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymas padeda ištirti dauginimosi vertinamąsias baigtis, kurioms įvertinti reikalinga patinėlių ir patelių sąveika, patelės su apvaisintais kiaušinėliais, patelės su palikuonimis ir F_1 karta iki šios kartos gyvūnų lytinio subrendimo (išsamesnės informacijos apie šį bandymų metodą yra pateikta EBPO Rekomendaciniame dokumente Nr. 151 (40)).

▼M5

5. Šis bandymų metodas yra skirtas įvertinti, kokį poveikį cheminės medžiagos daro vystymuisi prenataliniu ir postnataliniu laikotarpiais, taip pat nuodugniai įvertinti sisteminį toksiškumą vaikingoms ir žindančioms patelėms bei jauniems ir suaugusiems palikuonims. Išsami pagrindinių vystymosi vertinamųjų baigčių, pavyzdžiui, palikuonių gyvybingumo, ką tik gimusių jauniklių sveikatos, išsivystymo atsivedant, fizinio ir funkcinio vystymosi iki subrendimo, analizė turėtų padėti nustatyti konkrečius tirtinus palikuonių organus. Be to, atliekant bandymą bus gauta ir (arba) patvirtinta informacija apie bandomosios cheminės medžiagos poveikį suaugusių patinėlių ir patelių dauginimosi sistemų vientisumui ir funkcionavimui. Konkrečiai nagrinėjami šie parametrai (bet ne tik): lytinių liaukų funkcija, rujos ciklas, spermos brendimas antsėklidžiuose, elgsena poruojantis, apvaisinimas, gestacija, atsivedimas ir laktacija. Be to, informacija, gauta atliekant neurotoksiškumo ir imunotoksiškumo vystymuisi vertinimus, bus apibūdintas galimas poveikis toms sistemoms. Per šiuos bandymus gauti duomenys turėtų padėti nustatyti nepastebėto neigiamo poveikio dozės ribas (angl. NOAEL), žemiausias pastebėto neigiamo poveikio dozės ribas (angl. LOAEL) ir (arba) etalonines dozes pagal įvairias vertinamąsias baigtis; dar šiuos duomenys būtų galima panaudoti per ankstesnius kartotinių dozių tyrimus nustatytam poveikiui apibūdinti ir (arba) tolesniems bandymams pakreipti reikiama linkme.

6. Protokolas schematiškai pavaizduotas 1 pvz., Kelioms lytiškai subrendusių patinėlių ir patelių grupėms nepertraukiamai duodamos skirtingos bandomosios cheminės medžiagos dozės. Šiai tėvinei (P) kartai dozės duodamos nustatytą laikotarpį iki poravimosi (šis laikotarpis pasirenkamas pagal turimą informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą, bet turi būti ne trumpesnis kaip dvi savaitės) ir dvi savaites per poravimosi laikotarpį. P patinėliai toliau tiriami bent iki F_1 nujunkymo. Dozes jiems reikėtų duoti ne trumpiau kaip 10 savaičių. Dozes galima duoti ir ilgiau, jeigu poveikį dauginimuisi reikia išsiaiškinti tiksliau. P patelėms dozės nepertraukiamai duodamos gestacijos ir laktacijos laikotarpiais iki bandymo nutraukimo, kai jų vados nujunkomos (t. y. dozės duodamos 8–10 savaičių). F_1 palikuonys toliau gauna bandomosios cheminės medžiagos dozes nuo nujunkymo iki brandos.Jeigu vertinama antra karta (žr. EBPO Rekomendacinį dokumentą Nr. 117 (39)), F_1 palikuonims dozės duodamos iki F_2 nujunkymo arba iki bandymo nutraukimo.

7. Visi gyvūnai stebimi kliniškai ir atliekami patologiniai tyrimai toksiškumo požymiams nustatyti, ypač daug dėmesio skiriant patinų ir patelių dauginimosi sistemų vientisumui ir funkcionavimui bei palikuonių sveikatai, augimui ir vystymuisi. Nujunkyti ir atrinkti palikuonys suskirstomi į specialius pogrupius (1–3 kohortas, žr. 33, 34 punktus ir 1 schemą) ir tiriami toliau; be kitų dalykų, tiriamas lytinis subrendimas, dauginimosi organų vientisumas ir funkcijos, neurologinės ir elgsenos vertinamosios baigtys, imuninės sistemos funkcijos.

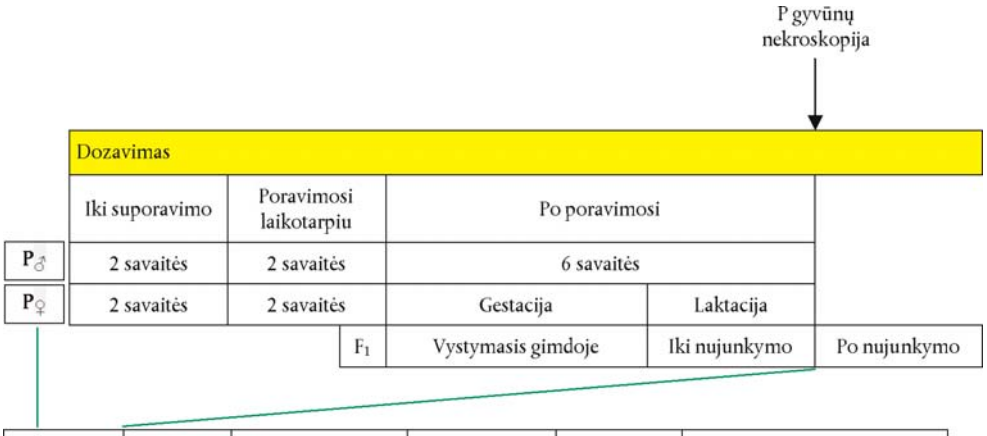
8. Atliekant bandymą reikėtų vadovautis pagrindiniais principais ir prielaidomis, išdėstytomis EBPO Rekomendaciniame dokumente Nr. 19 *On the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations* (34).

▼M5

9. Kai bus atlikta pakankamai daug bandymų, kad būtų galima patikrinti šio naujo bandymų modelio poveikį, bandymų metodas bus persvarstytas ir prireikus patikslintas atsižvelgiant į įgytą patirtį.

1 schema

Išplėstinio toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymo schema



Tėvinė karta	Kohorta	Paskirtis	Gyvūnai / kohorta	Lytinis subrendimas	Apytikslis amžius atliekant nekroskopiją (savaitėmis)
Tiriama po 20 vadų kiekvienoje grupėje	1A	Dauginimasis	20 V + 20 M	Taip	13
	1B	Dauginimasis	20 V + 20 M	Taip	14 arba 20–25, jei reikia
	2A	Neurotoksiškumas	10 V + M F @	Taip	11-12
	2B	Neurotoksiškumas	10 V + M F @	Ne	3
	3	Imunotoksiškumas	10 V + M F @	Taip	8
	Perteklinia i gyvūnai	Atliekami gyvūnai		Ne	3

@ vienas iš vados ir iš viso 20-ies vadų reprezentacinis skaičius, jei įmanoma

METODO APIBŪDINIMAS/PASIRENGIMAS BANDYMUI

Gyvūnai

Gyvūnų rūšių ir veislių parinkimas

10. Rūšių pasirinkimą toksiškumo dauginimuisi bandymui atlikti reikėtų kruopščiai apgalvoti atsižvelgiant į visą turimą informaciją. Tačiau, atsižvelgiant į bendrų duomenų kiekį ir galimybes palyginti su bendrojo toksiškumo bandymais, dažniausiai pasirenkama gyvūnų rūšis yra žiurkės, tad pagal šį bandymų metodą pateikiami kriterijai ir rekomendacijos yra skirti būtent šiai rūšiai. Jei naudojama kita rūšis, pasirinkimas turėtų būti pagrįstas ir turėtų būti padaromi atitinkami reikalingi protokolo pakeitimai. Neturi būti naudojamos mažo vaisingumo veislės arba veislės, kurioms savaime pasireiškia vystymosi defektai.

Amžius, kūno masė ir įtraukimo kriterijai

11. Reikėtų naudoti sveikus, bandymuose dar nenaudotus tėvinius gyvūnus. Reikėtų tirti ir patinėlius, ir pateles; patelės turėtų būti dar neturėjusios palikuonių ir nevaikingos. Pradedant duoti dozes P gyvūnai turėtų būti lytiškai subrendę, panašios masės (kaip ir kiti tos lyties gyvūnai), poravimo metu panašaus amžiaus (apie 90 dienų), reprezentatyvūs tos rūšies ir veislės gyvūnų, su kuriais atliekamas bandymas, pavyzdžiai. Atvežtiems gyvūnams leidžiama aklimatizuotis ne trumpiau kaip 5 dienas. Gyvūnai atsitiktine tvarka suskirstomi į kontrolinę ir bandomąją grupes taip, kad grupių gyvūnų kūno masės vidurkis būtų panašus (t. y. ± 20 % vidurkio).

▼M5

Laikymo ir šėrimo sąlygos

12. Bandomųjų gyvūnų patalpos temperatūra turėtų būti 22 °C (± 3°). Santykinė drėgmė turėtų būti 30–70 %, idealus intervalas – 50–60 %. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis ir jo seka per parą turėtų būti 12 h šviesos ir 12 h tamsos. Galima naudoti standartinius laboratorinių gyvūnų pašarus, geriamojo vandens kiekis neribojamas. Reikėtų atkreipti dėmesį į fitoestrogenų kiekį pašaruose, nes didelis fitoestrogenų kiekis pašaruose gali paveikti kai kurias dauginimosi vertinamąsias baigtis. Rekomenduojama naudoti standartinius, žinomos sudėties pašarus, kurių sudėtyje būtų kuo mažiau estrogeninių cheminių medžiagų (2) (30). Pašaro pasirinkimui gali turėti įtakos būtinybė tinkamai įmaišyti bandomąją cheminę medžiagą, duodamą pagal šį metodą. Reikėtų nustatyti bandomosios cheminės medžiagos kiekį, vienalytiškymą ir stabilumą nešiklyje. Reikėtų reguliariai tikrinti, ar pašaruose ir geriamajame vandenyje nėra teršalų. Kiekvienos per tyrimą naudojamo pašaro partijos pavyzdžius reikėtų laikyti reikiamomis sąlygomis (pvz., užšaldžius – 20 °C temperatūroje), kol bus baigta rengti ataskaita tam atvejui, jeigu pašaro sudedamąsias dalis dar reikėtų išsamiau analizuoti.

13. Gyvūnus reikėtų laikyti mažomis tos pačios lyties ir tokias pačias dozes gaunančių gyvūnų grupėmis. Siekiant išvengti galimų sužalojimų, gyvūnus galima laikyti atskirai (pvz., patinus po poravimosi). Poruojama turėtų būti šiam tikslui pritaikytuose narveliuose. Pasitvirtinus susiporavimui, patelės, kurios, kaip manoma, yra apvaisintos, laikomos po vieną atsivedimo arba veisimo narveliuose ir yra aprūpinamos tinkamomis ir nustatytomis gūžtos sukimo medžiagomis. Vados jaunikliai laikomi kartu su motinomis iki atjunkymo. F_1 gyvūnai laikomi mažomis grupėmis su tos pačios lyties ir dozės gaunančios grupės gyvūnais nuo nujunkymo iki bandymo nutraukimo. Moksliškai pagrįstais atvejais gyvūnus galima laikyti atskirai. Fitoestrogenų kiekis pasirinktame kraike turėtų būti kuo mažesnis.

Gyvūnų skaičius ir ženklinimas

14. Paprastai kiekvienoje dozes gaunančioje ir kontrolinėje grupėje turėtų būti pakankamas poruojamų gyvūnų porų skaičius, kad vienoje dozės grupėje būtų gauta bent 20 vaikingų patelių. Taip siekiama užtikrinti pakankamą vaikingų patelių skaičių, kad būtų galima prasmingai įvertinti galimą cheminės medžiagos poveikį vaisingumui, gestacijai ir P kartos patelių elgesiui, taip pat F_1 palikuonių augimui ir vystymuisi nuo apvaisinimo iki subrendimo. Nepavykus gauti norimo vaikingų patelių skaičiaus (t. y. 20), bandymas nebūtinai bus netinkamas ir turi būti vertinamas kiekvienu atveju atskirai, atsižvelgiant į galimą priežastinį ryšį su bandomąja chemine medžiaga.

15. Prieš pradedant duoti dozes kiekvienas P gyvūnas paženklinamas unikaliu numeriu. Jeigu iš ankstesnių laboratorijos duomenų matyti, kad reikšmingai patelių daliai rujos ciklas gali būti ne toks kaip įprasta (4 ar 5 dienų trukmės), rekomenduojama prieš pradedant duoti dozes įvertinti rujos ciklą. Taip pat, siekiant užtikrinti, kad bent 20 patelių kiekvienoje grupėje rujos ciklas tyrimo pradžioje būtų toks, kaip įprasta (4 arba 5 dienos), grupę galima padidinti. Visi F_1 palikuonys juos atsivedus yra paženklinami unikalia žyma ir pirmą kartą patikrinami 0 arba 1-ą postnatalinę dieną (PND). Visą tyrimą reikėtų saugoti duomenis apie tai, iš kokios vados yra paimtas kiekvienas F_1 ir F_2 (jei reikia) gyvūnas.

▼M5

Bandomoji cheminė medžiaga:

Turima informacija apie bandomąją cheminę medžiagą

16. Su esama informacija svarbu susipažinti priimant sprendimus dėl dozių davimo būdo, nešiklio pasirinkimo, gyvūnų rūšių parinkimo, dozės dydžio pasirinkimo ir galimo dozavimo grafiko keitimo. Todėl planuojant išplėstinį toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymą reikia atsižvelgti į visą svarbią turimą informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą, t. y. fizikines ir chemines savybes, toksikokinetinius duomenis (tarp jų – konkrečioms rūšims būdingą metabolizmą), toksikodinamines savybes, struktūros ir veikimo sąsajas (angl. SAR), *in vitro* metabolinius procesus, ankstesnių toksiškumo tyrimų rezultatus ir svarbią informaciją apie struktūriniu požiūriu analogiškas medžiagas. Pirminės informacijos apie absorbciją, pasiskirstymą, metabolizmą ir šalinimą (angl. ADME) bei biologinį kaupimą galima gauti iš cheminės struktūros, fizikinių ir cheminių duomenų, jungimosi su plazmos baltymais masto ir toksikokinetinių (TK) tyrimų, o toksiškumo tyrimų rezultatai suteikia papildomos informacijos, pvz., apie NOAEL, metabolizmą arba metabolizmo indukciją.

Toksikokinetinių duomenų vertinimas

17. Nors toksikokinetiniai duomenys iš anksčiau atliktų dozių dydžio intervalo nustatymo arba kitų tyrimų nėra privalomi, jie itin naudingi planuojant tyrimo struktūrą, pasirenkant dozės dydį ir aiškinant rezultatus. Ypač naudingi tie duomenys, kuriais: 1) patvirtinamas besivystančio vaisiaus ir jauniklio sąlytis su bandomąja chemine medžiaga (arba atitinkamais metabolitais), 2) suteikiama duomenų apie vidinę dozimetriją ir 3) įvertinama galima nuo dozės priklausoma kinetinių procesų saturacija. Į papildomus toksikokinetinius duomenis, pavyzdžiui, metabolitų ypatumus, koncentraciją per tam tikrą laiką ir kt., taip pat reikėtų atsižvelgti, jei šių duomenų turima. Atliekant pagrindinį tyrimą taip pat galima rinkti papildomus toksikokinetinius duomenis, jeigu tai netrukdo rinkti ir aiškinti pagrindinio tyrimo vertinamųjų baigčių.

Apskritai, planuojant išplėstinį toksiškumo vienos kartos dauginimuisi tyrimą būtų naudingi šie TK duomenys:

— gestacijos laikotarpio pabaigoje (pvz., 20-ą gestacijos dieną) – motinos ir vaisiaus kraujo;

— laktacijos laikotarpio viduryje (10-ą PND) – motinos ir jauniklio kraujo ir (arba) pieno;

— ankstyvuoju laikotarpiu po atjunkymo (pvz., 28-ą PND) – nujunkytų jauniklių kraujo mėginių.

Nustatant konkrečias analites (pvz., pagrindinę cheminę medžiagą ir (arba) metabolitus) ir atrankos schemą reikėtų vadovautis lankstumo principu. Pavyzdžiui, mėginių skaičius ir surinkimo laikas nustatytą mėginių surinkimo dieną priklausys nuo sąlyčio būdo ir iš anksto turimų žinių apie toksikokinetines savybes nevaikingų gyvūnų organizme. Bandomąją medžiagą dedant į pašarus užtenka nustatyti vieną laiką, kada mėginiai surenkami kiekvieną iš tų dienų; jei dozės duodamos per zondą, gali tekti nustatyti ne vieną papildomą mėginių surinkimo laiką, kad vidinių dozių intervalo įvertis būtų tikslesnis. Tačiau matuoti medžiagos koncentracijos pokytį laiko atžvilgiu visą tam tikrą kraujo ėmimo dieną nebūtina. Jei reikia, tiriant vaisius ir naujagimius vienos lyties ir vados gyvūnų kraują galima sujungti.

▼M5

Davimo būdas

18. Pasirenkant davimo būdą reikėtų atsižvelgti į tai, kuris būdas yra artimiausias žmogaus sąlyčio su ta medžiaga būdui (-ams). Nors pagal protokolą yra numatyta bandomąją cheminę medžiagą duoti su pašaru, protokolą galima pakeisti ir bandomąją cheminę medžiagą duoti kitais būdais (su geriamuoju vandeniu, per zondą, kvėpavimo takus, odą) atsižvelgiant į cheminės medžiagos savybes ir tai, kokia informacija yra reikalinga.

Nešiklio pasirinkimas

19. Prireikus bandomoji cheminė medžiaga tirpinama tinkamame nešiklyje arba paruošiama jos suspensija. Rekomenduojama visų pirma apsvarstyti galimybę, jei tik įmanoma, naudoti vandeninį tirpalą ar suspensiją; jei neįmanoma, tada – aliejinį tirpalą ar suspensiją (pvz., kukurūzų aliejuje). Jei nešiklis yra ne vanduo, turi būti žinomos jo toksiškumo savybės. Reikėtų vengti naudoti nešiklius, kuriems yra būdingas toksiškumas (pvz., acetoną, DMSO). Reikėtų nustatyti bandomosios cheminės medžiagos stabilumą nešiklyje. Jei dozių ruošimui palengvinti naudojamas nešiklis arba kitas priedas, reikėtų atsižvelgti į tokias jo charakteristikas: poveikį bandomosios cheminės medžiagos absorbcijai, pasiskirstymui, metabolizmui arba sulaikymui; poveikį bandomosios cheminės medžiagos cheminėms savybėms, dėl kurio gali pasikeisti jos toksiškumas; poveikį maisto ar vandens suvartojimui arba gyvūnų įmitimui.

Dozės pasirinkimas

20. Paprastai per tyrimą reikėtų tirti bent trijų dydžių dozes ir vykdyti lygiagrečią kontrolę. Pasirinkdamas reikiamus dozės dydžius tyrėjas turėtų atsižvelgti į visą turimą informaciją, taip pat į informaciją apie dozavimą per ankstesnius tyrimus, toksikokinetinius duomenis, gautus tiriant vaikingus ir nevaikingus gyvūnus, informaciją apie perdavimo laktacijos laikotarpiu mastą ir numatomą žmogaus sąlytį su medžiaga. Jeigu turima toksikokinetinių duomenų, iš kurių matyti, kad toksikokinetinių procesų saturacija priklauso nuo dozės dydžio, reikėtų imtis atsargumo priemonių ir vengti didelių dozių, kurios akivaizdžiai sukelia saturaciją, – žinoma, jeigu žmogaus sąlyčio su medžiaga lygis bus daug žemesnis už saturacijos tašką. Tokiais atvejais didžiausia dozė turėtų būti tokia, kuriai esant fiksuojamas perėjimo prie tiesinio toksikokinetinio modelio (tiesinės toksikokinetinės priklausomybės) perlinkio taškas, arba dozė, esanti virš perlinkio taško.

21. Jeigu reikiamų toksikokinetinių duomenų nėra, dozės dydį reikėtų pasirinkti pagal poveikio toksiškumą, nebent yra apribojimų dėl bandomosios cheminės medžiagos fizikinio ir (arba) cheminio pobūdžio. Jeigu dozės dydis pasirenkamas pagal toksiškumą, didžiausia dozė pasirenkama tokia, kad būtų sukeltas tam tikras toksinis poveikis, bet kad gyvūnai nenugaištų ir nepatirtų didelių kančių.

22. Kitus dozės dydžius reikėtų pasirinkti mažėjančia tvarka taip, kad būtų pastebėtas kiekvienas su doze susijęs atsakas ir būtų nustatyta nepastebėto neigiamo poveikio riba (NOAEL) arba aptikimo ribai artimas dozės dydis, kad pagal tai būtų galima nustatyti etaloninę dozę jautriausiai (-ioms) vertinamajai (-osioms) baigčiai (-ims). Kad intervalai tarp NOAEL ir LOAEL nebūtų dideli, dažniausiai optimalūs intervalai būna tokie, kuriais dozės didėja dukart arba keturiskart. Užuot palikus labai didelius intervalus tarp dozių (pvz., kai jos skiriasi daugiau kaip 10 kartų), geriau įtraukti ketvirtą bandymo grupę.

23. Kontrolinės grupės gyvūnai turėtų būti laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip ir bandomieji gyvūnai, išskyrus tai, kad jie neveikiami bandomąja chemine medžiaga. Ši grupė turėtų būti medžiagos negaunanti kontrolinė grupė arba nešiklį gaunanti kontrolinė grupė, jei bandomajai cheminei medžiagai duoti naudojamas nešiklis. Jei naudojamas nešiklis, kontrolinė grupė turėtų gauti nešiklio kiekį, atitinkantį didžiausią naudojamą nešiklio tūrį.

▼M5

Ribinis bandymas

24. Jeigu atliekant kartotinių dozių tyrimus negauta duomenų, kad ne mažiau kaip 1 000 mg/kg kūno masės/per dieną dozė yra toksiška, arba jeigu, remiantis duomenimis apie struktūriniu ir (arba) metaboliniu požiūriu giminingų cheminių medžiagų metabolines savybes, įskaitant *in vivo/in vitro* panašumą, toksiškumo neturėtų būti, kelių dydžių dozių tyrimo gali nereikėti. Tokiais atvejais išplėstinį toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymą galima atlikti su viena kontroline grupe ir viena ne mažiau kaip 1 000 mg/kg kūno masės/per dieną dydžio dozės grupe. Tačiau jeigu naudojant tokį dozės dydį pasireiškia toksiškumo dauginimuisi arba vystymuisi požymių, reikės toliau atlikti bandymus naudojant mažesnes dozes, kad būtų nustatytas NOAEL. Šios nuostatos dėl bandomos dozės ribų taikomos tik tada, kai, atsižvelgiant į žmogaus sąlytį su medžiaga, didesnių dozių naudoti nereikia.

PROCEDŪRA

Palikuonių veikimas

25. Geriausia dozes duoti kartu su pašaru. Reikėtų atkreipti dėmesį į tai, kad darant bandymus su zondu jaunikliai dažniausiai gauna bandomosios cheminės medžiagos netiesiogiai su pienu tol, kol, juos nujunkius, dozės jiems pradedamos duoti tiesiogiai. Jeigu bandymai daromi medžiagą dedant į pašarą arba geriamąjį vandenį, jaunikliai papildomai gauna bandomosios cheminės medžiagos tiesiogiai, kai paskutinę laktacijos laikotarpio savaitę pradeda ėsti patys. Jeigu bandomosios cheminės medžiagos į pieną patenka nedaug arba jeigu trūksta duomenų, kad palikuonys yra nepertraukiamai veikiami, galima svarstyti galimybę keisti tyrimo modelį. Tokiais atvejais, remiantis turima toksikokinetine informacija, toksiškumo palikuonims arba biologinių žymeklių pokyčių duomenimis (3) (4), reikėtų apsvarstyti galimybę laktacijos laikotarpiu dozes jaunikliams duoti tiesiogiai. Prieš pradedant tyrimus, per kuriuos dozės žindomiems jaunikliams būtų duodamos tiesiogiai, reikėtų atidžiai įvertinti naudą ir trūkumus (5).

Dozių davimo tvarkaraštis ir dozių davimas

26. Tam tikros informacijos apie rujos ciklus, patinėlių ir patelių dauginimosi trakto histopatologinę ir sėklidžių ir (arba) antsėklidžių spermos analizę galima gauti iš ankstesnių atitinkamos trukmės kartotinės dozės toksiškumo tyrimų. Todėl atliekant išplėstinį toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymą bandymo trukmė iki suporavimo pasirenkama tokia, kad būtų galima nustatyti poveikį funkciniams pokyčiams, kurie gali sutrikdyti elgseną poravimosi metu ir vaisingumą. Dozės iki poravimosi turėtų būti duodamos pakankamai ilgai, kad P patelės ir patinėliai būtų veikiami pastoviosios būsenos sąlygomis. Dažniausiai 2 savaičių iki poravimosi dozių davimo trukmė abiem lytims yra laikoma pakankama. Kai tiriamos patelės, šis laikotarpis apima 3–4 rujos ciklus ir turėtų būti pakankamas neigiamam poveikiui rujos ciklišKumui nustatyti. Kai tiriami patinėliai, tokia trukmė atitinka bręstančių spermatozoidų tranzito į antsėklidžius laikotarpį ir turėtų padėti nustatyti poveikį spermai jai pasigaminus sėklidėse (paskutiniais spermos išskyrimo ir brendimo antsėklidžiuose etapais). Iki bandymo nutraukimo, kai yra suplanuota atlikti sėklidžių ir antsėklidžių histopatologinę ir spermos parametrų analizę, P ir F_1 gyvūnai bus turėję sąlytį su medžiaga bent vieną ištisą spermatogeninį ciklą ((6) (7) (8) ir EBPO Rekomendacinis dokumentas Nr. 151 (40)).

▼M5

27. Patinėlių sąlyčio su medžiaga scenarijus iki poravimosi galima keisti, jeigu per ankstesnius tyrimus buvo aiškiai nustatytas toksiškumas sėklidėms (pablogėjo spermatogenezė) arba pasireiškė poveikis spermos vientisumui ir funkcionalumui. Panašiai patelių atveju – turint duomenų apie bandomosios cheminės medžiagos poveikį rujos ciklui, kartu ir lytiniam jautrumui, gali būti pagrįsta rinktis kitokius sąlyčio su medžiaga iki poravimosi scenarijus. Ypatingais atvejais galima leisti dozes P patelėms pradėti duoti tik jau gavus teigiamus tepinėlio reakcijos į spermą rezultatus (žr. EBPO Rekomendacinį dokumentą Nr. 151 (40)).

28. Nustačius dozių davimo iki poravimosi trukmę, gyvūnams bandomosios cheminės medžiagos duodama nepertraukiamai po 7 dienas per savaitę iki pat nekroskopijos. Visiems gyvūnams dozės turėtų būti duodamos tokiu pat metodu. Dozės duodamos 2 savaites poravimosi laikotarpiu ir P patelėms – gestacijos bei laktacijos laikotarpiu iki bandymo nutraukimo, kai jaunikliai nujunkomi. Patinėliams dozės duodamos tokiu pačiu būdu iki bandymo nutraukimo, kai F_1 gyvūnai nujunkomi. Nekroskopija pirmiau atliekama patelėms, jų nekroskopiją reikėtų atlikti tą pačią ar panašią laktacijos laikotarpio dieną. Patinėlių nekroskopiją galima išdėstyti didesniam dienų skaičiui pagal laboratorijos galimybes. Jeigu laktacijos laikotarpiu dozės nepradėtos duoti tiesiogiai, jas reikėtų pradėti tiesiogiai duoti pasirinktiems F_1 patinėliams ir patelėms nujunkymo laikotarpiu ir toliau duoti iki suplanuotos nekroskopijos dienos pagal kohortos gyvūnų paskirstymo tvarką.

29. Jei cheminės medžiagos duodamos su pašarais ar geriamuoju vandeniu, svarbu garantuoti, kad naudojamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis netrikdytų normalios mitybos arba gėrimo pusiausvyros. Kai bandomoji cheminė medžiaga duodama su pašaru, jos dozė gali būti išreiškiama kaip pastovi koncentracija pašaruose (ppm) arba kaip pastovus dozės dydis pagal gyvūno kūno masės vienetą; pasirinktą variantą reikėtų nurodyti.

30. Kai bandomoji cheminė medžiaga duodama per zondą, vienu metu duodamo skysčio tūris paprastai neturėtų viršyti 1 ml/100 g kūno masės (0,4 ml/100 g kūno masės yra didžiausias kiekis naudojant aliejų, pvz., kukurūzų). Išskyrus dirginančias arba ėsdinančias cheminės medžiagas, kurios esant didesnei koncentracijai turi sunkesnį poveikį, bandomojo tirpalo tūrio nepastovumas turi būti kiek įmanoma sumažintas keičiant koncentraciją taip, kad visų dozių tūris būtų pastovus. Dozė turėtų būti duodama kiekvieną dieną panašiu laiku. Dozė kiekvienam gyvūnui paprastai turėtų būti nustatoma atsižvelgiant į patį paskutinį jo svėrimą; suaugusių patinėlių ir suaugusių nevaikingų patelių dozė koreguojama bent kas savaitę, vaikingų patelių ir F1 gyvūnų iki atjunkymo ir 2 savaites po atjunkymo – kas dvi dienas. Jeigu iš toksikokinetinių duomenų matyti, kad bandomosios cheminės medžiagos per placentą perduodama mažai, per zondą duodamos dozės dydį paskutinę gestacijos savaitę gali tekti pakoreguoti, kad patelei nebūtų duodama pernelyg toksiška dozė. Patelėms, kurioms dozės duodamos per zondą arba kitu būdu, kurį taikant gyvūnus reikia liesti, jauniklių atsivedimo dieną dozės duoti nereikėtų; tą dieną bandomosios cheminės medžiagos geriau neduoti, kad nebūtų sutrikdytas jauniklių atsivedimo procesas.

▼M5

Poravimas

31. Kiekviena P patelė uždaroma į narvelį su vienu atsitiktine tvarka atrinku ir nesusijusiu tą pačią dozę gaunančiu patinėliu (1:1 poravimas) tol, kol jie susiporuoja, arba 2 savaitėms. Jeigu patinėlių nepakanka, pavyzdžiui, dėl to, kad patinėliai nugaišo iki suporavimo, tada jau suporuotas (-i) patinėlis (-iai) poruojamas (-i) (1:1) su antra (kitomis) patele (-ėmis) taip, kad visos patelės būtų suporuotos. 0 gestacijos diena apibrėžiama kaip diena, kurią pasitvirtina susiporavimo faktas (randama spermos arba makšties kamštis). Gyvūnus reikėtų iš karto atskirti, kai tik pastebima, kad gyvūnai susiporavo. Jeigu per 2 savaites gyvūnai nesusiporuoja, juos reikėtų atskirti ir nebebandyti jų suporuoti. Duomenyse suporuotos poros turi būti aiškiai pažymėtos.

Vados dydis

32. Praėjus 4 dienoms po atsivedino, kiekvienos vados dydis gali būti koreguojamas pašalinant perteklinį prieauglį atrankos būdu taip, kad kiekvienoje vadoje, kiek tai yra įmanoma, liktų penki patinėliai ir penkios patelės. Selektyvus jauniklių pašalinimas, pvz., pagal kūno masę, nepriimtinas. Jei neįmanoma vienoje vadoje turėti po penkis kiekvienos lyties palikuonis, priimtinas dalinis palikuonių skaičiaus koregavimas (pvz., šeši patinėliai ir keturios patelės).

Jauniklių atrinkimas tyrimams po nujunkymo (žr. 1 schemą)

33. Nujunkymo metu (apie 21 PND) iš visų turimų vadų po 20 jauniklių paskiriama į kiekvienos dozės grupę ir kontrolinę grupę ir laikomi tolesniems tyrimams iki lytinės brandos (nebent dar prieš tai reikėtų atlikti kokius nors tyrimus). Jaunikliai atrenkami atsitiktine tvarka, išskyrus tai, kad neturėtų būti imami akivaizdžiai silpniausi jaunikliai (gyvūnai, kurių kūno masė yra daugiau negu dviem standartiniais nuokrypiais mažesnė už atitinkamos vados jauniklių masės vidurkį), nes jie greičiausiai nėra reprezentatyvūs dozes gaunančios grupės pavyzdžiai.

21 PND atrinkti F_1 jaunikliai atsitiktine tvarka paskirstomi į tris gyvūnų kohortas:

1 kohorta (1A ir 1B) = toksiškumo dauginimuisi/vystymuisi bandymas;

2 kohorta (2A ir 2B) = neurotoksiškumo vystymuisi bandymas;

3 kohorta = imunotoksiškumo vystymuisi bandymas.

1A kohorta: po vieną patinėlį ir vieną patelę iš vados grupėje (20 kiekvienos lyties grupėje): prioritetinė atranka pirminiam poveikio dauginimosi sistemai ir bendrojo toksiškumo įvertinimui.

1B kohorta: po vieną patinėlį ir vieną patelę iš vados grupėje (po 20 kiekvienos lyties grupėje): prioritetinė atranka tolesniam dauginimosi sistemos veikimo vertinimui poruojant F_1 gyvūnus, kai šie įvertinami (žr. EBPO Rekomendacinį dokumentą Nr. 117 (39)), ir papildomiems histopatologiniams duomenims surinkti tais atvejais, kai įtariama, jog medžiaga yra toksiška dauginimosi arba endokrininei sistemai arba kai 1A pogrupio rezultatai yra nevienareikšmiai.

2A kohorta: iš viso 20 jauniklių grupėje (po 10 patinėlių ir 10 patelių grupėje; po vieną patinėlį arba vieną patelę iš vados) yra paskiriami neurobihevioristiniam bandymui atlikti, po kurio atliekamas jau suaugusių gyvūnų neurohistopatologinis tyrimas.

2B kohorta: iš viso 20 jauniklių grupėje (po 10 patinėlių ir 10 patelių grupėje; po vieną patinėlį arba vieną patelę iš vados) yra paskiriami neurohistopatologiniam vertinimui nujunkymo metu (21 arba 22 PND). Jeigu gyvūnų skaičius nepakankamas, pirmenybė teikiama 2A kohortai.

▼M5

3 kohorta: iš viso 20 jauniklių grupėje (po 10 patinėlių ir 10 patelių grupėje; po vieną iš vados, jei įmanoma). Iš kontrolinės grupės 56-ą (± 3) PND gali tekti paimti papildomus jauniklius, kurie būtų panaudoti kaip nuo T ląstelių priklausomų antikūnų atsako analizės (angl. TDAR) teigiamos kontrolės grupės gyvūnai.

34. Jeigu gyvūnų skaičiaus nepakanka visų kohortų tikslams, pirmenybė tiekiama 1 kohortai, nes jos gyvūnus galima panaudoti F_2 gyvūnų kartai gauti. Pagal konkrečius poreikius, pvz., jeigu įtariama, kad cheminė medžiaga yra neurotoksiška, imunotoksiška arba toksiškai veikia dauginimąsi, į bet kurią iš kohortų galima paskirti papildomus jauniklius. Šiuos jauniklius galima panaudoti tyrimams skirtingais laiko momentais atlikti arba papildomoms vertinamosioms baigtims įvertinti. Į kohortas nepaskirti jaunikliai perduodami klinikiniams biocheminiams tyrimams (55 punktas) ir bendrajai nekroskopijai (68 punktas) atlikti.

P gyvūnų antrasis poravimas

35. Paprastai P gyvūnus antrą kartą poruoti nerekomenduojama, nes taip prarandama svarbi informacija apie pirmos vados implantacijos vietų skaičių (taigi prarandami poimplantacinių ir perinatalinių nuostolių duomenys, galimo teratogeninio poveikio rodikliai). Jeigu reikia patikrinti arba išsiaiškinti poveikį veikiamoms patelėms, tyrimą geriau pratęsti ir poruoti F_1 kartos gyvūnus. Tačiau visada galima antrą kartą poruoti P patinėlius ir pateles, su kuriomis bandymai dar neatlikti, ir taip patikslinti nevienareikšmius rezultatus arba išsamiau apibrėžti per pirmą poravimą pastebėtą poveikį vaisingumui.

GYVŲ GYVŪNŲ STEBĖJIMAI

Klinikiniai stebėjimai

36. P ir atrinktų F_1 gyvūnų bendrieji klinikiniai stebėjimai atliekami kartą per dieną. Jeigu dozės duodamos per zondą, klinikinius stebėjimus reikėtų atlikti prieš duodant dozę ir po to (stebint, ar nėra toksiškumo požymių, susijusių su didžiausia koncentracija plazmoje). Turi būti užrašomi visi su tuo susiję elgesio pokyčiai, sunkaus arba ilgesnio jauniklių atsivedimo proceso požymiai ir visi toksiškumo požymiai. Du kartus per dieną, o savaitgaliais – vieną kartą per dieną, visi gyvūnai stebimi, ar nepasireiškia didelio toksiškumo požymių, ar gyvūnai negaišta ir ar nėra nugaišę.

37. Kas savaitę turėtų būti atliekamas papildomas išsamesnis kiekvieno P ir F_1 gyvūno (po nujunkymo) tyrimas, jį patogu daryti tuo pačiu metu, kai gyvūnas sveriamas, kad gyvūnui būtų keliama kuo mažiau streso dėl jo lietimo. Stebėjimai turėtų būti kruopščiai atliekami ir registruojami, tam naudojant bandymų laboratorijos nustatytas vertinimo balais sistemas. Turi būti imamasi priemonių, garantuojančių kuo mažesnį bandymo sąlygų kitimą. Stebėjimas turi apimti odos, kailio, akių, gleivinės pakitimų, išskyrų, išmatų, autonominio aktyvumo (pvz., ašarojimo, plaukų pašiaušimo, vyzdžio dydžio, neįprasto kvėpavimo) registravimą, bet neturi tuo apsiriboti. Reikėtų registruoti eisenos, pozos, reakcijos į lietimą pakitimus, kloninių ar toninių judesių atsiradimą bei stereotipinį (pvz., besaikį valymąsi, pasikartojantį sukimąsi ratu) ar keistą (pvz., savęs luošinimą, vaikščiojimą atbulomis) elgesį.

▼M5

Kūno masė ir pašaro bei vandens suvartojimas

38. P gyvūnai sveriami pirmąją dozės davimo dieną ir vėliau mažiausiai kartą per savaitę. P patelės laktacijos laikotarpiu sveriamos tomis pačiomis dienomis kaip ir vada (žr. 44 punktą). Kiekvienas F_1 gyvūnas atskirai pasveriamas pradėjus nujunkymą (21 PND) ir vėliau sveriamas mažiausiai kartą per savaitę. Kūno masė taip pat užrašoma tą dieną, kai gyvūnai lytiškai subręsta (baigia atsiskirti apyvarpė ir aiškiai susiformuoja makštis). Visi gyvūnai pasveriami numarinimo dieną.

39. Per tyrimą pašaro ir vandens (jei bandomoji cheminė medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu) suvartojimas užrašomas bent kartą per savaitę tą pačią dieną, kurią gyvūnas sveriamas (išskyrus tuos atvejus, kai gyvūnai laikomi kartu). Kiekvieno narvelio F_1 gyvūnų pašaro suvartojimas užrašomas kiekvieną savaitę nuo tada, kai gyvūnai suskirstomi į atitinkamas kohortas.

Rujos ciklai

40. Pirminės informacijos apie su bandomąja chemine medžiaga susijusį poveikį rujos ciklui gali būti turima iš ankstesnių kartotinių dozių toksiškumo tyrimų ir ja galima pasinaudoti rengiant konkrečios bandomosios cheminės medžiagos išplėstinio toksiškumo vienos kartos dauginimuisi tyrimo protokolą. Paprastai rujos ciklišKumo vertinimas (pagal makšties citologiją) prasideda dozių davimo laikotarpio pradžioje ir tęsiasi tol, kol pasitvirtina susiporavimas arba baigiasi 2 savaičių poravimosi laikotarpis. Jeigu prieš tyrimą buvo atliktas patelių atrankos bandymas tikrinant, ar rujos ciklai yra normalūs, tuomet pradėjus tyrimą naudinga toliau imti tepinėlius; tačiau jeigu tyrimo pradžioje kyla abejonių dėl nebūdingo poveikio (pavyzdžiui, nuo pat pradžių pastebimai sumažėja pašaro suvartojimas), prieš pradedant likus dviem savaitėms iki poravimosi tirti tepinėlius, gyvūnams galima leisti adaptuotis prie dozių davimo, bet ne ilgiau kaip dvi savaites. Jeigu patelės tyrimo laikotarpis dėl to prasitęsia (t. y. iki 4 savaičių iki poravimosi), reikėtų apsvarstyti galimybę įsigyti jaunesnius gyvūnus ir pratęsti patinėlių tyrimo iki poravimosi laikotarpį. Makšties ar gimdos kaklelio ląstelės turi būti imamos atsargiai, kad nebūtų pažeista gleivinė ir dėl to nebūtų sukeltas pseudovaikingumas (10) (11).

41. 1A kohortos F_1 patelių makšties tepinėlius reikėtų tirti kasdien nuo makšties susiformavimo pradžios tol, kol bus pastebėtas pirmas kornifikuotas tepinėlis, tam, kad būtų galima nustatyti laiko intervalą tarp šių dviejų momentų. 1A kohortos F_1 patelių rujos ciklus taip pat reikėtų stebėti dvi savaites nuo maždaug 75 PND. Be to jeigu F_1 kartos gyvūnus reikia poruoti, 1B kohortos patelių makšties citologiją reikės stebėti nuo gyvūnų uždarymo poromis iki susiporavimo požymių atsiradimo.

Poravimas ir gestacija

42. Be standartinių rodiklių (pvz., kūno masės, pašaro suvartojimo, klinikinių stebėjimų, įskaitant tikrinimą, ar gyvūnai negaišta ir (arba) ar nenugaišo), užrašomos gyvūnų patalpinimo poromis datos, inseminacijos data ir jauniklių atsivedimo data, prekoitalinis intervalas (nuo susiporavimo iki inseminacijos), apskaičiuojama gestacijos trukmė (nuo inseminacijos iki jauniklių atsivedimo). P pateles numatomo jauniklių atsivedimo dieną reikėtų atidžiai ištirti, ar nėra distocijos požymių. Reikėtų užrašyti visas guolio sukimo arba žindymo anomalijas.

▼M5

43. Jauniklių atsivedimo diena patelei yra 0 laktacijos diena (0 LD), o palikuoniui – 0 postnatalinė diena (0 PND). Dar visus palyginimus galima atlikti pagal postkoitalinį laiką, siekiant pašalinti postnatalinio vystymosi duomenų iškraipymą dėl skirtingos gestacijos laikotarpio trukmės; taip pat reikėtų užrašyti sąlyginį jauniklių atsivedimo laiką. Tai ypač svarbu, kai bandomoji cheminė medžiaga veikia gestacijos trukmę.

Palikuonių parametrai

44. Kiekviena vada tiriama kuo greičiau po atsivedimo (0 arba 1-ą laktacijos dieną) norint nustatyti jauniklių skaičių ir lytį, negyvagimius, gyvagimius, tai, ar nėra didelių anomalijų (matomų išorinių anomalijų, įskaitant gomurio nesuaugimą, ar nėra poodinių kraujosrūvų, ar odos spalva arba tekstūra yra normali, ar nėra bambagyslės, ar netrūksta pieno, ar nėra išdžiuvusio sekreto). Be to, atliekant pirmuosius klinikinius naujagimių tyrimus reikėtų kokybiškai įvertinti kūno temperatūrą, aktyvumą, reakciją į lietimą. 0 PND arba vėliau rasti negyvi jaunikliai tiriami galimiems defektams ir nugaišimo priežasčiai nustatyti. Gyvi jaunikliai suskaičiuojami ir atskirai pasveriami 0 PND arba 1 PND, o vėliau – reguliariai, pvz., 4, 7, 14, ir 21 PND. Klinikinius tyrimus, atliekamus pagal gyvūnų amžių, reikėtų kartoti, kai palikuonys yra sveriami, arba dažniau, jeigu konkrečiais atvejais palikuonių atsivedimo metu buvo gauta specifinių duomenų. Stebėjimai turi apimti išorines anomalijas, odos, kailio, akių, gleivinių pokyčius, sekrecijų ir ekskrecijų dažnį ir autonominį aktyvumą, bet neturi tuo apsiriboti. Taip pat turi būti registruojami eisenos pokyčiai, laikysena ir reakcija į elgesį su gyvūnu, kloniniai ar toniniai judesiai, stereotipinis ar keistas elgesys.

45. Bent vieną kartą tarp 0 PND ir 4 PND kiekvienam jaunikliui reikėtų pamatuoti anogenitalinį atstumą (angl. AGD). Jauniklio kūno masės duomenis reikėtų surinkti tą dieną, kurią matuojamas anogenitalinis atstumas; paprastai anogenitalinis atstumas turėtų atitikti jauniklio dydį, geriausia, jei jo reikšmė būtų lygi skaičiui, gautam iš kūno masės skaičiaus ištraukus kubinę šaknį (12). 12 arba 13 PND reikėtų tikrinti, ar vyriškos lyties jaunikliai turi spenelius ir (arba) areoles.

46. Visi pasirinkti F_1 gyvūnai kasdien vertinami – tikrinama, ar patinėlių varpos galva ir apyvarpė neatsiskyrė ir ar patelių makštis nesusiformavo iki numatytos šių vertinamųjų baigčių atsiradimo dienos, siekiant nustatyti, ar lytinis brendimas nėra ankstyvas. Reikėtų pažymėti visas lyties organų anomalijas, pavyzdžiui, ištisinį makšties kamštį, hipospadiją arba nesuaugusią varpą. F_1 gyvūnų lytinis subrendimas lyginamas su fiziniu išsivystymu – nustatoma, kokio amžiaus yra gyvūnas, kai atsiskiria patinėlių varpos galva ir apyvarpė, susiformuoja patelių makštis (13).

Galimo neurotoksiškumo vystymuisi vertinimas (2A ir 2B kohortos)

47. Neurotoksiškumui įvertinti iš kiekvienos dozės gaunančios grupės paimama po 10 2A kohortos patinėlių ir patelių ir po 10 2B kohortos patinėlių ir patelių (kiekvieną kohortą sudaro po 1 patinėlį arba 1 patelę iš vados; iš kiekvienos vados paimama bent po 1 jauniklį; atrenkama atsitiktine tvarka). Su 2A kohortos gyvūnais atliekami reakcijos į garsinius dirgiklius, funkcinių stebėjimų bandymų rinkinio bandymai, atliekamas motorinio aktyvumo (žr. 48–50 punktus) ir neuropatologiniai vertinimai

▼M5

(žr. 74–75 punktus). Reikėtų stengtis užtikrinti, kad bandymo sąlygos kuo mažiau skirtųsi ir nebūtų sistemiškai susietos su dozių davimu. Tarp kintamųjų, kurie gali paveikti elgseną yra: garso lygis (pvz., nepertraukiamas triukšmas), temperatūra, drėgmė, apšvietimas, kvapai, paros laikas, aplinkos dirgikliai. Neurotoksiškumo tyrimų rezultatus reikėtų aiškinti atsižvelgiant į atitinkamus ankstesnius kontrolinius etaloninius intervalus. 2B kohortos gyvūnus reikėtų naudoti neuropatologiniam vertinimui atlikti 21 PND arba 22 PND (žr. 74–75 punktus).

48. Bandymą su garsiniais dirgikliais reikėtų atlikti 24 PND (± 1 diena) su 2A kohortos gyvūnais. Bandomosios ir kontrolinės grupių bandymo dieną reikėtų suderinti. Kiekvieną sesiją sudaro 50 bandymų. Atliekant garsinių dirgiklių bandymą nustatomas kiekvieno bloko reakcijos, pažymėtos per 10 bandymų (5 blokai po 10 bandymų), amplitudės vidurkis, bandymo sąlygos optimizuojamos, kad būtų sudaryta galimybė priprasti prie sesijos sąlygų. Šios procedūros turėtų atitikti bandymų metodą B.53 (35).

49. Reikiamu laiku tarp 63 ir 75 PND su 2A kohortos gyvūnais atliekami funkcinių stebėjimų bandymų rinkinio bandymai ir automatizuotas motorinio aktyvumo bandymas. Šios procedūros turėtų atitikti bandymų metodus B.43 (33) ir B.53 (35). Funkcinių stebėjimų bandymų rinkinį sudaro nuodugnus subjekto išvaizdos, elgesio ir funkcinio vientisumo apibūdinimas. Šie vertinimai atliekami gyvūnus stebint narveliuose, kuriuose jie laikomi nuolat, perkėlus į standartiškai įrengtą stebėjimo (atvirą) vietą, kur gyvūnai gali laisvai judėti, ir atliekant manipuliacinius bandymus. Bandymai pradedami nuo mažiausiai interaktyvių ir baigiami interaktyviausiais. Vertinamų rodiklių sąrašas pateiktas 1 priedėlyje. Visus gyvūnus turėtų atidžiai stebėti parengti ir gyvūnų statuso bandyme nežinantys stebėtojai, taikydami standartizuotas procedūras, kad rezultatų skirtumai dėl skirtingų stebėtojų būtų kuo mažesni. Būtų gerai, kad, jeigu įmanoma, per vieną bandymą gyvūnus vertintų tas pats stebėtojas. Jeigu tai neįmanoma, būtina patikrinti, ar skirtingų stebėtojų rezultatai yra patikimi. Kiekvieno elgesio parametro bandymų rinkinio bandymuose turi būti naudojamos praktiniame darbe nustatytos skalės ir vertinimo balais kriterijai. Jeigu galima, stebimoms vertinamosioms baigtims vertinti reikėtų naudoti objektyvius kiekybinius matus, tarp jų – subjektyvų skirstymą. Vertinant motorinį aktyvumą bandymai su kiekvienu gyvūnu atliekami atskirai. Bandymo sesija turėtų trukti pakankamai ilgai, kad būtų galima matyti, jog kontrolinės grupės gyvūnai priprato prie bandymo sesijos sąlygų. Motorinis aktyvumas turėtų būti stebimas naudojant automatinį aktyvumo fiksavimo prietaisą, kuriuo turi būti galima nustatyti ir aktyvumo padidėjimą, ir sumažėjimą (t. y. pradinė prietaisu matuojamo aktyvumo reikšmė neturėtų būti labai maža – tokia, kad nebūtų galima nustatyti jo sumažėjimo, arba labai didelė – tokia, kad nebūtų galima nustatyti aktyvumo padidėjimo). Kiekvieną prietaisą reikėtų patikrinti pagal standartines procedūras, siekiant, kiek įmanoma, užtikrinti patikimą skirtingų prietaisų veikimą visomis dienomis. Prietaisus bandomosioms grupėms reikėtų paskirstyti kuo proporcingiau. Bandymų laiką bandomosioms grupėms reikėtų paskirstyti proporcingai, kad būtų išvengta rezultatų iškraipymo dėl cirkadinio aktyvumo ritmo.

50. Jeigu iš turimos informacijos matyti, kad reikia atlikti kitus funkcinius bandymus (pvz., jutiminių, socialinių, kognityvinių funkcijų), šiuos bandymus reikėtų įtraukti nepažeidžiant kitų per tyrimą atliekamų vertinimų vientisumo. Jeigu šie bandymai atliekami su tais pačiais gyvūnais, kurie buvo naudoti atliekant standartinius bandymus su garsiniais dirgikliais, funkcinių stebėjimų bandymų rinkinio ir motorinio aktyvumo bandymus, reikėtų suplanuoti kitokius bandymus, kad kuo labiau sumažėtų šių bandymų rezultatų iškraipymo rizika. Papildomi bandymai gali būti ypač naudingi, kai praktiniai stebėjimai, numatomas poveikis arba elgsenos mechanizmo/būdo duomenys atskleidžia specifinį neurotoksiškumo pobūdį.

▼M5

Galimo imunotoksiškumo vystymuisi vertinimas (3 kohorta)

51. 56 (± 3 dienos) PND iš kiekvienos bandomosios grupės po dešimt 3 kohortos patinėlių ir patelių (po 1 patinėlį arba 1 patelę iš vados; iš kiekvienos vados bent po 1 jauniklį; atrinktų atsitiktine tvarka) panaudojami nuo T ląstelių priklausomų antikūnų atsako analizei, t. y. pirminio IgM antikūnų atsako į nuo T ląstelių priklausomus antigenus, pavyzdžiui, avių raudonuosius kraujo kūnelius (angl. *Sheep Red Blood Cells (SRBC*)) arba moliuskų hemocianiną (angl. *Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH*)), atsižvelgiant į vykdomas imunotoksiškumo bandymo procedūras, analizei (14) (15). Atsaką galima vertinti skaičiuojant specialias ląstelių plokšteles (angl. PFC) blužnyje arba nustatant SRBC arba KLH būdingus IgM antikūnus serume ELISA metodu tuo metu, kai atsakas yra stipriausias. Atsakas dažniausiai būna stipriausias ketvirtą (atsakas pagal PFC metodą) arba penktą (ELISA) dieną po intraveninės imunizacijos. Kai pirminis antikūnų atsakas yra tiriamas skaičiuojant ląstelių plokšteles, gyvūnų pogrupius leidžiama vertinti skirtingomis dienomis, jeigu: gyvūnų pogrupiai imunizuojami ir gyvūnai numarinami taip, kad ląstelių plokštelės būtų skaičiuojamos tada, kai atsakas yra stipriausias; pogrupiuose turi būti po vienodą vyriškos ir moteriškos lyties palikuonių skaičių iš visų dozės grupių, įskaitant kontrolinę grupę; vertinami maždaug tokio paties postnatalinio amžiaus pogrupių gyvūnai.Sąlytis su bandomąja chemine medžiaga tęsis tol, kol liks viena diena iki blužnies paėmimo PFC tyrimui arba serumo paėmimo ELISA tyrimui.

Tolesnis galimo toksiškumo dauginimuisi vertinimas (1B kohorta)

52. 1B kohortos gyvūnus galima laikyti tyrimui ilgiau negu 90 PND ir, jei reikia, juos sukergti, kad būtų gauta F_2 karta. Tos pačios dozės grupės patinėliai ir patelės uždaromi kartu (stengiantis nesuporuoti tų pačių tėvų palikuonių) ir laikomi dvi savaites nuo 90 PND arba vėlesnės dienos, bet ne vėliau kaip nuo 120 PND. Procedūra tokia pati, kokia taikyta P gyvūnams. Tačiau, atsižvelgiant į įrodomosios vertės analizę, vadas gali pakakti numarinti 4 PND, užuot jas laikius iki nujunkymo ir ilgiau.

GALUTINIAI STEBĖJIMAI

Klinikinė biochemija/hematologija

53. Stebima, ar P gyvūnams nepasireiškia sisteminis poveikis. Nutraukus bandymą, iš nustatytos vietos paimami atsitiktine tvarka atrinktų – po dešimt iš vienos dozės grupės – numarintų nešertų P kartos vienos dozės grupės patinėlių ir patelių kraujo mėginiai; šie mėginiai saugomi reikiamomis sąlygomis, atliekami daliniai arba išsamūs jų hematologiniai, klinikiniai biocheminiai, T4 ir TSH tyrimai, kiti tyrimai pagal žinomą bandomosios cheminės medžiagos poveikio pobūdį (žr. EBPO Rekomendacinį dokumentą Nr. 151 (40)). Turėtų būti tiriami šie hematologiniai parametrai: hematokrito vertė, hemoglobino koncentracija, eritrocitų skaičius, bendras leukocitų skaičius ir leukocitų formulė, trombocitų skaičius ir kraujo krešėjimo laikas/geba. Plazmoje arba serume tiriama: gliukozė, bendras cholesterolis, šlapalas, kreatininas, bendras baltymas ir albuminas, mažiausiai du fermentai, rodantys poveikį kepenų ląstelėms (tokie kaip alaninaminotransferazė, aspartataminotransferazė, šarminė fosfatazė, gamaglutamiltranpeptidazė ir sorbitoldehidrogenazė). Tam tikromis aplinkybėmis papildomi fermentų ir tulžies rūgščių tyrimai gali suteikti naudingos

▼M5

informacijos. Be to, iš visų gyvūnų paimtą kraują galima saugoti, jei prireiktų jo analizės vėliau, norint išsiaiškinti neaiškų poveikį arba gauti duomenų apie sąlytį su medžiaga organizmo viduje. Jeigu P gyvūnų antros kartos poruoti neketinama, kraujo mėginiai paimami prieš pat numarinimą arba numarinimo metu. Jeigu gyvūnai paliekami, kraujo mėginius reikėtų paimti prieš kelias dienas iki poravimo antrą kartą. Jeigu iš turimų kartotinių dozių bandymų duomenų matyti, kad bandomoji cheminė medžiaga to parametro neveikia, prieš bandymą nutraukiant reikėtų atlikti šlapimo tyrimus, per kuriuos įvertinami šie parametrai: išvaizda, tūris, osmoliališkumas ar santykinis tankis, pH, baltymai, gliukozė, kraujas ar kraujo ląstelės, ląstelių liekanos. Šlapimo mėginius taip pat galima surinkti tam, kad būtų galima stebėti, ar į jį pateko bandomoji cheminė medžiaga ir (arba) jos metabolitas (-ai).

54. Taip pat stebima, ar F_1 gyvūnams nepasireiškia sisteminis poveikis. Nutraukus bandymą, iš atsitiktine tvarka atrinktų – po dešimt iš vienos dozės grupės – nešertų 1A kohortos patinėlių ir patelių paimami kraujo mėginiai; šie mėginiai saugomi reikiamomis sąlygomis, atliekami standartiniai klinikiniai biocheminiai tyrimai, taip pat vertinamas skydliaukės hormonų lygis serume (T4 ir TSH), atliekamas hematologinis tyrimas (bendras leukocitų skaičius, leukocitų formulė, eritrocitų skaičius), tiriamas šlapimas.

55. 4 PND atliekama nebereikalingų jauniklių bendroji nekroskopija, matuojama skydliaukės hormono (T4) koncentracija serume. Jei reikia, vienos vados gimusių jauniklių (4 PND) kraują galima tirti kartu, atliekant biocheminius/skydliaukės hormonų tyrimus. Taip pat paimama nujunkytų gyvūnų, kuriems 22 PND atliekama bendroji nekroskopija (į pogrupius neatrinktų F_1 gyvūnų), kraujo T4 ir TSH analizei atlikti.

Spermos parametrai

56. Matuojami visų P kartos patinėlių spermos parametrai, išskyrus tuos atvejus, kai turima duomenų, kad per 90 dienų tyrimą spermos parametrai nebuvo paveikti. Reikėtų patikrinti visų A1 kohortos patinėlių spermos parametrus.

57. Nutraukus bandymą, užrašoma visų P ir F_1 patinėlių (1A kohorta) sėklidžių ir antsėklidžių masė. Bent viena sėklidė ir vienas antsėklidis paliekamas histopatologiniam tyrimui. Likęs antsėklidis panaudojamas antsėklidžio uodegoje esantiems spermos rezervams suskaičiuoti (16) (17). Spermatozoidai iš antsėklidžio uodegos (arba sėklinio latako) surenkami taikant metodus, kuriais kuo mažiau būtų trukdoma įvertinti spermos judrumą ir morfologiją (18).

58. Spermatozoidų judrumą galima vertinti iš karto po numarinimo arba analizę galima atlikti vėliau. Vis judresnių spermatozoidų procentinę dalį galima nustatyti subjektyviai arba objektyviai pasitelkiant kompiuterinę judrumo analizę (19) (20) (21) (22) (23) (24). Vertinant spermos morfologiją, spermos mėginiai iš antsėklidžio uodegos (arba sėklinio latako) ištiriami kaip fiksuoti preparatai bei skystoje terpėje (25) ir bent po 200 vieno mėginio spermatozoidų suskirstomi į normalius (normali ir galvutė, ir jungiančioji dalis/uodegėlė) ir nenormalius. Morfologinės spermatozoidų anomalijos būtų spermatozoidų sulipimas, izoliuotos galvutės ir deformuotos galvutės ir (arba) uodegėlės (26). Deformuotos arba didelės spermatozoidų galvutės gali būti spermos išskyrimo defektų požymis.

59. Jeigu per nekroskopiją spermos mėginiai užšaldomi, tepinėliai fiksuojami ir spermos judrumo vaizdo analizė užrašoma (27), vėlesnę analizę galima atlikti tik su kontrolinės grupės arba dideles dozes gavusiais patinėliais. Tačiau jeigu pastebimas su dozės davimu susijęs poveikis, reikėtų įvertinti ir mažesnių dozių grupes.

▼M5

Bendroji nekroskopija

60. Nutraukus bandymą arba darant bandymą anksčiau nugaišusiems P ir F_1 gyvūnams atliekama nekroskopija ir makroskopiškai patikrinamos visos struktūrinės anomalijos arba patologiniai pakitimai. Ypatingas dėmesys skiriamas dauginimosi sistemos organams. Humaniškai numarinti gaištantys jaunikliai ir nugaišę jaunikliai, jei nemaceruoti, tiriami galimiems defektams ir nugaišimo priežasčiai nustatyti, vėliau užkonservuojami.

61. Suaugusioms P ir F_1 patelėms yra tiriamas makšties tepinėlis nekroskopijos dieną siekiant nustatyti rujos ciklo etapą ir sulyginti su dauginimosi organų histopatologiniais duomenimis. Visų P (ir, jei reikia, F_1) patelių gimda yra tiriama implantavimo vietų buvimui ir skaičiui nustatyti, stengiantis nepakenkti histopatologiniam įvertinimui.

Organų masė ir audinių konservavimas. P ir F_1 gyvūnai

62. Nutraukus bandymą, visų P ir F_1 suaugusių gyvūnų iš atitinkamų kohortų (kaip nurodyta toliau) kūno masę ir toliau išvardytų dar drėgnų organų masę po skrodimo reikia užrašyti kuo skubiau, kad nespėtų išdžiūti. Organai užkonservuojami reikiamomis sąlygomis. Jeigu nenurodyta kitaip, poriniai organai sveriami atskirai arba kartu, nuosekliai laikantis tyrimą atliekančios laboratorijos įprastai taikomos praktikos.

— Gimda (su kiaušintakiais ir kakleliu), kiaušidės.

— Sėklidės, antsėklidžiai (visas organas ir uodega, iš kur imti mėginiai spermatozoidams skaičiuoti).

— Prostata (ir dorsolateralinė, ir ventralinė skiltys kartu). Prostatos kompleksą išpjauti reikėtų labai atsargiai, stengiantis nepradurti skysčio pilnų pūslelių. Jeigu dozių davimas paveikė bendrą prostatos masę, dorsolateralinį ir ventralinį segmentus po fiksavimo reikėtų atsargiai atskirti ir atskirai pasverti.

— Sėklinės pūslelės su koaguliacijos liaukomis ir jų skysčiais (kaip vienas vienetas).

— Smegenys, kepenys, inkstai, širdis, blužnis, užkrūčio liauka, hipofizė, skydliaukė (po fiksavimo), antinksčių liaukos ir žinomi veikiami organai arba audiniai.

63. Be pirmiau išvardytų organų, atitinkamomis sąlygomis konservuojami periferinių nervų, raumenų, nugaros smegenų, akių ir regos nervo, skrandžio ir žarnyno sistemos, šlapimo pūslės, plaučių, trachėjos (su skydliauke ir prieskydine liauka), kaulų čiulpų, sėklinio latako (patinėlių), pieno liaukų (patinėlių ir patelių) ir makšties mėginiai.

64. Visi 1A kohortos gyvūnų organai pasveriami ir užkonservuojami histopatologiniam įvertinimui atlikti.

65. Prenataliniu ir postnataliniu laikotarpiais sukeltam imunotoksiniam poveikiui tirti iš kiekvienos dozės gaunančios grupės paimama po dešimt 1A kohortos patinėlių ir patelių (po 1 patinėlį arba patelę iš vados, iš kiekvienos vados paimama bent po 1 jauniklį, atrinktą atsitiktine tvarka) ir nutraukus bandymą tiriami šie dalykai:

— sveriami limfmazgiai, esantys arti sąlyčio su chemine medžiaga vietos, ir nutolę (papildomai, nes visų 1A kohortos gyvūnų antinksčių liaukos, užkrūčio liauka, blužnis jau būna pasverti);

▼M5

— blužnies limfocitų subpopuliacijos analizė (CD4+ ir CD8+ T limfocitai, B limfocitai, ląstelės – natūraliosios žudikės) panaudojant vieną blužnies dalį, kita blužnies dalis konservuojama histopatologiniam įvertinimui.

Neimunizuotų (1A kohortos) gyvūnų blužnies limfocitų subpopuliacijų analizė parodys, ar sąlytis yra susijęs su „padėjėjų“ (CD4+) arba citotoksinių (CD8+) užkrūčio liaukos išskirtų limfocitų arba ląstelių – natūraliųjų žudikių pasiskirstymo pokyčiais (sparčia reakcija į neoplastines ląsteles ir patogenus) esant imunologiškai stabiliai būsenai.

66. Iš 1B kohortos gyvūnų sveriami šie organai ir paruošiami šių atitinkamų audinių blokai:

— makštis (nesverta);

— gimda su kakleliu;

— kiaušidės

— sėklidės (bent viena);

— antsėklidžiai;

— sėklinės pūslelės ir koaguliacijos liaukos;

— prostata;

— hipofizė;

— nustatyti tiksliniai organai.

1B kohortos gyvūnų histopatologinį įvertinimą reikėtų atlikti, jeigu 1A kohortos gyvūnų tyrimo rezultatai yra nevienareikšmiai, arba tais atvejais, kai kyla įtarimų, kad medžiaga gali būti toksiška dauginimosi arba endokrininei sistemoms.

67. 2A ir 2B kohortos: neurotoksiškumo vystymuisi bandymai (21 arba 22 PND ir suaugusių palikuonių). 2A kohortos gyvūnai numarinami po elgsenos bandymo, galvos smegenų masė užrašoma, atliekama išsami neurohistopatologija neurotoksiškumui įvertinti. 2B kohortos gyvūnai numarinami 21 arba 22 PND, galvos smegenų masė užrašoma, atliekamas išsamus mikroskopinis galvos smegenų tyrimas neurotoksiškumui įvertinti. Perfuzinė fiksacija yra reikalaujama 2A kohortos gyvūnams, bet neprivaloma 2B kohortos gyvūnams, kaip numatyta pagal B.53 metodą (35).

Organų masė ir audinių konservavimas. F_1 nujunkyti gyvūnai

68. Į kohortas neatrinkti jaunikliai, taip pat silpniausi jaunikliai po nujunkymo, 22 PND, yra numarinami, nebent iš gautų rezultatų paaiškėja, kad reikia toliau tirti gyvus gyvūnus. Atliekama numarintų jauniklių bendroji nekroskopija, taip pat įvertinami jų dauginimosi organai, kaip aptarta 62 ir 63 punktuose.Iki 10 kiekvienos lyties iš kiekvienos grupės gyvūnų, priklausančių kuo įvairesnėms vadoms, galvos smegenys, blužnys ir užkrūčio liaukos turėtų būti pasveriamos ir laikomos reikiamomis sąlygomis. Be to, šių patinėlių ir patelių jauniklių pieno liaukų audinius reikėtų užkonservuoti tolesnei mikroskopinei analizei [1] (žr. EBPO Rekomendacinį dokumentą Nr. 151 (40)). Didelės anomalijos ir paveikti audiniai saugomi tam atvejui, jei prireiktų atlikti jų histopatologinį tyrimą.

[1] Tyrimai parodė, kad krūtų liaukos, ypač krūtų vystymasis ankstyvuoju gyvenimo laikotarpiu, yra jautri estrogeninio poveikio vertinamoji baigtis. Tvirtinant tinkamumą į bandymų metodą rekomenduota įtraukti abiejų lyčių jauniklių pieno liaukų vertinamąsias baigtis.

▼M5

Histopatologija. P gyvūnai

69. Daromi išsamūs histopatologiniai visų P gyvūnų, priklausančių kontrolinėms ir didelės dozės grupėms, organų, išvardytų 62 ir 63 punktuose, tyrimai. Dar tiriami mažesnių dozių grupių gyvūnų organai, kuriems pasireiškia su dozių davimu siejami pakitimai, kad būtų lengviau nustatyti NOAEL. Be to, daromas histopatologinis visų gyvūnų, kuriems įtariamas sumažėjęs vaisingumas, pvz., kurie negalėjo susiporuoti, pastoti, būti reproduktoriumi arba atsivesti sveikų palikuonių arba kurių rujos ciklas arba spermatozoidų skaičius, judrumas arba morfologija buvo paveikti, dauginimosi organų įvertinimas.

Histopatologija. F_1 gyvūnai

1 kohortos gyvūnai

70. Daromi išsamūs histopatologiniai visų 1A kohortos gyvūnų, priklausančių kontrolinėms ir didelės dozės grupėms, organų, išvardytų 62 ir 63 punktuose, tyrimai. Iš kiekvienos vados reikėtų paimti bent po vieną kiekvienos lyties jauniklį. Dar turėtų būti tiriami mažesnių dozių grupių gyvūnų organai ir audiniai, kuriems pasireiškia su dozių davimu siejami pakitimai, ir visi dideli pažeidimai, kad būtų lengviau nustatyti NOAEL. Vertinant prenataliniu ir postnataliniu laikotarpiais limfoidiniams organams sukeltą poveikį, reikėtų atlikti 1A kohortos 10 patinėlių ir 10 patelių limfmazgių ir kaulų čiulpų histopatologinį įvertinimą, šalia visiems 1A kohortos gyvūnams jau atlikto histopatologinio užkrūčio liaukos, blužnies, antinksčių liaukų įvertinimo.

71. Jeigu įtariama, kad medžiaga gali būti toksiška dauginimosi arba endokrininei sistemai, atliekamas visų 1B kohortos gyvūnų dauginimosi ir endokrininių audinių, paruoštų 66 punkte nurodytais blokais, histopatologinis tyrimas. 1B kohortos gyvūnų histopatologinis tyrimas atliekamas ir tada, kai 1A kohortos tyrimo rezultatai yra nevienareikšmiai.

72. Suaugusių patelių kiaušidėse turėtų būti pirmapradžių ir augančių folikulų, geltonkūnių; todėl atliekant histopatologinį tyrimą reikėtų stengtis F_1 patelių pirmapradžius ir mažus augančius folikulus bei geltonkūnius įvertinti kiekybiškai; gyvūnų skaičius, kiaušidžių pjūvio pasirinkimas ir pjūvio mėginių dydis turėtų statistiškai atitikti taikomą įvertinimo metodiką. Folikulus galima skaičiuoti pirmiausia imant kontrolinės ir didelės dozės grupių gyvūnus, ir jeigu juos tiriant pastebimas neigiamas poveikis, tada ištirti mažesnes dozes gavusius gyvūnus. Tyrimą sudaro pirminių folikulų skaičiavimas, taip pat galima skaičiuoti ir mažus augančius folikulus, kad būtų galima palyginti paveiktas ir kontrolines kiaušides (žr. EBPO Rekomendacinį dokumentą Nr. 151 (40)). Geltonkūnio vertinimą reikėtų atlikti lygiagrečiai rujos cikliškumo bandymui, kad vertinant būtų galima atsižvelgti į rujos ciklo etapą. Kiaušintakis, gimda ir makštis tiriami tikrinant atitinkamus organams būdingus vystymosi požymius.

73. Išsamus sėklidžių histopatologinis tyrimas atliekamas visiems F_1 patinėliams siekiant nustatyti su dozių davimu susijusį poveikį sėklidžių pokyčiams ir vystymuisi bei spermatogenezei (38). Jeigu įmanoma, reikėtų ištirti sėklidės kanalėlių pjūvius. Antsėklidžių galvutė, kūnas ir uodega bei sėkliniai latakai tiriami tikrinant atitinkamus organams būdingus vystymosi požymius ir reikalingus P patinėlių parametrus.

▼M5

2 kohortos gyvūnai

74. Neurohistopatologinis tyrimas atliekamas visiems didelės dozės grupės ir kontrolinės grupės 2A kohortos gyvūnams pagal lytį, užbaigus neurobihevioristinį bandymą (po 75 PND, bet ne vėliau kaip 90 PND). Smegenų histopatologinis tyrimas atliekamas visiems didelės dozės ir kontrolinės grupės 2B kohortos gyvūnams pagal lytis 21 arba 22 PND. Dar tiriami mažesnės ir vidutinės dozės grupių gyvūnų organai ir audiniai, kuriems pasireiškia su bandomąja medžiaga siejami pakitimai, kad būtų lengviau nustatyti NOAEL. 2A ir 2B kohortų gyvūnų smegenys tiriami įvairiais pjūviais, kad būtų galima ištirti uoslės svogūnėlius, smegenų žievę, hipokampą, bazalinius ganglijus, gumburą, pogumburį, vidurines smegenis (keturkalnį, smegenų dangtį ir smegenų kojytes), smegenų kamieną ir smegenėles. Tik 2A kohortos gyvūnams atliekami akių (tinklainės ir regos nervo), periferinio nervo, raumenų ir stuburo smegenų mėginių tyrimai. Visos neurohistologinės procedūros turėtų atitikti bandymų metodą B.53 (35).

75. Morfometrinius (kiekybinius) vertinimus reikėtų atlikti imant reprezentatyvias smegenų sritis (kruopščiai pagal mikroskopinius parametrus pasirinktus homologinius pjūvius), į juos galima įtraukti tiesinius ir (arba) zoninius konkrečių smegenų sričių matavimus. Kiekvienam parametro (lygiui) ištirti reikėtų imi bent tris pjūvius iš eilės, kad būtų galima pasirinkti vienalytiškiausią ir reprezentatyviausią konkrečios vertintinos smegenų srities pjūvį. Neuropatologas turėtų atitinkamai įvertinti, ar matavimams parengti pjūviai yra vienalytiški, palyginti su kitais to paties mėginio pjūviais, ir ar juos galima įtraukti į tyrimą, nes visų pirma tiesiniai matavimai gali pakisti už palyginti trumpo atstumo (28). Nevienalytiškų pjūvių nereikėtų naudoti. Nors tikslas yra į imtį įtraukti visus tam tikslui paskirtus gyvūnus (po 10 kiekvienos lyties ir dozės lygmens), tinka ir mažesnis gyvūnų skaičius. Tačiau imtis, sudaryta iš mažiau negu 6 kiekvienos lyties ir dozės lygmens gyvūnų, pagal šį bandymų metodą dažniausiai bus laikoma nepakankama. Stereologiją galima naudoti, kai norima nustatyti su dozės davimu susijusį poveikį tokiems parametrams kaip konkrečių neuroanatominių sričių dydis ar ląstelių skaičius. Visi audinių mėginių paruošimo aspektai nuo audinių fiksacijos iki audinių mėginių išpjovimo, audinių paruošimo ir objektinių stiklelių dažymo turėtų būti tarpusavyje taip suderinti, kad kiekvienoje partijoje būtų reprezentatyvių mėginių iš kiekvienos dozės grupės. Jei reikia atlikti morfometrinę arba stereologinę analizę, visais dozės lygmenimis paimti galvos smegenų audiniai turėtų būti įlieti į tinkamą terpę tuo pačiu metu, siekiant išvengti susitraukimo artefaktų, kurie gali būti susiję su pernelyg ilgu laikymu fiksatyve.

ATASKAITA

Duomenys

76. Duomenys turėtų būti pateikiami atskirai ir apibendrinami lentelėse. Jei reikia, apie kiekvieną bandymo grupę ir apie kiekvieną kartą turėtų būti pateikiami šie duomenys: gyvūnų skaičius bandymo pradžioje, per bandymą rastų nugaišusių arba dėl humaniškų priežasčių numarintų gyvūnų skaičius, nugaišimo dėl bet kurios priežasties ir humaniško numarinimo laikas, vaisingų gyvūnų skaičius, vaikingų patelių skaičius, vadą atsivedusių patelių skaičius, gyvūnų, kuriems pasireiškė toksiškumo požymiai, skaičius. Ataskaitoje taip pat reikėtų pateikti toksiškumo apibūdinimą, įskaitant pasireiškimo pradžią, trukmę ir sunkumą. Požymiai turi būti registruojami žymint jų pradžią, tipą, sunkumo laipsnį ir trukmę.

77. Skaičiais išreikšti rezultatai turėtų būti apdoroti tinkamu ir priimtinu statistiniu metodu. Statistinius metodus reikėtų pasirinkti rengiant bandymo modelį, pagal juos turėtų būti tinkamai tvarkomi nenormalieji duomenys (pvz., skaičiavimo duomenys), cenzūruotieji duomenys (pvz., riboto stebėjimo laiko), ne nepriklausomi duomenys (pvz., poveikis vadai ir kartojami matavimai), nevienoda sklaida. Apibendrintieji tiesiniai mišrūs modeliai ir

▼M5

dozės bei atsako tarpusavio ryšio modeliai apima plačią analitinių priemonių, kurias gali būti tikslinga taikyti pagal šį bandymų metodą surinktiems duomenims, klasę. Ataskaitoje turėtų būti pakankamas kiekis informacijos apie analizės metodą ir taikytą kompiuterio programą, kad nepriklausomas ekspertas ar statistikos specialistas galėtų įvertinti/iš naujo įvertinti analizės eigą.

Rezultatų įvertinimas

78. Šio toksiškumo bandymo duomenys įvertinami atsižvelgiant į pastebėtą poveikį, įskaitant nekroskopiją ir mikroskopinio tyrimo rezultatus. Vertinant, be kitų dalykų, vertinamas ryšys tarp dozės ir anomalijų, įskaitant didelius pažeidimus, atsiradimo, dažnumo ir sunkumo arba to ryšio nebuvimas. Veikiami organai, vaisingumas, klinikinės anomalijos, dauginimosi ir vados rodikliai, kūno masės pokyčiai, gaištamumas ir kitoks toksiškas poveikis ir poveikis vystymuisi taip pat turėtų būti vertinami. Ypač daug dėmesio reikėtų skirti konkrečiai lyčiai pasireiškusiems pokyčiams. Įvertinant rezultatus reikia atsižvelgti į bandomosios cheminės medžiagos fizikines ir chemines savybes ir toksikokinetinius duomenis, įskaitant perdavimą per placentą ir išskyrimą į pieną, jei tokių duomenų turima.

Bandymo ataskaita

79. Bandymo ataskaitą turėtų sudaryti ši per bandymą su P, (jei reikia) su F_1 ir F_2 gyvūnais gauta informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— visa svarbi turima informacija apie cheminę medžiagą, toksikokinetines ir toksikodinamines bandomosios cheminės medžiagos savybes;

— tapatumo duomenys;

— grynumas.

Nešiklis (jei naudojamas):

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei nešiklis ne vanduo.

Bandomieji gyvūnai:

— naudota rūšis/veislė;

— gyvūnų skaičius, amžius ir lytis;

— šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras, kraiko medžiagos ir t. t.;

— kiekvieno gyvūno kūno masė bandymo pradžioje;

— P patelių makšties tepinėlių duomenys prieš dozių davimo pradžią (jeigu tuo metu duomenys renkami);

— P kartos gyvūnų poravimo duomenys, nurodant patinėlius ir pateles, su kuriomis jie poruoti, poravimo sėkmė;

— duomenys apie vadas, kurioms priklauso F_1 kartos gyvūnai.

Bandymo sąlygos:

— pagrindinė priežastis, nulėmusi dozės dydžio pasirinkimą;

— išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos preparato ruošimą arba jos dėjimą į pašarą, gautos koncentracijos vertės;

▼M5

— preparato stabilumas ir vienalytiškumas nešiklyje arba priede (pvz., pašaruose, geriamajame vandenyje), kraujyje ir (arba) piene naudojimo ir laikymo tarp dozių davimo sąlygomis;

— išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos davimo būdą;

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos pašare ar geriamajame vandenyje (ppm) perskaičiavimas į tikrąją dozę (mg/kg kūno masės per parą), jei tinka;

— išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę (įskaitant pašaro sudėtį, jei turima duomenų);

— išsamus atsitiktinės atrankos, taikomos jaunikliams brokuoti ir suskirstyti į bandymo grupes, aprašas;

— aplinkos sąlygos;

— tyrimo grupės narių sąrašas, įskaitant profesinį parengimą.

Rezultatai (suvestiniai duomenys ir duomenys apie kiekvieną gyvūną pagal lytį ir dozę):

— pašaro suvartojimas ir, jei matuojamas, vandens suvartojimas, pašaro efektyvumas (kūno masės padidėjimas vienam suvartoto pašaro gramui, išskyrus tą laiką, kai gyvūnai laikomi kartu, ir išskyrus laktacijos laikotarpį), P ir F_1 gyvūnams nurodomas suvartotos bandomosios cheminės medžiagos kiekis (kai duodama su pašaru/geriamuoju vandeniu);

— absorbcijos duomenys (jei yra);

— P gyvūnų kūno masė;

— atrinktų F_1 gyvūnų kūno masės po atjunkymo duomenys;

— nugaišimo darant bandymą laikas arba informacija, kad gyvūnai išgyveno iki bandymo nutraukimo;

— klinikinių požymių tipas, sunkumas ir trukmė (grįžtami ar negrįžtami),

— kraujo, šlapimo ir klinikinių cheminių tyrimų duomenys, įskaitant TSH ir T4;

— blužnies ląstelių (T, B, natūraliųjų žudikių) fenotipinė analizė;

— kaulų čiulpų akytumas;

— duomenys apie atsaką į toksiškumą;

— P ir F_1 patelių, kurių rujos ciklas yra normalus arba nenormalus, skaičius ir ciklo trukmė;

— laikas iki susiporavimo (prekoitalinis intervalas, dienų skaičius nuo uždarymo poromis iki susiporavimo);

— toksinis ir kitoks poveikis dauginimuisi, taip pat gyvūnų, kurie sėkmingai susiporavo, buvo vaikingi, atsivedė ir žindė palikuonis, pateles apvaisinusių patinėlių, patelių, kurioms pasireiškė distocija/-kurių jauniklių atsivedimo procesas truko ilgiau arba buvo sunkus, skaičius ir procentinė dalis;

— gestacijos ir, jei turima duomenų, jauniklių atsivedimo proceso trukmė;

— implantacijų skaičius, vados dydis ir vyriškos lyties jauniklių procentinė dalis;

— poimplantacinių nuostolių atvejų, gyvagimių ir negyvagimių skaičius ir procentinė dalis;

▼M5

— vados masės ir jauniklių masės duomenys (patinėlių ir patelių duomenys pateikiami kartu), silpniausių jauniklių, jei jų nustatoma, skaičius;

— jauniklių su akivaizdžiai matomomis anomalijomis skaičius;

— toksinis arba kito tipo poveikis palikuonims, postnataliniam augimui, gyvybingumui ir t. t.;

— duomenys apie fizinius jauniklių parametrus ir kiti postnatalinio vystymosi duomenys;

— duomenys apie F_1 gyvūnų lytinį subrendimą;

— jauniklių ir suaugusių gyvūnų funkcinių stebėjimų duomenys, kai tinka,

— P ir suaugusių F_1 gyvūnų kūno masė numarinant ir absoliučios bei santykinės organų masės duomenys;

— nekroskopijos duomenys;

— išsamus visų histopatologinių rezultatų aprašymas;

— P ir F_1 patinėliams – suminis spermatozoidų antsėklidžio uodegoje skaičius, vis judresnių spermatozoidų procentinė dalis, morfologiškai normalių spermatozoidų procentinė dalis ir spermatozoidų su kiekviena identifikuota anomalija procentinė dalis;

— P ir F_1 patelių kiaušidėse esančių folikulų skaičius ir subrendimo etapas, jei reikia;

— geltonkūnių F_1 patelių kiaušidėse skaičius;

— statistinis rezultatų apdorojimas, jei daromas.

2 kohortos parametrai:

— išsamus stebėjimų ir metodikos standartizavimo procedūrų aprašas ir taikytos apibrėžtys stebėjimų rezultatams įvertinti balais;

— taikytų bandymo procedūrų sąrašas ir jų taikymo pagrindimas;

— duomenys apie taikytas elgsenos/funkcinių, neuropatologinių ir morfometrinių bandymų procedūras, taip pat informacija ir išsamūs duomenys apie automatizuotus prietaisus;

— prietaisų kalibravimo procedūros ir procedūros, skirtos užtikrinti, kad prietaisų parodymai būtų lygiaverčiai ir kad bandymo procedūros būtų proporcingai taikomos dozes gaunančioms grupėms;

— glaustas pagrindimas paaiškinant sprendimus, kuriuos priimant remtasi profesionaliu vertinimu;

— išsamus nustatytų elgsenos, funkcinių, neuropatologinių ir neurocheminių požymių aprašas pagal lytį ir dozės grupę, įskaitant padidėjimą ir sumažėjimą dėl kontrolės;

— smegenų masė;

— visos diagnozės pagal neurologinius požymius ir pažeidimus, įskaitant natūraliai atsirandančias ligas arba būsenas;

— požymių pavyzdžių nuotraukos;

— mažo padidinimo mikroskopinės nuotraukos morfometrijai naudotų pjūvių homologijai įvertinti;

▼M5

— statistinis rezultatų apdorojimas, įskaitant duomenims ir rezultatams, nepaisant to, ar jie buvo reikšmingi, ar ne, analizuoti taikytus statistinius modelius;

— tai, kiek visas kitas toksinis poveikis turėjo įtakos išvadai dėl bandomosios cheminės medžiagos galimo neurotoksiškumo, pagal lytį ir dozės grupę;

— tai, kiek toksikokinetiniai duomenys turėjo įtakos išvadai;

— duomenys, kuriais pagrindžiamas bandymų metodo patikimumas ir jautrumas (t. y. teigiami ir ankstesni kontroliniai duomenys);

— neuropatologinio ir funkcinio poveikio ryšys, jei yra;

— NOAEL arba etaloninė dozė motininėms patelėms ir jaunikliams pagal lytį ir grupę;

— bendras duomenų aiškinimas remiantis gautais rezultatais, įskaitant išvadą, ar cheminė medžiaga sukėlė neurotoksišką poveikį vystymuisi, ir NOAEL.

3 kohortos parametrai:

— IgM antikūnų serume titrai (jautrinimas SRBC ir KLH), blužnies IgM PFC vienetai (jautrinimas SRBC);

— laboratorija, kuri pirmą kartą rengiasi atlikti analizę, per optimizavimo procedūrą (visos laboratorijos periodiškai (pvz., kasmet)) turėtų patvirtinti TDAR metodo rezultatyvumą;

— bendras duomenų aiškinimas remiantis gautais rezultatais, įskaitant išvadą, ar cheminė medžiaga sukėlė imunotoksinį poveikį vystymuisi, ir NOAEL.

Rezultatų aptarimas.

Išvados, įskaitant tėviniams gyvūnams ir palikuonims gautas NOAEL vertes.

Reikėtų pateikti visą informaciją, kuri buvo gauta ne per bandymą, bet yra naudinga aiškinant rezultatus (pvz., poveikio panašumas į kurios nors žinomos neurotoksiškos medžiagos poveikį).

Rezultatų aiškinimas

80. Išplėstinis toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymas suteiks informacijos apie kartotinio cheminės medžiagos naudojimo poveikį visais reikiamais dauginimosi ciklo tarpsniais. Pirmiausia bandymas suteikia informacijos apie dauginimosi sistemą ir palikuonių iki 90 PND amžiaus vystymosi, augimo, išgyvenimo ir funkcines vertinamąsias baigtis.

81. Aiškinant bandymo rezultatus reikėtų atsižvelgti į visą turimą informaciją apie cheminę medžiagą, įskaitant fizikines ir chemines savybes, TK ir toksikodinamines savybes, turimą svarbią informaciją apie struktūriškai analogiškas medžiagas, anksčiau atliktų toksiškumo tyrimų su bandomąja chemine medžiaga rezultatus (pvz., ūmaus toksiškumo, toksiškumo po pakartotinio suvartojimo, mechanistinių tyrimų ir tyrimų, per kuriuos vertinta, ar vertinant *in vitro/in vivo* metabolines savybes tarp gyvūnų rūšių yra reikšmingų kokybinių ir kiekybinių skirtumų). Bendrosios nekroskopijos ir organų masės rezultatai įvertinami atsižvelgiant į stebėjimus kitų kartotinės dozės bandymų metu, jei įmanoma. Vertinant palikuonių augimo sumažėjimą galima vertinti, ar bandomosios cheminės medžiagos poveikis pieno sudėčiai turėjo tam įtakos (29).

▼M5

2 kohorta (Neurotoksiškumas vystymuisi)

82. Neurobihevioristinius ir neuropatologinius rezultatus reikėtų aiškinti atsižvelgiant į visus duomenis, laikantis duomenų įrodomosios vertės principo ir remiantis ekspertų vertinimu. Reikėtų aptarti elgsenos arba morfologinių duomenų, jei tokių gauta, pavyzdžius, taip pat duomenis apie atsaką į dozes. Į šį apibūdinimą reikėtų įtraukti neurotoksiškumo vystymuisi, įskaitant žmonių epidemiologinius tyrimus arba bylų ataskaitas, bandymų su bandomaisiais gyvūnais duomenis (pvz., toksikokinetinius duomenis, informaciją apie struktūrą ir aktyvumą, kitų toksiškumo tyrimų duomenis). Vertinant duomenis reikėtų aptarti ir biologinį, ir statistinį reikšmingumą. Be kitų dalykų, taip pat reikėtų įvertinti neuropatologinių ir elgsenos pakitimų tarpusavio ryšį, jei jis pastebėtas. Informacijos, kuri padėtų aiškinti neurotoksiškumo vystymuisi rezultatus, galima rasti Bandymų metode B.53 (35) ir Tyl et al., 2008 (31).

3 kohorta (Imunotoksiškumas vystymuisi)

83. Imuninės funkcijos slopinimą arba aktyvinimą, nustatomą pagal TDAR (nuo T ląstelių priklausomų antikūnų atsaką), reikėtų įvertinti atsižvelgiant į visų atliktų stebėjimų rezultatus. TDAR rezultatų reikšmingumą gali patvirtinti kiti imunologiniu požiūriu susiję rodikliai (pvz., kaulų čiulpų akytumas, limfoidinių audinių masė ir histopatologija, limfocitų subpopuliacijos pasiskirstymas). TDAR nustatytas poveikis gali būti ne toks reikšmingas, jeigu kiti toksiškumo aspektai stebėti esant mažesnei sąlyčio koncentracijai.

84. EBPO Rekomendaciniame dokumente Nr. 43 pateikiama informacija, padėsianti aiškinti dauginimosi ir neurotoksiškumo rezultatus (26).

LITERATŪROS ŠALTINIAI

(1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), 'A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical SAFEty Assessment', *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69–98.

(2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), 'Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets', *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530–536.

(3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research, ILSI Press, Washington, DC.

(4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), 'Direct Dosing of Preweaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group', International Journal of Toxicology, 24, 87–94.

(5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), 'Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment', *Toxicological Sciences*, 49, 1–4.

(6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), 'Detection of Effects on Male Reproduction – a Literature Survey', *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293–327.

(7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), 'Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356–369.

▼M5

(8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). 'Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats – overview of the studies', *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1–21.

(9) Creasy, D.M. (2003), 'Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology', *Birth Defects Research*, Part B, 68, 408–415.

(10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), 'The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies', *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84–97.

(11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), 'Cycles and Seasons', in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.

(12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), 'Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights', *Reproductive Toxicology,* 13: 383–390.

(13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), 'Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat', *Biological Reproduction*, 17, 298–303.

(14) Ladics, G.S. (2007), 'Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing', *Methods*, 41, 9–19.

(15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), 'Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation', *Toxicology*, 197, 23–35.

(16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), 'A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat', *Fundamental and Applied Toxicology,* 12, 92–108.

(17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), 'Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats', *Journal of Reproduction and Fertility,* 54, 103–107.

(18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), 'The Method of Sperm Collection Significantly Influences **S**perm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat'. *Reproductive Toxicology,* 5, 39–44.

(19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), 'Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report', *Reproductive Toxicology,* 10, 237–244.

(20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), 'Methods for Assessing Rat Sperm Motility', *Reproductive Toxicology,* 6, 267–273.

(21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), 'Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration', *Journal of Andrology,* 13, 409–421.

(22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), 'Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations', *Reproductive Toxicology*, 5, 449–458.

▼M5

(23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), ‘Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer’, *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida. pp. 319–333.

(24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), ‘The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations’, *Journal of Andrology*, 10, 401–415.

(25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), ‘Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants’, *Reproductive Toxicology*, 6, 491–505.

(26) OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16,OECD, Paris.

(27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), ‘Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility’, *Journal of Andrology*, 8, 330–337.

(28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), ‘A ‘Best Practices’ Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing – for Today’, *Toxicological Pathology*, 34, 296–313.

(29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), ‘Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components’, *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8–16.

(30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), ‘Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats’, *Environmental health perspectives,* 115(12), 1717–1726.

(31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), ‘Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints’, *Neurotoxicology and Teratology, 30*: 349–381.

(32) OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.

(33) Šio priedo B.43 skyrius ‘Neurotoksiškumo graužikams bandymas’.

(34) OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/-MONO(2000)7, OECD, Paris.

(35) Šio priedo B.53 skyrius ‘Neurotoksiškumo vystymuisi bandymas’.

(36) Šio priedo B.54 skyrius ‘Poveikiu graužikų gimdai pagrįstas biologinis tyrimas: Trumpalaikis estrogeninių savybių atrankos bandymas’.

(37) Šio priedo B.55 skyrius ‘Žiurkių *Hershberger* biologinis tyrimas: Trumpalaikis (anti)andriogeninių savybių atrankos tyrimas’.

▼M5

(38) OECD (2009), Guidance Document for Histologic Evalution of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paris.

(39) OECD (2011), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.

(40) OECD (2013), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris.

▼**M5**

1 priedėlis

Per funkcinio stebėjimo bandymų rinkinio bandymus matuojami ir stebimi rodikliai (2A kohorta)

Nuolatinio laikymo narvelis ir atvira vieta	Manipuliaciniai	Fiziologiniai
Laikysena	Išėmimo lengvumas	Temperatūra
Nevalingi kloniniai ir toniniai judesiai	Manipuliavimo gyvūnu lengvumas	Kūno masė
Akies vokų užkritimas	Raumens tonusas	Vyzdžio reakcija
Plaukų pašiaušimas	Reakcija į prisiartinimą	Vyzdžio dydis
Seilėjimasis	Reakcija į prisilietimą	
Ašarojimas	Reakcija į garsą	
Vokalizacija	Reakcija į uodegos suspaudimą	
Vaikščiojimas atbulomis	Reakcija išsitiesiant	
Eisenos anomalijos	Kreivai statoma pėda	
Budrumas	Priekinės galūnės grybšnio jėga	
Stereotipinis elgesys	Užpakalinės galūnės grybšnio jėga	
Keistas elgesys		
Dėmės		
Kvėpavimo anomalijos		

▼**M5**

2 priedėlis

SĄVOKOS

Cheminė medžiaga: medžiaga arba mišinys.

Bandomoji cheminė medžiaga: bet kuri pagal šį bandymų metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

▼M5

B.57. **H295R STEROIDOGENEZĖS ANALIZĖ**

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO *Test Guideline* (TG) 456 (2011). 1998 m. EBPO iniciatyva pradėta labai svarbi veikla, kurios tikslas – patikslinti esamas ir parengti naujas galimų endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų atrankos ir bandymo gaires. 2002 m. EBPO konceptuali endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo sistema yra penkių lygmenų, kurių kiekvienas atitinka skirtingą biologinio sudėtingumo lygį (1). Atliekant šio bandymo metodo aprašyme apibūdinamą *in vitro* H295R *s*teroidogenezės analizę, naudojama antinksčių žievės karcinomos pažeistų žmogaus ląstelių linija (NCI-H295R ląstelės), ir tai yra 2 lygmens (*in vitro* analizės mechanistiniams duomenims surinkti) analizė, kuri atliekama cheminių medžiagų atrankos ir vertinimo pirmenybės nustatymo tikslais. Ši analizė, kaip cheminės medžiagos poveikio steroidogenezei, būtent 17β-estradiolio (E2) ir testosterono gamybai, patikrinimo būdas, buvo kuriama ir standartizuojama keliais etapais. H295R analizė buvo optimizuota ir jos tinkamumas – patvirtintas (2) (3) (4) (5).

2. H295R steroidogenezės analizės tikslas – nustatyti chemines medžiagas, kurios veikia E2 ir testosterono gamybą. H295R analizę numatyta naudoti siekiant nustatyti ksenobiotikus, kurių taikinys (-iai) – endogeniniai komponentai, lemiantys ląstelių viduje vykstančių biocheminių reakcijų seką, kuri prasideda cholesterolio reakcijų seka ir baigiasi E2 ir (arba) testosterono gamyba. H295R analizė nėra skirta cheminių medžiagų, kurios steroidogenezę veikia dėl savo poveikio pogumburio-hipofizės-gonadų (PHG) ašiai, nustatymui. Šios analizės tikslas – atsakyti, ar cheminė medžiaga gali indukuoti arba slopinti testosterono ir E2 gamybą, ar ne; tačiau kai kuriais atvejais (žr. 53 ir 54 punktus) galima gauti kiekybinius rezultatus. Analizės rezultatai išreiškiami santykiniais hormonų gamybos pokyčiais, palyginti su kontroliniais tirpikliais. Šia analize nesiekiama gauti konkrečios mechanistinės informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos sąveiką su endokrinine sistema. Naudojant ląstelių liniją, buvo atlikti moksliniai tyrimai siekiant nustatyti konkrečių fermentų ir tarpinių hormonų, kaip antai progesterono, poveikį (2).

3. Šio bandymo metodo aprašyme vartojamų sąvokų ir santrumpų apibrėžtys pateiktos priedėlyje. Išsamus protokolas, įskaitant tirpalų ruošimo, ląstelių auginimo instrukcijas ir nurodymus dėl įvairių šio bandymo eigos aspektų, pateikiamas EBPO parengto dokumento *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production* (4) (Testosterono ir estradiolio gamybos moduliatoriams nustatyti atliekamos H295R steroidogenezės analizės tinkamumo patvirtinimas keliose laboratorijose) I–III priedėliuose.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

4. Lytinių steroidinių hormonų biosintezėje dalyvauja penki skirtingi fermentai, kurie katalizuoja šešias skirtingas reakcijas. Prie citochromo P450 (CYP) grupės priskiriamo cholesterolio šoninės grandinės skalumo fermento (CYP11A) sukeliamas cholesterolio virsmas į pregnenoloną yra pirmasis biocheminių reakcijų sekos, kuri baigiasi galutinių produktų steroidų sinteze, etapas. Atsižvelgiant į kitų dviejų reakcijų eilės tvarką, steroidogenezės reakcijų seka skyla į dvi reakcijų trajektorijas – Δ^5-hidroksisteroidų reakcijų seką ir Δ^4-ketosteroidų reakcijų seką, kurios susieina androstenediono gamybos etape (1 paveikslas).

5. 17β-hidroksisteroid-dehidrogenazės (17β-HSD) veikiamas androstenedionas virsta į testosteroną. Testosteronas yra ir tarpinis junginys, ir hormonas galutinis produktas. Vyriškos lyties gyvūnų organizme testosteronas, veikiamas 5α-reduktazės, kurios galima rasti androgeninio poveikio tikslinių audinių, kaip antai prostatos ir sėklinių pūslelių audinių ląstelių membranose, branduolio apvalkale ir endoplazminiame tinkle, gali virsti dihidrotestosteronu (DHT). DHT androgeninis poveikis gerokai stipresnis už testosterono, ir jis taip pat laikomas hormonu galutiniu produktu. H295R analizė nesuteikia galimybės nustatyti DHT koncentracijos (žr. 10 punktą).

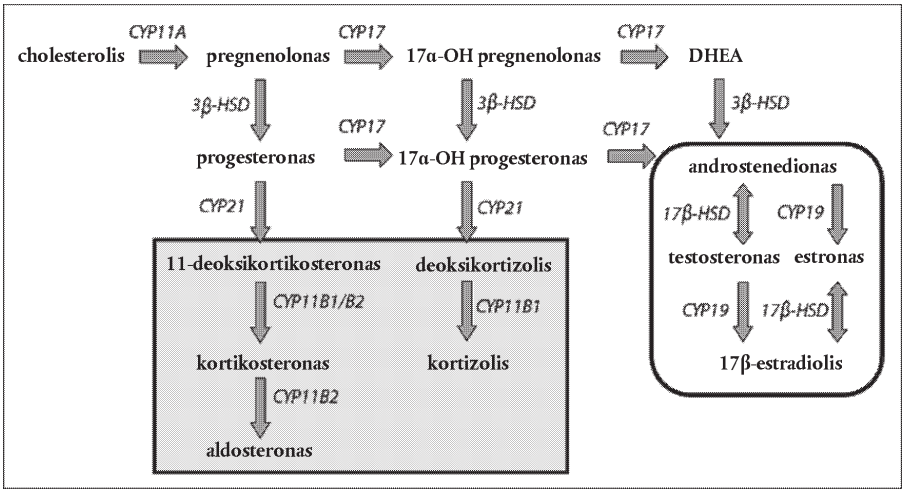
▼M5

6. Fermentas, kuris dalyvauja steroidogenezės reakcijų sekoje ir paverčia androgenines chemines medžiagas estrogeninėmis, yra aromatazė (CYP19). CYP19 paverčia testosteroną 17β-oestradioliu, o androstenedioną – estronu. E2 ir testosteronas laikomi hormonais steroidogenezės reakcijų sekos galutiniais produktais.

7. Skirtingų rūšių gyvūnų organizmuose CYP17, kaip liazės, poveikio tarpiniams substratams specifiškumas skiriasi. Žmogaus organizme šis fermentas teikia pirmenybę Δ^5-hidroksisteroidų reakcijų sekos substratams (pregnenolonui), o žiurkės – Δ^4-ketosteroidų reakcijų sekos substratams (progesteronui) (19). Tokiais CYP17, kaip liazės, poveikio skirtumais galima paaiškinti kai kuriuos nuo gyvūno rūšies priklausomus reakcijos į chemines medžiagas, kurios *in vivo* keičia steroidogenezę, skirtumus (6). Tyrimais nustatyta, kad H295 ląstelės tiksliausiai atspindi suaugusio žmogaus antinksčių fermentų ekspresijos ir steroidų gamybos ypatumus (20), tačiau žinoma, kad šios ląstelės ekspresuoja ir Δ^5-hidroksisteroidų, ir Δ^4-ketosteroidų reakcijų sekose, kurios baigiasi androgenų sinteze, dalyvaujančius fermentus(7) (11) (13) (15).

1 paveikslas

Steroidogenezės reakcijų seka H295R ląstelėse.



Pastaba.

Fermentai išskirti kursyvu, hormonai – pajuodintu šriftu, o strėlytės rodo sintezės kryptį. Pilkas fonas – tai kortikosteroidų reakcijų sekos ir produktai. Lytinių steroidų reakcijų sekos ir produktai apibrėžti ratu. CYP = citochromas P450; HSD = hidroksisteroid-dehidrogenazė; DHEA = dehidroepiandrosteronas.

8. Žmogaus antinksčių žievės karcinomos ląstelių linija H295R – naudingas *in vitro* modelis, kai siekiama ištirti poveikį steroidinių hormonų sintezei (2) (7) (8) (9) (10). H295R ląstelių linijos ekspresuoja genus, kurie koduoja visus pirmiau minėtus svarbiausius steroidogenezėje dalyvaujančius fermentus (11) (15) (1 paveikslas). Tai yra unikali savybė, nes šių genų *in vivo* ekspresijos ypatumai priklauso nuo audinio ir vystymosi etapo, ir tipinėmis aplinkybėmis vieno audinio ar vieno vystymosi etapo, kuriame būtų ekspresuojami visi steroidogenezėje dalyvaujantys genai, nebūna (2). H295R ląstelės turi pagal sritis nediferencijuotų žmogaus vaisiaus antinksčių ląstelių fiziologines savybes (11). Šios ląstelės – tai savo gebėjimu gaminti visus steroidinius hormonus, kurių yra suaugusio žmogaus antinksčių žievėje ir gonadose, išsiskirianti *in vitro* sistema, kuri suteikia galimybę atlikti poveikio ir kortikosteroidų sintezei, ir lytinių steroidinių hormonų, tokių kaip androgenų ir

▼M5

estrogenų, gamybai bandymus, nors ši analizė buvo patvirtinta kaip tinkama tik poveikiui testosteronui ir E2 nustatyti. Naudojant bandymų sistemą nustatytus pokyčius, t. y. testosterono ir E2 gamybos pakitimus, gali sukelti daugybė skirtingų bandomųjų cheminių medžiagų sąveikos su steroidogenezinėmis funkcijomis, kurias ekspresuoja H295R ląstelės, reakcijų. Tai gali būti steroidinių hormonų gamyboje, transformacijoje ar eliminacijoje dalyvaujančių fermentų ekspresijos, sintezės ar funkcijos moduliacija (12) (13) (14). Hormonų gamyba gali būti slopinama dėl tiesioginio konkurencingo rišimosi prie reakcijų sekoje dalyvaujančio fermento, poveikio kofaktoriams, kaip antai nikotinamido adenino dinukleotido fosfatui (NADF) ir cikliniam adenozino monofosfatui (CAMF), ir (arba) aktyvesnio steroidų metabolizmo ar tam tikrų steroidogenezės reakcijų sekoje dalyvaujančių fermentų genų ekspresijos supresijos. Inhibavimas gali būti ir tiesioginių, ir netiesioginių su hormonų gamyba susijusių procesų funkcija, o indukcija paprastai yra netiesioginio pobūdžio, pvz., pasireiškia dėl poveikio kofaktoriams, tokiems kaip NADF ir cAMP (kaip forskolino atveju), steroidų metabolizmo slopinimo (13) ir (arba) dėl teigiamos steroidogenezės genų ekspresijos reguliacijos.

9. H295R analizė turi kelis pranašumus:

— H295R analizė suteikia galimybę nustatyti iš testosterono ir E2 gamybos apimties padidėjimą ir sumažėjimą;

— suteikia galimybę tiesiogiai įvertinti galimą cheminės medžiagos poveikį ląstelių gyvybingumui ir (arba) citotoksiškumą. Tai yra svarbi ypatybė, nes tai suteikia galimybę atskirti poveikį, kuris pasireiškia dėl citotoksiškumo, nuo poveikio, kuris pasireiškia dėl tiesioginės cheminių medžiagų sąveikos su steroidogenezės reakcijų sekomis; to negalima padaryti naudojant audinių eksplantų sistemas, kurios sudarytos iš kelių rūšių skirtingo jautrumo ir skirtingas funkcijas atliekančių ląstelių;

— nereikia naudoti gyvūnų;

— H295R ląstelių liniją galima įsigyti rinkoje.

10. Pagrindiniai analizės apribojimai:

— H295R analizės metabolinė geba nežinoma, bet ji tikriausiai yra palyginti nedidelė, todėl šia analize turbūt nepavyks nustatyti cheminių medžiagų, kurių metabolizmą reikia suaktyvinti.

— Kadangi H295R ląstelių linijos šaltinis – antinksčių audinys, joje yra fermentų, kurie gali gaminti gliukokortikoidus ir mineralkortikoidus, taip pat lytinius hormonus, todėl poveikis gliukokortikoidų ir mineralkortikoidų gamybai gali turėti įtaką analize nustatomai testosterono ir E2 koncentracijai.

— analizė nesuteikia galimybės nustatyti DHT koncentracijos, todėl manoma, kad šiuo bandymo metodu nebūtų įmanoma nustatyti cheminių medžiagų, kurios slopina 5α-reduktazę, o tokiu atveju galima naudoti Hershberger'io analizę (16).

— Naudojant H295R analizės metodą, nepavyks nustatyti cheminių medžiagų, kurios trikdo steroidogenezę veikdamos pogumburio-hipofizės-gonadų (PHG) ašį, nes tokį tyrimą galima atlikti tik su neporuotais gyvūnais.

BANDYMO METODO PRINCIPAS

11. Analizės paskirtis – nustatyti chemines medžiagas, kurios veikia T ir E2 gamybą. Testosteronas taip pat yra tarpinis junginys E2 gamybos reakcijų sekoje. Naudojant šią analizę, galima nustatyti chemines medžiagas, kurios paprastai slopina arba indukuoja steroidogenezės reakcijų sekos fermentus.

▼M5

12. Paprastai ši analizė atliekama standartinėmis ląstelių auginimo sąlygomis 24 duobučių kultūrų auginimo plokštelėse. Taip pat šiai analizei galima naudoti kitų dydžių plokšteles, tačiau pasėlio ir bandymo sąlygas reikėtų atitinkamai pakoreguoti siekiant išsaugoti atitiktį veiksmingumo kriterijams.

13. Praėjus 24 valandų aklimacijos daugiaduobėse plokštelėse laikotarpiui, ląstelės 48 valandas veikiamos septynių dydžių koncentracijos bandomąja chemine medžiaga ir kiekvienos koncentracijos cheminė medžiaga bandoma ne mažiau kaip trijose duobutėse. Fiksuotos koncentracijos tirpiklis ir žinomas hormonų gamybos inhibitorius ir induktorius naudojami kaip neigiami ir teigiami kontroliniai bandiniai. Pasibaigus veikimo chemine medžiaga laikui, terpė pašalinama iš visų plokštelės duobučių. Pašalinus terpę, nedelsiant analizuojamas kiekvienoje duobutėje esančių ląstelių gyvybingumas. Hormonų koncentraciją terpėje galima išmatuoti įvairiais būdais, pvz., naudojant hormonų matavimo rinkinius, kurių galima įsigyti rinkoje, ir (arba) instrumentiniais analizės metodais, pvz., taikant skysčių chromatografijos ir masių spektrometrijos metodą. Gauti analizės duomenys – pokytis kartais, lyginant su kontroliniu tirpikliu ir mažiausio pastebėto poveikio koncentracija (LOEC). Jeigu analizės rezultatai neigiami, didžiausia bandyta koncentracija nurodoma kaip nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC). Išvados dėl cheminės medžiagos gebėjimo paveikti steroidogenezę turėtų būti pagrįstos ne mažiau kaip du kartus atskirai atliktais bandymais. Bandymą atliekant pirmą kartą, galima nustatyti koncentracijos intervalą, vėliau, bandymą atliekant antrą ir, jei taikoma, trečią kartą (jeigu iškyla tirpumo arba citotoksiškumo problemų arba manoma, kad cheminės medžiagos aktyvumas siekia bandytų koncentracijos lygių intervalo pabaigą) – pakoreguoti koncentraciją.

LĄSTELIŲ AUGINIMO MITYBOS TERPĖJE PROCESAS

Ląstelių linija

14. NCI-H295R ląstelių galima įsigyti iš biologinių išteklių centro ‘American Type Culture Collections’ (ATCC), pasirašius moksliniams tyrimams skirtų medžiagų perdavimo sutartį (angl. *Material Transfer Agreement*, MTA) ([1]).

Įvadas

15. Kadangi ląstelėms senstant ir didėjant ląstelių pasažų skaičiui, jų gebėjimas gaminti E2 keičiasi (2), prieš naudojant ląsteles, jos turėtų būti auginamos mitybos terpėje pagal specialų protokolą, o pasažų skaičių nuo ląstelių atšildymo ir ląstelių pasažų skaičių tuo metu, kai jos užšaldomos ir padedamos saugojimui skystame azote, reikėtų užsirašyti. Pirmas skaičius rodo faktinį ląstelių pasažų skaičių, o antrasis – pasažų skaičių tuo metu, kai ląstelės buvo užšaldytos ir padėtos saugojimui. Pavyzdžiui, ląstelės, kurios buvo užšaldytos po penkto pasažo, atšildytos, tuomet vėl paaugintos mitybos terpėje ir padalytos tris kartus (4 pasažai, nes šviežiai atšildytos ląstelės laikomos pirmo pasažo ląstelėmis), bus paženklintos kaip 4,5 pasažas. Numeravimo sistemos pavyzdys pavaizduotas tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) I priedėlyje.

16. Pradinė terpė naudojama kaip priedais papildytų ir užšaldymo terpių pagrindas. Priedais papildyta terpė būtina ląstelių auginimui. Užšaldymo terpė specialiai skirta tam, kad nepakenkiant ląstelėms būtų galima užšaldyti jas ilgalaikiam saugojimui. Prieš naudojant auginimo terpės priedą „Nu-serum“ (arba panašų tokių pat savybių serumą, kurį naudojant gaunami duomenys atitinka bandymo atlikimo ir kokybės kontrolės (KK) reikalavimus), kuris yra priedais papildytos terpės sudedamoji dalis, reikėtų ištirti jame natūraliai esančių testosterono ir E2 koncentraciją. Kaip šie tirpalai ruošiami, aprašyta tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) II priedėlyje.

([1]) ATCC CRL-2128; ATCC, Manasas (Virdžinija, JAV) [http://www.lgcstandards-atcc.org/].

▼M5

17. Pradėjus auginti H295R ląstelių kultūrą iš originalios ATCC ląstelių grupės, ląstelės turėtų būti auginamos penkis pasažus (t. y. ląstelės padalijamos 4 kartus). Tuomet penkto pasažo ląstelės užšaldomos saugojimui skystame azote. Prieš užšaldant ląsteles, ankstesnio ketvirto pasažo ląstelių mėginys analizuojamas KK plokštelėje (žr. 36 ir 37 punktus), siekiant patikrinti, ar bazinė hormonų gamyba ir reakcija į teigiamus kontrolinius bandinius atitinka 5 lentelėje nurodytus analizės KK kriterijus.

18. H295R ląstelės turi būti auginamos mitybos terpėje, užšaldomos ir laikomos skystame azote siekiant užtikrinti, kad ląstelių auginimui ir naudojimui visada būtų atitinkamo pasažo ir (arba) amžiaus ląstelių. Didžiausias pasažų skaičius auginimui paėmus naują ([1]) arba užšaldytą ([2]) ląstelių grupę, kad ląstelių kultūrą būtų galima naudoti H295R analizei, neturėtų viršyti 10.Pavyzdžiui, tinkamos būtų tos ląstelių iš po penkto pasažo užšaldytos ląstelių grupės kultūros, kurių pasažai būtų žymimi skaičių deriniais nuo 4.5 iki 10.5. Siekiant išauginti ląsteles iš šių užšaldytų ląstelių grupių, reikėtų vadovautis 19 punkte aprašytu procesu. Prieš naudojant šias ląsteles bandymams, jas reikėtų auginti mitybos terpėje dar ne mažiau kaip keturis (4) pasažus (4.5 pasažas).

Ląstelių auginimas iš užšaldytos pradinės ląstelių kultūros

19. Šis ląstelių auginimo iš užšaldytos pradinės ląstelių kultūros procesas taikomas, kai ląstelių auginimui ir bandymams iš skysto azoto išimama jame saugota nauja ląstelių grupė. Šis procesas išsamiai aprašytas tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) III priedėlyje. Ląstelės išimamos iš skysto azoto, kuriame jos buvo saugomos, greitai atšildomos, supilamos į centrifuginį mėgintuvėlį su priedais papildyta terpe, centrifuguojamos kambario temperatūroje, vėl suspenduojamos priedais papildytoje terpėje ir perkeliamos į kultūrų auginimo kolbas. Kitą dieną terpę reikia pakeisti. H295R ląstelės auginamos inkubatoriuje 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO_2 koncentracijai ore ir terpę atnaujinant 2–3 kartus per savaitę. Ląstelėms užpildžius maždaug 85–90 % kultūrų auginimo kolbos, jas reikėtų padalyti. Padalyti ląsteles būtina siekiant užtikrinti ląstelių sveikatą ir augimą ir kad būtų galima pasilikti ląstelių biologiniams tyrimams atlikti. Ląstelės tris kartus praplaunamos fosfatiniu buferiniu druskų tirpalu (FBDT, be Ca^{2+} Mg^{2+}) ir atlaisvinamos iš kultūrų auginimo kolbos, į FBDT (be Ca^{2+} Mg^{2+}) įpilant atitinkamo atskiriamojo fermento, pvz., tripsino. Ląstelėms atsiskyrus nuo kultūrų auginimo kolbos sienelių, nedelsiant reikėtų sustabdyti fermento veikimą, į kolbą įpilant priedais papildytos terpės, kurios kiekis turėtų būti 3 kartus didesnis už ląstelių apdorojimui naudoto fermento. Ląstelės supilamos į centrifuginį mėgintuvėlį, centrifuguojamos kambario temperatūroje, supernatantas pašalinamas, o nusėdusios ląstelės vėl suspenduojamos priedais papildytoje terpėje. Atitinkamas ląstelių tirpalo kiekis supilamas į naują kultūrų auginimo kolbą. Ląstelių tirpalo kiekį reikėtų pakoreguoti taip, kad kultūrų auginimo kolbą ląstelės užpildytų per 5–7 dienas. Rekomenduojamas persėjimo santykis 1:3–1:4. Plokštelę reikėtų atidžiai paženklinti. Dabar ląstelės jau paruoštos naudojimui analizės tikslais, o ląstelių perteklių reikėtų užšaldyti skystame azote, kaip aprašyta 20 punkte.

([1]) Nauja ląstelių grupė – tai iš ATCC gauta šviežia ląstelių grupė.

([2]) Užšaldyta ląstelių grupė – tai ląstelės, kurios prieš tai buvo auginamos mitybos terpėje, vėliau užšaldytos laboratorijoje, bet ne ATCC.

▼M5

H295R ląstelių užšaldymas (ląstelių paruošimas saugojimui skystame azote)

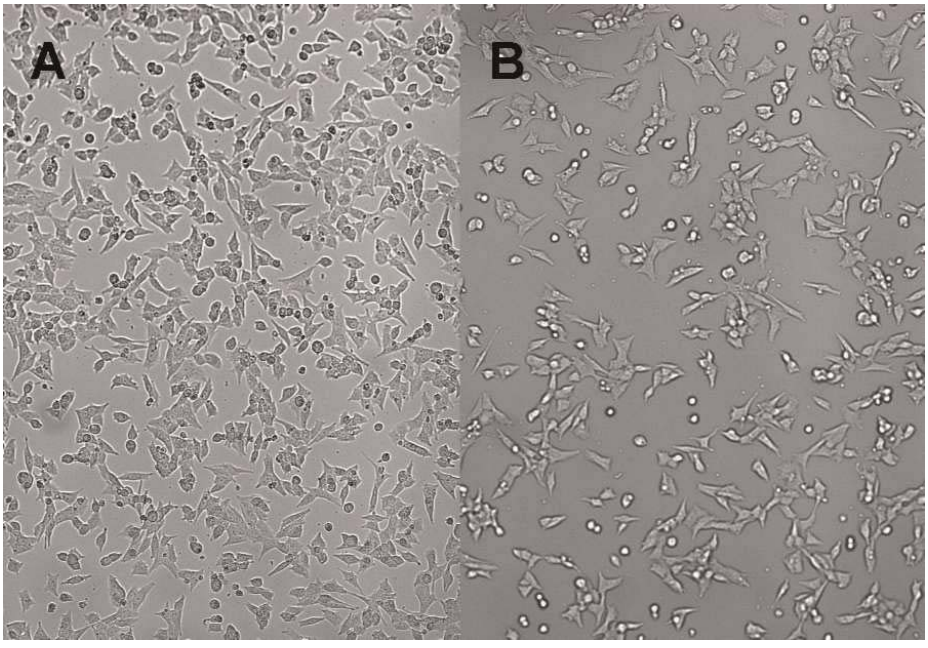
20. Siekiant paruošti H295R ląsteles užšaldymui, reikėtų vadovautis pirmiau aprašytu ląstelių padalijimo procesu iki pakartotinio centrifuginio mėgintuvėlio dugne nusėdusių ląstelių suspendavimo. Šiuo atveju nusėdusios ląstelės pakartotinai suspenduojamos užšaldymo terpėje. Tirpalas supilamas į atitinkamai paženklintą kriogeninį buteliuką, kuris šaldomas – 80°C temperatūroje 24 valandas, vėliau perkeliamas saugojimui į suskystintą azotą. Šis procesas išsamiai aprašytas tinkamumo patvirtinimo ataskaitos III priedėlyje (4).

Bandymams skirtų ląstelių sėjimas plokštelėse ir paruošimas inkubavimui

21. Kiek reikės pagal 19 punkte pateiktus nurodymus paruoštų 24 duobučių plokštelių, priklausys nuo cheminių medžiagų, kurių bandymus numatoma atlikti, skaičiaus ir kultūrų auginimo indų užpildymo ląstelėmis. Iš esmės ląstelių iš vienos (75 cm^2) 80–90 % užpildytos kultūrų auginimo kolbos pakanka 1–1,5 (24 duobučių) plokštelės, kai tikslinis tankis – 200 000–300 000 ląstelių viename terpės mililitre; po 24 valandų duobutės užpildomos maždaug 50–60 %. Paprastai atliekant analizę tai yra optimalus ląstelių tankis hormonų gamybai. Esant didesniam tankiui, testosterono ir E2 gamybos ypatumai keičiasi. Prieš atliekant analizę pirmą kartą, rekomenduojama išbandyti skirtingus pasėlio tankius – nuo 200 000 iki 300 000 ląstelių viename mililitre, ir tolesniems eksperimentams rinktis tokį tankį, kurį naudojant po 24 valandų duobutė būtų užpildyta 50–60 %.

2 paveikslas

H295R ląstelių, kurių pasėlio 24 duobučių plokštelėje tankis – 50 %, fotomikrografija, padaryta prie duobutės krašto (A) ir duobutės centre (B) praėjus 24 valandoms.



22. Terpė pipete ištraukiama iš kultūrų auginimo kolbos, o ląstelės tris kartus praplaunamos steriliu FBDT (be Ca^{2+} Mg^{2+}). Siekiant atskirti ląsteles nuo kultūrų auginimo kolbos sienelių, (į FBDT) įpilama fermento tirpalo. Praėjus atitinkamam laikotarpiui, per kurį ląstelės atsiskiria nuo kolbos sienelių, fermento veikimą reikėtų sustabdyti į kolbą įpilant priedais papildytos terpės, kurios kiekis turėtų būti 3 kartus didesnis už ląstelių apdorojimui naudoto fermento kiekį. Ląstelės supilamos į centrifuginį mėgintuvėlį, centrifuguojamos kambario temperatūroje, supernatantas pašalinamas, o nusėdusios ląstelės vėl suspenduojamos priedais papildytoje terpėje. Ląstelių tankis apskaičiuojamas naudojant, pvz., hemocitometrą arba ląstelių skaičiuotuvą.

▼M5

Ląstelių tirpalą reikėtų atskiesti iki naudojimui plokštelėse pageidaujamo tankio ir kruopščiai išmaišyti siekiant užtikrinti ląstelių tankio homogeniškumą. Ląsteles reikėtų pasėti plokštelėje, į kiekvieną duobutę įpilant po 1 ml ląstelių tirpalo, o plokšteles ir duobutes – paženklinti. Plokštelės su pasėliu 24 valandas inkubuojamos 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO_2 koncentracijai ore, kad ląstelės galėtų prikibti prie duobučių.

KOKYBĖS KONTROLĖS REIKALAVIMAI

23. Labai svarbu, kad į duobutes būtų įpilta tiksliai tiek tirpalų ir mėginių, kiek reikia, nes nuo šių kiekių priklauso koncentracija, naudojama apskaičiuojant analizės rezultatus.

24. Prieš pradėdama auginti ląsteles mitybos terpėje ir atlikdama visus tolesnius bandymus, kiekviena laboratorija turėtų įrodyti, kad jų naudojama hormonų matavimo sistema yra jautri (29–31 punktai).

25. Jeigu hormonams matuoti numatoma naudoti antikūnais grindžiamus analizės metodus, prieš pradedant bandymus, reikėtų ištirti, ar cheminės medžiagos, kurių bandymus numatoma atlikti, negali turėti neigiamos įtakos testosterono ir E2 kiekiui nustatyti naudojamos matavimo sistemos tikslumui, kaip išdėstyta 32 punkte.

26. Šiai analizei rekomenduojama kaip tirpiklį naudoti dimetilsulfoksidą (DMSO). Jeigu naudojamas kitas tirpiklis, reikia nustatyti:

— bandomosios cheminės medžiagos, forskolino ir prochlorazo tirpumą tirpiklyje;

— citotoksiškumą, kaip tirpiklio koncentracijos funkciją.

Rekomenduojama, kad didžiausia leidžiama tirpiklio koncentracija neviršytų 10 kartų atskiestos mažiausio citotoksiškumo tirpiklio koncentracijos.

27. Prieš atlikdama bandymus pirmą kartą, laboratorija turėtų atlikti kvalifikacinį eksperimentą, kuris įrodytų, kad joje galima sukurti ir palaikyti atitinkamas ląstelių auginimo mitybos terpėje ir eksperimento sąlygas, kurios būtinos atliekant cheminių medžiagų bandymus, kaip aprašyta 33–35 punktuose.

28. Pradedant cheminių medžiagų bandymus su nauja ląstelių grupe, prieš pradedant naudoti naują ląstelių grupę, pasitelkus kontrolinę plokštelę reikėtų įvertinti ląstelių veiksmingumą, kaip aprašyta 36 ir 37 punktuose.

Hormonų matavimo sistemos veiksmingumas

Metodo jautrumas, patikimumas, tikslumas ir kryžminis reaktyvumas su mėginio matrica

29. Siekdama ištirti testosterono ir E2 gamybą H295R ląstelėse, kiekviena laboratorija gali naudoti savo pasirinktą hormonų matavimo sistemą, jeigu ji atitinka veiksmingumo kriterijus, įskaitant kiekybinio nustatymo ribą. Techniškai tai gali būti 100 pg/ml testosterono atveju ir 10 pg/ml E2 atveju; šie skaičiai grindžiami baziniais atliekant tinkamumo patvirtinimo tyrimus nustatytais hormonų kiekiais. Vis dėlto, atsižvelgiant į tai, koks bazinis hormonų kiekis nustatytas bandymus atliekančioje laboratorijoje, tinkama gali būti ir didesnė, ir mažesnė koncentracija. Prieš pradėdama naudoti KK plokšteles ir pradėdama bandymų serijas, laboratorija turėtų įrodyti, kad hormonų analize, kurią numatoma naudoti, t. y. analizuojant priedais papildytą terpę, į kurią

▼M5

suleista vidinio kontrolinio bandinio hormono, hormonų koncentraciją priedais papildytoje terpėje galima nustatyti taip patikimai ir tiksliai, kad analizė atitiktų 1 ir 5 lentelėse nurodytus KK kriterijus. Į priedais papildytą terpę reikia suleisti kiekvieno ne mažiau kaip trijų dydžių koncentracijos hormono (pvz., 100, 500 and 2 500 pg/ml testosterono; 10, 50 ir 250 pg/ml E2; arba galima naudoti mažiausios koncentracijos testosterono ir E2 preparatą, t. y. pasirinkti galimą mažiausią koncentraciją, apskaičiuotą pagal pasirinktos hormonų matavimo sistemos radimo ribas), ir ją reikėtų ištirti. Nustatyta hormonų koncentracija neekstrahuotuose mėginiuose turėtų skirtis nuo nominaliosios koncentracijos ne daugiau kaip 30 %, o pakartoti to paties mėginio matavimai neturėtų skirtis daugiau kaip 25 % (taip pat žr. papildomus KK kriterijus 8 lentelėje). Jeigu šie KK kriterijai įvykdyti, daroma prielaida, kad pasirinkta hormonų matavimo analizės sistema yra pakankamai patikima, tiksli ir kryžmiškai nereaguoja su terpės sudedamosiomis dalimis (mėginio matrica) taip, kad tai galėtų stipriai paveikti analizės rezultatus. Šiuo atveju prieš matuojant hormonus, ekstrahuoti mėginių nereikia.

30. Jeigu 1 ir 8 lentelėse nurodyti KK kriterijai neįvykdyti, gali pasireikšti stiprus matricos efektas, ir eksperimentą reikia atlikti su ekstrahuota terpe, į kuria buvo suleista vidinio kontrolinio bandinio hormono. Ekstrahavimo proceso pavyzdys aprašytas tinkamumo patvirtinimo ataskaitos II priedėlyje (4). Hormonų koncentraciją kiekviename ekstrahuotame mėginyje reikėtų matuoti trijose duobutėse ([1]). Jeigu galima įrodyti, kad po ekstrahavimo terpės sudedamosios dalys neturi neigiamos įtakos taikant hormonų nustatymo metodą atliekamų matavimų tikslumui, kaip apibrėžta KK kriterijuose, visi tolesni eksperimentai turėtų būti atliekami naudojant ekstrahuotus mėginius. Jeigu po ekstrahavimo KK kriterijai neįvykdomi, naudojama hormonų matavimo sistema yra netinkama H295R steroidogenezės analizei atlikti, todėl reikėtų naudoti kitą hormonų nustatymo metodą.

Standartinė kreivė

31. Hormonų koncentracija kontroliniuose bandiniuose tirpikliuose (KBT) turėtų būti standartinės kreivės tiesinės koreliacijos atkarpoje. Būtų geriau, jei KBT reikšmės būtų išsidėsčiusios arti tiesinės koreliacijos atkarpos vidurio; tai užtikrintų galimybę išmatuoti, kaip stipriai indukuojama ir slopinama hormonų sintezė. Atsižvelgiant į tai, pasirenkamos praskiestos terpės (arba ekstraktai), kurias numatoma vertinti. Tiesinis ryšis nustatomas taikant atitinkamą statistinį metodą.

Cheminių medžiagų poveikio matavimų tikslumui bandymas

32. Jeigu hormonams matuoti numatoma naudoti antikūnais grindžiamus analizės metodus, pvz., imunofermentinės analizės sistemas (angl. ELISA) ir radioimuninės analizės metodus, prieš pradedant faktinius cheminių medžiagų bandymus, reikėtų ištirti kiekvieną cheminę medžiagą, kurios bandymus numatoma atlikti, siekiant nustatyti, ar ji negali turėti neigiamos įtakos hormonų matavimo sistemos tikslumui (tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) III priedėlis, nes kai kurios cheminės medžiagos gali pakenkti šių bandymų tikslumui (17). Jeigu, atlikus hormonų analizę nustatoma, kad matavimo netikslumai testosterono ir (arba) E2 atveju atitinka arba viršija 20 % bazinės hormonų gamybos, cheminės medžiagos poveikio hormonų analizės tikslumui bandymą (angl. *Chemical Hormone Assay Interference*

([1]) *Pastaba.* Jeigu ekstrahuoti būtina, kiekviename ekstrakte matavimai kartojami tris kartus. Kiekvienas mėginys ekstrahuojamas tik kartą.

▼M5

Test, pvz., aprašytąjį tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) II priedėlio 5.0 skyriuje) reikėtų atlikti su visais praskiestais pradiniais bandomųjų cheminių medžiagų tirpalais, kad būtų galima nustatyti slenkstinę dozę, kurią viršijus užfiksuojama didelių netikslumų (≥ 20 %). Jeigu matavimo netikslumai nesiekia 30 %, rezultatus galima pakoreguoti atsižvelgiant į poveikį matavimų tikslumui. Jeigu matavimo netikslumai viršija 30 %, duomenys negalioja ir šių dydžių koncentracijos analizės duomenis reikėtų atmesti. Jeigu esant skirtingai citotoksiško poveikio neturinčiai koncentracijai bandomoji cheminė medžiaga stipriai neigiamai veikia hormonų matavimo sistemos tikslumą, reikėtų naudoti kitą hormonų matavimo sistemą. Siekiant išvengti neigiamos cheminių medžiagų priemaišų įtakos matavimų tikslumui, rekomenduojama iš terpės hormonus ekstrahuoti naudojant tinkamą tirpiklį; galimi metodai aprašyti tinkamumo patvirtinimo ataskaitoje (4).

1 lentelė

Hormonų matavimo sistemų veiksmingumo kriterijai

Parametras	Kriterijus
Matavimo metodo jautrumas	Kiekybinio nustatymo riba (LOQ) Testosteronas: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml ([a])
Hormonų ekstrahavimo veiksmingumas (tik kai ekstrahuoti būtina)	Vidutinis iš tirpalo regeneruotas hormono kiekis (remiantis trimis matavimais) nuo pridėto kiekio neturėtų skirtis daugiau kaip 30 %.
Cheminės medžiagos poveikis matavimų tikslumui (tik antikūnais grindžiamos sistemos)	Neturėtų būti stiprių (atitinkamo hormono atveju ≥ 30 % bazinio hormonų gamybos lygio) kryžminių reakcijų nė su vienu ląstelių gaminamu hormonu ([b]) ([c])

([a]) *Pastaba.* Metodo matavimo ribos pagrįstos bazinio hormonų gamybos lygio reikšmėmis, kurios pateikiamos 5 lentelėje, ir priklauso nuo veiksmingumo. Jeigu galima pasiekti didesnį bazinį hormonų gamybos lygį, riba gali būti aukštesnė.

([b]) Esant didesniam procentiniam dydžiui, kai kurie testosterono antikūnai gali kryžmiškai reaguoti su androstendionu, o E2 antikūnai– su estronu. Tokiais atvejais neįmanoma tiksliai nustatyti poveikio 17β-HSD. Vis dėlto šie duomenys gali suteikti naudingos informacijos apskritai apie poveikį estrogenų ar androgenų gamybai. Tokiais atvejais duomenis reikėtų išreikšti kaip androgenų ir (arba) estrogenų, o ne E2 ir testosterono reakciją.

([c]) Ląstelių gaminami hormonai: cholesterolis, pregnenolonas, progesteronas, 11-deoksikortikosteronas, kortiosteronas, aldosteronas, 17α-pregnenolonas, 17α-progesteronas, deoksikortizolis, kortizolis, DHEA, androstenedionas, estronas.

Laboratorijos kvalifikacinis bandymas

33. Prieš pradėdama nežinomų cheminių medžiagų bandymus, laboratorija, atlikdama laboratorijos kvalifikacinį bandymą, turėtų įrodyti, kad joje galima sukurti ir palaikyti atitinkamas ląstelių auginimo mitybos terpėje ir bandymų sąlygas, kurios būtinos siekiant sėkmingai atlikti analizę. Kadangi analizės atlikimo sėkmė tiesiogiai susijusi su analizę atliekančiais laboratorijos darbuotojais, įvykus laboratorijos personalo pokyčiams, šias procedūras reikėtų iš dalies pakartoti.

34. Šis kvalifikacinis bandymas atliekamas tokiomis pat sąlygomis, kurios išvardytos 38–40 punktuose: ląstelėse veikiamos 7 dydžių koncentracijos stipriais, vidutinio stiprumo ir silpnais induktoriais ir inhibitoriais, taip pat neigiamo krūvio chemine medžiaga (žr. 2 lentelę). Kaip matyti iš 2 lentelės, tarp cheminių medžiagų, kurių bandymus reikia atlikti – stiprus induktorius forskolinas (CAS Nr. 66575–29–9), stiprus inhibitorius prochlorazas (CAS Nr. 67747–09–5), vidutinio stiprumo induktorius atrazinas (CAS Nr. 1912–24–9), vidutinio stiprumo inhibitorius aminogliutetimidas (CAS Nr. 125–84–8), silpnas E2 gamybos induktorius ir silpnas testosterone gamybos

▼M5

inhibitorius bisfenolis A (CAS Nr. 80–05–7) ir neigiama cheminė medžiaga žmogaus choriono gonadotropinas (ŽCG) (CAS Nr. 9002–61–3). Visų cheminių medžiagų bandymai atliekami naudojant atskiras plokšteles, taip, kaip nurodyta 6 lentelėje. Atliekant bandymus su kvalifikaciniam bandymui skirtomis cheminėmis medžiagomis, kasdien naudojama po vieną KK plokštelę (4 lentelė, 36–37 punktai).

2 lentelė

Kvalifikaciniam bandymui skirtos cheminės medžiagos ir jų koncentracija

Kvalifikaciniam bandymui skirta cheminė medžiaga	Bandomoji koncentracija [μM]
prochlorazas	0 ([a]); 0,01; 0,03; 0,1; 0.3; 1; 3; 10;
forskolinas	0 ([a]); 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3, 10, 30;
atrazinas	0 ([a]); 0,03; 0.1; 1; 3; 10; 30; 100;
aminogliutetimidas	0 ([a]); 0,03; 0.1; 1; 3; 10; 30; 100;
bisfenolis A	0 ([a]); 0,03; 0.1; 1; 3; 10; 30; 100;
HCG	0 ([a]); 0,03; 0.1; 1; 3; 10; 30; 100.

([a]) Kontrolinis bandinys tirpiklis (DMSO) (0), 1 μl DMSO/duobutėje.

Atliekant laboratorijos kvalifikacinį bandymą, kvalifikaciniam bandymui skirtų cheminių medžiagų poveikio H295R ląstelėms bandymas turėtų būti atliekamas 24 duobučių plokštelėse. Visos bandomųjų cheminių medžiagų dozės nurodomos μM. Dozės suleidžiamos į duobutes su 0,1 % t/t DMSO. Bandymai su kiekviena bandomąja koncentracija atliekami trijose duobutėse (6 lentelė). Kiekvienai cheminei medžiagai naudojamos atskiros plokštelės. Atliekant bandymus, kasdien naudojama po vieną KK plokštelę.

35. Ląstelių gyvybingumo ir hormonų analizės atliekamos, kaip nurodyta 42–46 punktuose.Slenkstinę vertę (mažiausią pastebėto poveikio koncentraciją, LOEC) ir sprendimą dėl klasifikacijos reikėtų nurodyti ataskaitoje ir palyginti su 3 lentelėje pateiktomis reikšmėmis. Duomenys laikomi priimtinais, jeigu jie atitinka 3 lentelėje nurodytą LOEC ir sprendimą dėl klasifikacijos.

3 lentelė

Kvalifikaciniam bandymui skirtų cheminių medžiagų slenkstinės vertės (LOECs) ir sprendimai dėl klasifikacijos

	CAS Nr.	LOEC [μM]		Sprendimas dėl klasifikacijos	
		testosteronas	E2	testosteronas	E2
prochlorazas	67747–09–5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ ([a]) (slopinimas)	+ (slopinimas)
forskolinas	66575–29–9	≤ 10	≤ 0,1	+ (indukcija)	+ (indukcija)
atrazinas	1912–24–9	≤ 100	≤ 10	+ (indukcija)	+ (indukcija)
aminogliutetimidas	125–84–8	≤ 100	≤ 100	+ (inhibavimas)	+ (inhibavimas)

▼M5

	CAS Nr.	LOEC [μM]		Sprendimas dėl klasifikacijos	
		testosteronas	E2	testosteronas	E2
bisfenolis A	80–05–7	≤ 10	≤ 10	+ (inhibavimas)	+ (inhibavimas)
HCG	9002–61–3	netaikytina	netaikytina	neigiama	neigiama

([a]) + – teigiama
netaikytina – netaikytina, nes citotoksiško poveikio neturinti neigiamo kontrolinio bandinio koncentracija neturėtų sukelti pokyčių.

Kokybės kontrolės plokštelė

36. Kokybės kontrolės (KK) plokštelė naudojama siekiant patikrinti H295R ląstelių veiksmingumą standartinėmis ląstelių auginimo sąlygomis ir siekiant sukurti hormonų koncentracijos kontroliniuose bandiniuose tirpikliuose, teigiamuose ir neigiamuose kontroliniuose bandiniuose ir kitų laikui bėgant vertinamų KK rodiklių istorinių duomenų bazę.

— KK plokštelėje H295R ląstelių veiksmingumas turėtų būti vertinamas kaskart kai imama nauja ATCC ląstelių grupė arba pirmąkart panaudojus prieš tai užšaldytą pradinę ląstelių kultūrą, nebent su ta ląstelių grupe buvo atliekamas laboratorijos kvalifikacinis bandymas (32–34 punktai).

— KK plokštelė suteikia galimybę išsamiai įvertinti analizės sąlygas (pvz., ląstelių gyvybingumą, kontrolinius bandinius tirpiklius, neigiamus ir teigiamus kontrolinius bandinius, taip pat atliekant vieną ir kelias analizes gaunamų duomenų kintamumą) atliekant cheminių medžiagų bandymus ir turi būti naudojama kaskart, kai atliekamas bandymas.

37. KK bandymas atliekamas 24 duobučių plokštelėje, vadovaujantis tais pačiais inkubavimo, dozavimo, ląstelių gyvybingumo (citotoksiškumo) vertinimo, hormonų ekstrahavimo ir hormonų analizės atliekant cheminių medžiagų bandymus procesais, kurie aprašyti 38–46 punktuose. QC plokštelėje yra duobučių su tirpalu tuštiesiems bandymams, kontroliniais bandiniais tirpikliais ir dviejų dydžių koncentracijos žinomu E2 ir testosterono sintezės induktoriumi (forskolinu, 1; 10 μM) ir inhibitoriumi (prochlorazu, 0,1; 1 μM) Be to, atrinktose duobutėse kaip gyvybingumo (citotoksiškumo) analizės teigiamas kontrolinis bandinys naudojamas MeOH. 4 lentelėje pateikiamas išsamus išdėstymo plokštelėje aprašymas. Kriterijai, kurių reikia laikytis KK plokštelėje, išvardyti 5 lentelėje. Mažiausias bazinis hormonų testosterono ir E2 gamybos lygis turi būti pasiektas ir kontrolinio bandinio tirpiklio, ir tuščiajam bandymui skirtose duobutėse.

4 lentelė

Išdėstymas kokybės kontrolės plokštelėje, kai siekiama atlikti cheminėmis medžiagomis neveikiamų H295R ląstelių ir H295R ląstelių, veikiamų žinomais E2 ir testosterono gamybos inhibitoriais (PRO = prochlorazas) ir stimuliatoriais (FOR = forskolinas), veiksmingumo bandymus. Užbaigus poveikio eksperimentą ir pašalinus terpę, į visas MeOH duobutes suleidžiama 70 % metanolio tirpalo, kuris naudojamas kaip teigiamas kontrolinis bandinys citotoksiškumui įvertinti (žr. citotoksiškumo analizę tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) III priedėlyje).

	1	2	3	4	5	6
A	tuščiasis bandymas ([a])	tuščiasis bandymas ([a])	tuščiasis bandymas ([a])	tuščiasis bandymas ([a]) (+ MeOH) ([b])	tuščiasis bandymas ([a]) (+ MeOH) ([b])	tuščiasis bandymas ([a]) (+ MeOH) ([b])
B	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])

▼M5

	1	2	3	4	5	6
C	FOR 1 μM	FOR 1 μM	FOR 1 μM	PRO 0.1 μM	PRO 0.1 μM	PRO 0,1 μM
D	FOR 10 μM	FOR 10 μM	FOR 10 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM

([a]) Tuščiajam bandymui skirtose duobutėse esančioms ląstelėms suleidžiama tik terpės (t. y. be tirpiklio).
([b]) Metanolio (MeOH) suleidžiama **po to**, kai užbaigiamas poveikio bandymas ir terpė pašalinama iš šių duobučių.
([c]) Kontrolinis bandinys tirpiklis DMSO (po 1 μl duobutėje).

5 lentelė

Kokybės kontrolės plokštelių veiksmingumo kriterijai

	Testosteronas	E2
Bazinis hormono gamybos lygis kontroliniame bandinyje tirpiklyje (KBT)	≥ 5 kartus viršija LOQ	≥ 2,5 karto viršija LOQ
Indukcija (10 μM forskolino)	≥ 1,5 karto didesnė gamybos apimtis, palyginti su KBT	≥ 7,5 karto didesnė gamybos apimtis, palyginti su KBT
Inhibavimas (1 μM prochlorazo)	≤ 0,5 karto mažesnė gamybos apimtis, palyginti su KBT	≤ 0,5 karto mažesnė gamybos apimtis, palyginti su KBT

LĄSTELIŲ VEIKIMO CHEMINĖMIS MEDŽIAGOMIS PROCESAS

38. Prieš bandymą inkubuotos ląstelės išimamos iš inkubatoriaus (21 punktas) ir apžiūrimos po mikroskopu, siekiant prieš dozavimą įsitikinti, kad jų būklė (kibimas, morfologija).yra gera.

39. Ląstelės dedamos į mikrobiologinės saugos spintą, pašalinama priedais papildyta terpė ir ji pakeičiama nauja priedais papildyta terpe (po 1 ml duobutėje). Šiam bandymo metodui rekomenduojamas tirpiklis DMSO. Vis dėlto, jei yra priežasčių, dėl kurių reikėtų naudoti kitus tirpiklius, reikėtų aprašyti mokslinį loginį pagrindimą. Ląstelės veikiamos bandomąja chemine medžiaga, 1 μl atitinkamo pradinio tirpalo su DMSO (žr. tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) II priedėlį) suleidžiant į 1 ml priedais papildytos terpės (duobutės tūris). Gaunama galutinė DMSO koncentracija duobutėse – 0,1 %. Kad medžiagos gerai susimaišytų, paprastai rekomenduojama atitinkamą bandomosios cheminės medžiagos pradinį tirpalą su DMSO sumaišyti su priedais papildyta terpe, kad kiekvienoje dozėje būtų pageidaujama galutinė koncentracija, ir pašalinus seną terpę, tuo mišiniu nedelsiant pripildyti kiekvieną duobutę. Jeigu taikomas šis būdas, DMSO koncentracija (0,1 %) turėtų išlikti nuosekli visose duobutėse. Naudojant stereomikroskopą, apžiūrima, ar duobutėse, kuriose yra dviejų didžiausių dydžių koncentracija, nesusidarė nuosėdos ar drumzlės – tai reikštų, kad bandomoji cheminė medžiaga ne visiškai ištirpo. Pastebėjus tokias savybes (drumzles, nuosėdas), duobutės su mažesnės koncentracijos medžiaga taip pat apžiūrimos (ir taip toliau), ir tie koncentracijos dydžiai, kuriems esant medžiagos nevisiškai ištirpo, išbraukiamos iš tolesnio vertinimo ir analizės. Plokštelė 48 valandoms gražinama į inkubatorių, kuriame palaikoma 37 °C temperatūra ir 5 % CO_2 koncentracija ore. Bandomosios cheminės medžiagos išdėstymas plokštelėje pateikiamas 6 lentelėje. Iš pradinių tirpalų, pažymėtų skaičiais nuo 1 iki 7 matyti, kokia tvarka bandomosios cheminės medžiagos dozė didėja.

▼M5

6 lentelė

Bandomosios medžiagos, kuria veikiamos H295R ląstelės, dozavimo 24 duobučių plokštelėje schema

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	4 pradinis tirpalas	4 pradinis tirpalas	4 pradinis tirpalas
B	1 pradinis tirpalas	1 pradinis tirpalas	1 pradinis tirpalas	5 pradinis tirpalas	5 pradinis tirpalas	5 pradinis tirpalas
C	2pradinis tirpalas	2 pradinis tirpalas	2 pradinis tirpalas	6 pradinis tirpalas	6 pradinis tirpalas	6 pradinis tirpalas
D	3 pradinis tirpalas	3 pradinis tirpalas	3 pradinis tirpalas	7 pradinis tirpalas	7 pradinis tirpalas	7 pradinis tirpalas

40. Po 48 valandų plokštelės, kuriose ląstelės buvo veikiamos cheminėmis medžiagomis, išimamos iš inkubatoriaus; per mikroskopą įvertinama kiekvienoje duobutėje esančių ląstelių būklė (kibimas, morfologija, užpildymo laipsnis) ir apžiūrima, ar nėra citotoksiškumo požymių. Terpė iš kiekvienos duobutės padalijama į dvi vienodas dalis (po maždaug 490 µl) ir jos perkeliamos į du atskirus atitinkamai paženklintus buteliukus (t. y. vienas bandinys bus naudojamas kaip atsarginis terpės iš kiekvienos duobutės ėminys). Kad ląstelės neišdžiūtų, terpė sykiu pašalinama iš vienos eilutės arba stulpelio duobučių ir pakeičiama ląstelių gyvybingumo ir (arba) citotoksiškumo analizei skirta terpe. Jeigu ląstelių gyvybingumą ir (arba) citotoksiškumą numatoma vertinti ne tuoj pat, o vėliau, kiekviena duobutė papildoma FBDT su Ca^{2+} ir Mg^{2+}. Terpės užšaldomos – 80 °C temperatūroje ir saugomos iki tolesnio jų apdorojimo siekiant ištirti hormonų koncentraciją (žr. 44–46 punktus). Nors – 80 °C temperatūroje saugomoje terpėje esantys testosteronas ir E2 yra iš esmės stabilūs ne mažiau kaip 3 mėnesius, kiekvienoje laboratorijoje hormonų stabilumas saugojimo laikotarpiu turėtų būti patvirtintas dokumentais.

41. Pašalinus terpę, nedelsiant nustatomas kiekvienoje plokštelėje, kurioje ląstelės buvo veikiamos cheminėmis medžiagomis, esančių ląstelių gyvybingumas ir (arba) pasireiškęs citotoksiškumas.

Ląstelių gyvybingumo nustatymas

42. Pasirinktu ląstelių gyvybingumo ir (arba) citotoksiškumo analizės metodu galima nustatyti galimą bandomosios cheminės medžiagos poveikį ląstelių gyvybingumui. Naudojant šį analizės metodą, turėtų būti galimybė tiksliai nustatyti duobutėje esančių gyvybingų ląstelių procentinę dalį, arba reikėtų įrodyti, kad ši analizė yra tiesiogiai palyginama su analizės sistema *Live/-Dead*® (jos tiesine funkcija) (žr. tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) III priedėlį). Kitas analizės metodas, kuris yra toks pat veiksmingas, – tai MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido] bandymas (18). Ląstelių gyvybingumo vertinimas naudojant minėtus metodus yra santykinis vertinimas, kuris nebūtinai turi patvirtinti tiesinį ryšį su visomis duobutėje esančiomis ląstelėmis. Todėl chemikai laborantai turėtų lygiagrečiai subjektyviai vizualiai įvertinti kiekvieną duobutę, padaryti ir archyve išsaugoti skaitmenines kontrolinių bandinių tirpiklių ir dviejų didžiausių dydžių netoksiškos koncentracijos tirpalų nuotraukas, kad vėliau būtų galima įvertinti tikslų ląstelių tankį, jei to prireiktų. Jeigu pažiūrėjus matyti arba gyvybingumo ir (ar) citotoksiškumo analizė patvirtina, kad ląstelių skaičius padidėjo, įtariamą padidėjimą reikia patikrinti ir patvirtinti. Jeigu ląstelių skaičiaus padidėjimas patvirtinamas, tai reikėtų nurodyti bandymo ataskaitoje. Ląstelių gyvybingumas išreiškiamas santykiu su vidutiniu kontroliniuose bandiniuose tirpikliuose nustatytu atsaku, t. y. 100 % ląstelių gyvybingumu, ir apskaičiuojamas pagal naudotą ląstelių gyvybingumo ir (arba) citotoksiškumo analizės metodą. Atliekant MTT analizę, galima naudoti šią formulę:

▼M5

% gyvybingų ląstelių = (atsakas duobutėje – vidutinis atsakas MeOH apdorotose [= 100 % žuvusių ląstelių] duobutėse) ÷ (vidutinis atsakas KBT duobutėse – vidutinis atsakas MeOH apdorotose [= 100 % žuvusių ląstelių] duobutėse)

43. Duobutės, kuriose ląstelių gyvybingumas (palyginti su vidutiniu gyvybingumu kontroliniuose bandiniuose tirpikliuose, t. y. 100 % gyvybingumu), yra mažesnis nei 80 %, neturėtų būti įtraukiamos į galutinę duomenų analizę. Jeigu steroidogenezė slopinama esant beveik 20 % citotoksiškumui, tai reikėtų atidžiai įvertinti, siekiant įsitikinti, kad citotoksiškumas nėra inhibavimo priežastis.

Hormonų analizė

44. Testosterono ir E2 analizei kiekviena laboratorija gali naudoti savo pasirinktą hormonų matavimo sistemą. Atsarginius terpės mėginius iš kiekvienos gydymo grupės galima naudoti tirpalų praskiedimui, kad koncentracija patektų į standartinės kreivės tiesinės koreliacijos atkarpą. Kaip minėta 29 punkte, kiekviena laboratorija, prieš atlikdama KK bandymus arba bandydama chemines medžiagas, turėtų priedais papildytos terpės, į kurią suleista vidinio kontrolinio bandinio hormono, analize įrodyti, kad jos naudojama hormonų matavimo sistema (pvz., ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) atitinka KK kriterijus. Siekiant užtikrinti, kad bandymo sistemos sudedamosios dalys nedarytų neigiamos įtakos hormonų matavimų tikslumui, prieš atliekant hormonų matavimus, juos gali tekti ekstrahuoti iš terpių (žr. sąlygas, kuriomis mėginius ekstrahuoti būtina arba ne, 30 punkte). Ekstrahuoti mėginius rekomenduojama vadovaujantis tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) III priedėlyje nurodyta tvarka.

45. Jeigu hormonų gamybai įvertinti naudojamas komercinis bandymų rinkinys, hormonų analizę reikėtų atlikti taip, kaip nurodyta bandymų rinkinio gamintojo parengtoje instrukcijoje. Dauguma gamintojų yra sukūrę unikalią procedūrą, pagal kurią atliekamos hormonų analizės. Praskiestus mėginius reikia pakoreguoti taip, kad numatyta hormonų koncentracija kontroliniuose bandiniuose tirpikliuose išsidėstytų apie pavienės analizės standartinės kreivės tiesinės koreliacijos atkarpos vidurį (tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) III priedėlis). Į standartinės kreivės tiesinės koreliacijos atkarpą nepatekusias reikšmes reikėtų atmesti.

46. Galutinė hormonų koncentracija apskaičiuojama taip:

Pavyzdys

Ekstrahuota:	450 µl terpės
Atskiesta:	250 µl analizės buferiniame tirpale
Praskiesta atliekant analizę	santykiu 1:10 (kad mėginys patektų į standartinės kreivės tiesinės koreliacijos atkarpą)
Hormonų koncentracija atliekant analizę:	150 pg/ml (jau pakoreguota pagal koncentraciją mililitrui analizuoto mėginio)
Regeneruota:	89 %
Galutinė hormonų koncentracija	(hormonų koncentracija (viename mililitre) ÷ regeneruota dalis) (praskiedimo faktorius)
Galutinė hormonų koncentracija	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

▼M5

Bandomosios koncentracijos pasirinkimas

47. Analizė turėtų būti atliekama ne mažiau kaip du kartus. Jeigu bandomosios koncentracijos dydžių negalima pasirinkti remiantis anksčiau gauta informacija, pvz., informacija apie tirpumo ribas arba citotoksiškumą, analizę atliekant pirmą kartą, rekomenduojama bandomąją koncentraciją išdėstyti dešimtainio logaritmo (log_{10}) intervalais, kai 10–3 M – didžiausia koncentracija. Jeigu cheminė medžiaga yra tirpi ir necitotoksiška esant jokiai bandomajai koncentracijai ir pirmąkart atliekant analizę su bet kurio dydžio koncentracijos tirpalu, rezultatai buvo neigiami, tuomet tai reikia patvirtinti dar viena analize tokiomis pat sąlygomis, kokiomis buvo atlikta pirmoji (7 lentelė). Jeigu pirmąkart atlikus analizę, gauti rezultatai yra *dviprasmiški* (t. y. kartais išreikštas pokytis yra statistiškai reikšmingas, palyginti su KBT, naudojant tik vieno dydžio koncentraciją) arba teigiami (t. y. kartais išreikštas pokytis naudojant dviejų ar gretimų dydžių koncentraciją yra statistiškai reikšmingas), bandymą reikėtų pakartoti, kaip nurodyta 7 lentelėje, patikslinus pasirinktus bandomosios koncentracijos dydžius. Analizę atliekant antrą ir trečią kartą (jei taikytina), bandomąją koncentraciją reikėtų pakoreguoti remiantis pirmąkart atliktos analizės rezultatais, koncentracijos dydžius išdėstant per 1/2-log nuo poveikį sukėlusios koncentracijos (*pvz.*, jeigu atliekant pirminę analizę su 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1 000 μM koncentracijos tirpalais, indukcinis poveikis pasireiškė esant 1 ir 10 μM koncentracijai, antrąkart reikėtų bandyti tokių dydžių koncentraciją: 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 μM), nebent reikia mažesnės koncentracijos LOEC pasiekti. Pastaruoju atveju, analizę atliekant antrą kartą reikėtų naudoti ne mažiau kaip penkių dydžių koncentraciją, mažesnę už pirmąkart naudotą mažiausią koncentraciją, taikant 1/2-log skalę. Jeigu antrą kartą atlikta analizė nepatvirtina pirmąkart atliktos analizės rezultatų (*t. y.* naudojant koncentraciją, kuri ± 1 skiriasi nuo prieš tai bandytos koncentracijos, kurios analizės rezultatai buvo teigiami, statistiškai reikšmingų rezultatų negauta), pirminio bandymo sąlygomis reikia atlikti trečią bandymą. Pirmą kartą atlikus analizę gauti dviprasmiški rezultatai laikomi neigiamais, jeigu nė viena iš dviejų tolesnių analizių nepatvirtino nustatyto poveikio. Dviprasmiškai rezultatai laikomi teigiamu atsaku (poveikiu), jeigu atsaką galima patvirtinti bent dar vienąkart atlikta analize, koncentraciją pakoregavus ± 1 (žr. 55 skyrių „Duomenų aiškinimo tvarka“.)

7 lentelė

Sprendimų matrica pagal galimus rezultatų scenarijus

1 bandymo kartas	2 bandymo kartas		3 bandymo kartas		Sprendimas	
Scenarijus	Sprendimas	Scenarijus	Sprendimas	Scenarijus	Teigiamas	Neigiamas
Rezultatai neigiami	Patvirtinti ([a])	Rezultatai teigiami	Nutraukti			X
Rezultatai neigiami	Patvirtinti ([a])	Rezultatai teigiami	Atlikti išsamesnę analizę ([b])	Rezultatai neigiami		X
Rezultatai dviprasmiški ([c])	Atlikti išsamesnę analizę ([b])	Rezultatai neigiami	Patvirtinti ([a])	Rezultatai neigiami		X
Rezultatai dviprasmiški ([c])	Atlikti išsamesnę analizę ([b])	Rezultatai neigiami	Patvirtinti ([a])	Rezultatai teigiami	X	
Rezultatai dviprasmiški ([c])	Atlikti išsamesnę analizę ([b])	Rezultatai teigiami			X	
Rezultatai teigiami	Atlikti išsamesnę analizę ([b])	Rezultatai neigiami	Patvirtinti ([a])	Rezultatai teigiami	X	

▼M5

1 bandymo kartas	2 bandymo kartas		3 bandymo kartas		Sprendimas	
Scenarijus	Sprendimas	Scenarijus	Sprendimas	Scenarijus	Teigiamas	Neigiamas
Rezultatai neigiami	Patvirtinti ([a])	Rezultatai teigiami	Atlikti išsamesnę analizę ([b])	Rezultatai teigiami	X	
Rezultatai teigiami	Atlikti išsamesnę analizę ([b])	Rezultatai teigiami	Nutraukti		X	

([a]) Patvirtinti ankstesnio bandymo karto rezultatus taikant tokį pat eksperimento modelį.
([b]) Pakartoti analizę koncentracijos dydžius išdėstant kas 1/2-log (pasirenkant koncentracijos dydžius, kurie nedaug skiriasi nuo koncentracijos, kurios bandymo rezultatai atliekant ankstesnį eksperimentą buvo visai kitokie.
([c]) Kartais išreikštas pokytis esant vienai koncentracijai statistiškai reikšmingai skiriasi, lyginant su KBT.

Bandymo plokštelės kokybės kontrolė

48. Be kriterijų, kurie keliami KK plokštelei, reikia laikytis ir kitų kokybės kriterijų, susijusių su priimtinu rezultatų kintamumu kartojant eksperimentą toje pačioje duobutėje, atliekant kartotinius bandymus, hormonų matavimo sistemų tiesinės priklausomybės ir jautrumo kintamumu, rezultatų kintamumu pakartotinai matuojant hormonų koncentraciją tame pačiame mėginyje (jei taikytina, žr. 30 punktą dėl ekstrahavimui keliamų reikalavimų) ir po terpės ekstrahavimo regeneruoto papildomai suleisto hormono procentinės dalies kintamumu; šie kriterijai pateikiami 8 lentelėje. Jeigu šie kriterijai neįvykdyti, skaičiuoklėje reikėtų nurodyti, jog susijusio mėginio atveju KK kriterijai nebuvo įvykdyti, ir reikėtų atlikti pakartotinę mėginio analizę arba išbraukti to mėginio duomenis iš duomenų aibės.

8 lentelė.

Priimtini H295R analizės bandymų plokštelės parametrų intervalai ir (arba) kintamumas (%)

LOQ: hormonų matavimo sistemos LOQ VK: variacijos koeficientas; KBT: kontrolinis bandinys tirpiklis; SSPM: skilimų skaičius per minutę.

	Lyginama	Testosteronas	E2
Bazinis hormonų gamybos lygis kontroliniuose bandiniuose tirpikliuose	Kartais didesnis už LOQ	≥ 5 kartus	≥ 2,5 karto
Poveikio bandymai – Variacijos kontroliniuose bandiniuose tirpikliuose toje pačioje plokštelėje koeficientai (toje pačioje duobutėje	Absoliučioji koncentracija	≤ 30 %	≤ 30 %
Poveikio eksperimentai – KBT skirtingose plokštelėse VK (kartotiniai eksperimentai)	Pokytis kartais	≤ 30 %	≤ 30 %
Hormonų matavimo sistema – jautrumas	Nustatomas sumažėjimas kartais, palyginti su KBT	≥ 5 kartus	≥ 2,5 karto
Hormonų matavimo sistema – Kartotinių KBT rodiklių VK ([a])	Absoliučioji koncentracija	≤ 25 %	≤ 25 %
Terpės ekstrahavimas– Vidinio 3H etalono regeneravimas (jei taikytina)	SSPM	≥ 65 % nominaliosios reikšmės	

([a]) Kartotiniai to paties mėginio rodikliai.

▼M5

DUOMENŲ ANALIZĖ IR TEIKIMAS

Duomenų analizė

49. Siekiant įvertinti santykinį cheminėmis priemonėmis pakeisto hormonų gamybos lygio padidėjimą ir (arba) sumažėjimą, rezultatus reikia normalizuoti pagal vidutinę KBT vertę kiekvienoje bandomojoje plokštelėje, o rezultatus reikėtų išreikšti pokyčiu, lyginant su KBT kiekvienoje bandomojoje plokštelėje. Visi duomenys išreiškiami kaip vidurkis ± 1 standartinis nuokrypis (SN).

50. Į duomenų analizę įtraukiami tik tų duobučių hormonų duomenys, kuriose citotoksiškumas buvo mažesnis nei 20 %. Santykiniai pokyčiai apskaičiuojami taip:

Santykinis pokytis = (hormonų koncentracija kiekvienoje duobutėje)÷ (vidutinė hormonų koncentracija visose duobutėse su kontroliniu bandiniu tirpikliu)

51. Jeigu pažiūrėjus į duobutę matyti arba 42 punkte aprašyta gyvybingumo ir (arba) citotoksiškumo analizė patvirtina, kad ląstelių skaičius padidėjo, tariamą padidėjimą reikia patikrinti ir patvirtinti. Jeigu ląstelių skaičiaus padidėjimas patvirtinamas, tai reikėtų nurodyti bandymo ataskaitoje.

52. Prieš atliekant statistines analizes, reikėtų įvertinti prielaidas dėl normalumo ir sklaidos homogeniškumo. Normališkumą reikėtų vertinti naudojant standartinius tikimybių grafikus ar kitus atitinkamus statistinius metodus (pvz., Šapiro ir Vilko (*Shapiro-Wilk*) kriterijų. Jeigu duomenys (pokyčiai kartais) nenormaliai pasiskirstę, reikėtų pamėginti transformuoti duomenis, kad jie priartėtų prie normaliojo skirstinio. Jeigu duomenys normaliai pasiskirstę arba artėja prie normaliojo skirtinio, skirtumus tarp cheminių medžiagų koncentracijos grupių ir kontrolinių bandinių tirpiklių reikėtų analizuoti naudojant parametrinį kriterijų (*pvz*., Duneto (*Dunnett*) kriterijų), kai *koncentracija* – nepriklausomas kintamasis, o *atsakas* (pokytis kartais) – priklausomas kintamasis. Jeigu duomenys pasiskirstę nenormaliai, reikėtų naudoti atitinkamą neparametrinį kriterijų (*pvz.,* Kruskalo ir Voliso (*Kruskal Wallis*) kriterijų, Stylo kelių pusių-vienpusį kriterijų (angl. *Steel's Many-one rank test*); skirtumai laikomi reikšmingais kai $p \leq 0,05$. Statistiniai vertinimai atliekami remiantis vidutinėmis kiekvienos duobutės reikšmėmis, kurios atspindi nepriklausomus pakartotinius duomenų taškus. Manoma, kad dėl didelio dozių intervalo bandymą atliekant pirmą kartą ($\log_{10}$ pagrįsta sklaida) daugeliu atveju nebus galimybės aprašyti aiškaus koncentracijos ir atsako ryšio, kai dvi didžiausios dozės yra ant sigmoidinės kreivės tiesinės koreliacijos atkarpos. Todėl analizuojant pirmo bandymo karto ar bet kurias kitas duomenų aibes, kuriose bus ši sąlyga (*pvz.,* kur negalima įvertinti didžiausio veiksmingumo), bus taikoma I tipo fiksuotų kintamųjų statistika, kaip aprašyta pirmiau.

53. Jeigu kreivės tiesinės koreliacijos atkarpoje yra daugiau kaip du duomenų taškai ir kai galima apskaičiuoti didžiausią veiksmingumą – kaip numatoma kai kurių antrą kartą atliekamų bandymų, kai koncentracijos dydžiai išdėliojami kas pusę logaritmo, atveju – veiksmingai koncentracijai (pvz., VK50 ir VK20) apskaičiuoti, reikėtų naudoti probito, logito arba kitą atitinkamą regresijos modelį.

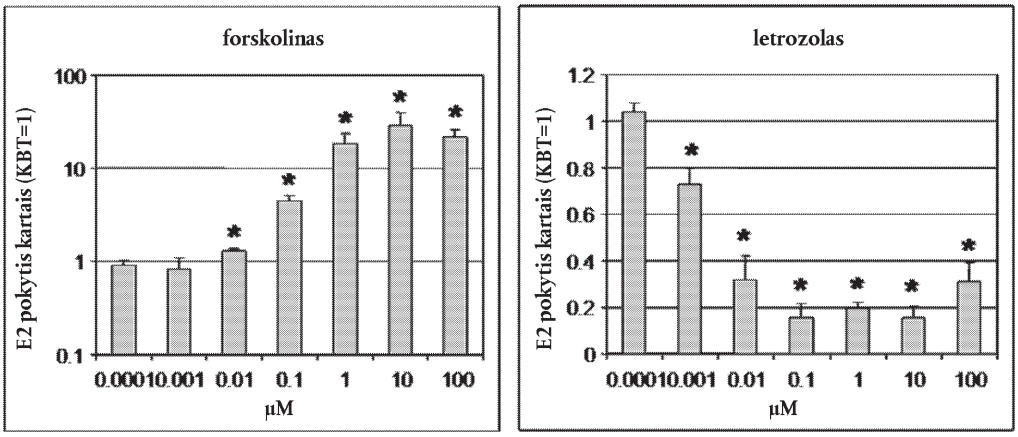
54. Rezultatus reikėtų pateikti ir grafikų (diagramų, kuriose pavaizduotas vidurkis ± 1 SN), ir lentelių (LOEC, NOEC, poveikio kryptis ir didžiausio atsako stiprumas, kuris yra dozės ir atsako santykio duomenų aibės dalis) forma (žr. pavyzdį 3 paveiksle). Duomenų vertinimas laikomas patikimu, jeigu jis pagrįstas ne mažiau kaip du kartus atliktais nepriklausomais bandymais. Eksperimentas arba bandymo kartas laikomas nepriklausomu, jeigu jis atliktas skirtingomis datomis naudojant naują tirpalų ir kontrolinių bandinių rinkinį. Bandymą atliekant antrą ir trečią kartą (jei reikia), koncentracijos intervalą galima pakoreguoti remiantis pirmo bandymo karto rezultatais, siekiant tiksliau apibrėžti dozės ir atsako santykio intervalą, kuriame yra LOEC (žr. 47 punktą).

▼M5

3 paveikslas

Duomenų, gautų atlikus H295R analizę, vertinimo ir pateikimo grafiko ir lentelės forma pavyzdys.

Žvaigždutė rodo statistiškai reikšmingus skirtumus, palyginti su KBT ($p < 0,05$). LOEC: mažiausio pastebėto poveikio koncentracija; Didžiausias pokytis: didžiausias atsako, stebėto esant bet kuriai koncentracijai, stiprumas, palyginti su vidutinio atsaku KBT (= 1).



Cheminė medžiaga	LOEC	Didžiausias pokytis
Forskolinas	0,01	0,15 karto
Letrozolas	0,001	29 kartus

Duomenų aiškinimo tvarka

55. Bandomoji cheminė medžiaga laikoma teigiama, jeigu kartais išreikšta indukcija statistiškai skiriasi ($p \leq 0,05$) nuo KBT esant dviejų gretutinių dydžių koncentracijai atlikus nepriklausomus bandymus ne mažiau kaip du kartus (7 lentelė). Bandomoji cheminė medžiaga laikoma neigiama, jeigu atlikus nepriklausomus bandymus du kartus, jų rezultatai buvo neigiami, arba jeigu atlikus nepriklausomus tris kartus, dviejų iš jų rezultatai buvo neigiami, o vieno – dviprasmiški arba teigiami. Jeigu trijų nepriklausomų eksperimentų metu gauti duomenys neatitinka 7 lentelėje išvardytų sprendimo kriterijų, eksperimentų rezultatai priskiriami prie neaiškintinų duomenų. Rezultatų, kurie gauti koncentracijai viršijant tirpumo ribas arba esant citotoksiškai koncentracijai, negalima įtraukti į rezultatų aiškinimą.

Bandymo ataskaita

56. Bandymo ataskaitoje turėtų būti ši informacija:

Bandymą atliekanti įstaiga

— įstaigos pavadinimas ir vieta;

— tyrimo vadovas, kiti personalo nariai ir jų pareigos atliekant tyrimą;

— tyrimo pradžios ir pabaigos datos.

▼M5

Bandomoji cheminė medžiaga, reagentai ir kontroliniai bandiniai

— Identifikaciniai duomenys (pavadinimas ir (arba) atitinkamas CAS Nr.), šaltinis, serijos ir (arba) partijos numeris, grynumas, tiekėjas ir bandomosios cheminės medžiagos, reagentų ir kontrolinių bandinių apibūdinimas;

— bandomosios cheminės medžiagos fizinis pobūdis ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės;

— bandomųjų cheminių medžiagų, reagentų ir kontrolinių bandinių saugojimo sąlygos bei paruošimo būdas ir dažnis;

— bandomosios cheminės medžiagos stabilumas.

Ląstelės

— Ląstelių šaltinis ir rūšis;

— bandyme naudojamų ląstelių pasažų skaičius (ląstelių pasažų identifikacinis žymėjimas);

— ląstelių kultūrų priežiūros tvarkos aprašymas.

Prieš atliekant bandymą keliami reikalavimai (jei taikytina)

— Cheminės medžiagos poveikio hormonų analizės tikslumui bandymo aprašymas ir rezultatai;

— hormonų ekstrahavimo veiksmingumo matavimų aprašymas ir rezultatai;

— visų analitinių analizių, kurias numatoma atlikti, standartinė ir kalibravimo kreivės;

— pasirinktų analitinių analizių aptikimo ribos.

Bandymo sąlygos

— Terpės sudėtis;

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracija;

— ląstelių tankis (apskaičiuota arba nustatyta ląstelių koncentracija po 24 ir 48 valandų);

— bandomosios cheminės medžiagos tirpumas (tirpumo riba, jei nustatyta);

— inkubavimo laikas ir sąlygos.

Bandymo rezultatai

— Neapdoroti kiekvienoje duobutėje esančio kontrolinio bandinio ir bandomųjų cheminių medžiagų duomenys: pasikartojantys rodikliai originalių duomenų, užfiksuotų prietaisu, kuriuo matuojama hormonų gamybos apimtis, forma (*pvz*., OD, fluorescenciniai vienetai, SSPM ir kt.);

— skirstinio normališkumo patvirtinimas arba duomenų transformacijos paaiškinimas;

— vidutinis atsakas ± 1 SN kiekvienoje duobutėje, kuri buvo vertinta;

— citotoksiškumo duomenys (bandomoji koncentracija, kuri sukėlė citotoksiškumą);

— patvirtinimas, kad KK reikalavimai įvykdyti;

▼M5

— santykinis pokytis, palyginti su KBT, pakoreguotas atsižvelgiant į citotoksiškumą;

— diagrama, kurioje pavaizduotas santykinis pokytis (pokytis kartais) esant kiekvienai koncentracijai, SN ir statistinio reikšmingumo lygiui, kaip nurodyta 49–54 punktuose.

Duomenų aiškinimas

— Vadovaudamiesi nustatyta tvarka, paaiškinkite rezultatus ir aptarkite nustatytus faktus.

Rezultatų aptarimas

— Ar atsižvelgiant į tyrimo duomenis, yra požymių, rodančių, kad netiesioginis poveikis gliukokortikoidų ir mineralkortikoidų reakcijų sekoms galėjo paveikti testosterono ir E2 duomenis?

Išvados

LITERATŪROS ŠALTINIAI

(1) OECD (2002) OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, šio priedo B.54 skyriaus 2 priedėlyje.

(2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 217, 114–124.

(3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidgenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res*., 14, 23 – 30.

(4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/-MONO(2010)31, Paris. Available at http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

(5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis,* OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. Available at: http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

(6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis, Available at: http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.br pdf]

(7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.,* 81, 78–89.

(8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 182, 44–54.

(9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.,* 118: 265–272.

▼**M5**

(10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.,* 17:1137–1148.

(11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.,* 50, 5488–5496.

(12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere,* 80:578–584.

(13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.,* 39:2777–2785.

(14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.,* 17:1137–1148.

(15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* 77, 731–737.

(16) Chapter B.55 of this Annex: Hershberger Bioassay in Rats: A short-term Screening Assay for (Anti)Androgenic Properties.

(17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.,* 2, 222–231.

(18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.,* 65, 55–63.

(19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, Biochemistry. 38:1598–1606.

(20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, J. Appl. Toxicol., 26:484–492.

▼M5

Priedėlis

SĄVOKOS

Užpildymas– ląstelių užimama ploto dalis arba leidžiama proliferacijos apimtis mitybos terpėje.

Cheminė medžiaga– medžiaga arba mišinys.

VK– variacijos koeficientas; tai – skirstinio standartinio nuokrypio ir jo aritmetinio vidurkio santykis.

CYP– (angl. *cytochrome P450*) citochromo P 450 monooksigenazės; tai – genų grupė ir dėl jų gaminami fermentai, kurie dalyvauja katalizuojant labai daug įvairių biocheminių reakcijų, įskaitant steroidinių hormonų sintezę ir metabolizmą.

SSPM– skilimų skaičius per minutę; tai – per minutę tam tikrame radioaktyviosios medžiagos kiekyje skilusių atomų skaičius.

E2– 17β-oestradiolis, svarbiausias estrogenas žinduolių sistemose.

H295R ląstelės– žmogaus antinksčių žievės karcinomos ląstelės, kurios turi pagal sritis nediferencijuotų žmogaus vaisiaus antinksčių ląstelių fiziologines savybes ir kurios ekspresuoja visus steroidogenezės reakcijų sekoje dalyvaujančius fermentus. Jų galima įsigyti iš ATCC.

Užšaldymo terpė– naudojama ląstelių užšaldymui ir užšaldytų ląstelių saugojimui. Tai – pradinė terpė, sumaišyta su priedu „BD Nu-serum“ ir dimetilsulfoksidu.

Tiesinės koreliacijos atkarpa– pagal hormonų matavimo sistemos duomenis sudarytos standartinės kreivės atkarpa, kurioje rezultatai proporcingi mėginyje esančios analitės koncentracijai.

LOQ – (angl. *Limit of Quantification*) kiekybinio nustatymo riba; tai – mažiausias cheminės medžiagos kiekis, kurį galima atskirti nuo nesamo cheminės medžiagos kiekio (tuščiosios vertės) neperžengiant nustatytos pasikliautinumo ribos. Šio metodo tikslais naudojamą LOQ, jeigu nenurodyta kitaip, paprastai nustato bandymo sistemų gamintojas.

LOEC – (angl. *Lowest Observed Effect Concentration*) mažiausia pastebėto poveikio koncentracija; tai – mažiausia koncentracija, kurią naudojant analizės metu pasireiškęs atsakas statistiškai skiriasi nuo nustatyto naudojant kontrolinį bandinį tirpiklį.

NOEC – (angl. *No Observed Effect Concentration*) nepastebėto poveikio koncentracija; tai – didžiausia išbandyta koncentracija, kuriai esant per analizę nenustatyta teigiamo atsako.

Pasažas – skaičius, reiškiantis, kiek kartų ląstelės pasidalijo nuo ląstelių išauginimo iš užšaldytos pradinės ląstelių kultūros. Pirminis iš užšaldytos pradinės ląstelių kultūros paimtos ląstelės pasažas žymimas vienetu (1). Vieną kartą pasidalijusios ląstelės ženklinamos kaip antro pasažo ląstelės ir t. t.

FBDT – *Dulbecco* fosfatinis buferinis druskų tirpalas.

Kokybės kontrolė – santrumpa KK;tai – priemonės, būtinos duomenų patikimumui užtikrinti.

Kokybės kontrolės plokštelė – 24 duobučių plokštelė, kurioje yra dviejų dydžių koncentracijos teigiamo ir neigiamo kontrolinių bandinių ir kuri naudojama naujos ląstelių grupės veiksmingumui stebėti arba kaip teigiama analizės kontrolė atliekant cheminių medžiagų bandymus.

Bandymo kartas – nepriklausomas eksperimentas, kurį atliekant naudojamas naujas tirpalų ir kontrolinių bandinių rinkinys.

▼**M5**

Pradinė terpė – pagrindas kitiems reagentams ruošti. Ji sudaryta iš modifikuotos terpės „Dulbecco's Modified Eagle's Medium“ (DMEM) ir maisto medžiagų mišinio „Ham's F-12“ (F12), santykiu 1:1 sumaišytų 15 mM buferinio tirpalo HEPES, be fenolio raudonojo ir natrio bikarbonato. Natrio bikarbonatas įmaišomas kaip buferinis tirpalas, žr. tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) II priedėlį.

Priedais papildyta terpė – tai pradinė terpė, sumaišyta su priedu „BD Nu-Serum“ ir mišiniu „ITS+ premium“, žr. tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) II priedėlį.

Steroidogenezė – sintezės reakcijų seka, kurios metu cholesterolis virsta įvairiais steroidiniais hormonais. Keli steroidų sintezės reakcijų sekos tarpiniai junginiai, kaip antai progesteronas ir testosteronas, ne tik patys yra svarbūs hormonai, bet ir atlieka tolesniame sintezės reakcijų sekos etape atlieka susidarančių hormonų pirmtakų funkciją.

Testosteronas – vienas iš dviejų svarbiausių androgenų žinduolių sistemose.

Bandomoji cheminė medžiaga – bet kuri medžiaga ar mišinys, bandomas taikant šį bandymų metodą.

Bandomoji plokštelė – plokštelė, kurioje H295R ląstelės veikiamos bandomosiomis cheminėmis medžiagomis. Bandomojoje plokštelėje yra kontrolinio bandinio tirpiklio ir bandomosios cheminės medžiagos; naudojamos septynių dydžių koncentracijos cheminės medžiagos ir kiekvienos koncentracijos medžiaga bandoma trijose duobutėse.

Tripsinas 1X – praskiestas fermento tripsino (kasos serino proteazės) tirpalas, naudojamas siekiant atskirti ląsteles nuo ląstelių auginimo plokštelės, žr. tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) III priedėlį.

▼M5

B.58. GRAUŽIKŲ SOMATINIŲ IR EMBRIONINIŲ LĄSTELIŲ TARPGENINIŲ MUTACIJŲ ANALIZĖ

ĮVADAS

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO Bandymų gaires (angl. OECD *Test Guideline* (TG)) Nr. 488 (2013). Pagal esamus ES bandymų metodus galima atlikti daug įvairios *in vitro* mutacijų analizės, padedančios aptikti chromosomų ir (arba) genų mutacijas. Turima bandymų metodų, skirtų *in vivo* vertinamosioms baigtims (t. y. chromosomų aberacijoms ir nenumatytai DNR sintezei) tirti; tačiau per tuos bandymus genų mutacijos nėra vertinamos.Transgeninių graužikų (angl. TGR) mutacijų analize patenkinamas poreikis turėti praktišką ir plačiai prieinamą metodą *in vivo* bandymų genų mutacijoms vertinti.

2. Transgeninių graužikų mutacijų analizė buvo nuodugniai išnagrinėta (24) (33). Šioje analizėje naudojamos transgeninės žiurkės ir pelės, kurių chromosomose yra daug integruotų plazmidžių arba fagų universalių vektorių kopijų. Transgeninės ląstelės turi reporterinių genų, pagal kuriuos aptinkamos bandomųjų cheminių medžiagų *in vivo* sukeltos įvairaus pobūdžio mutacijos.

3. Graužiko organizme vykstančios mutacijos skaičiuojamos išskiriant transgeną ir analizuojant reporterinio geno neturinčios bakterijos nešiotojos reporterinio geno fenotipą. Atliekant transgeninių graužikų genų mutacijų analizę įvertinamos praktiškai iš bet kurio graužikų organų audinio išskirtų genetiškai neutralių genų mutacijos. Todėl atliekant šią analizę išvengiama daugelio esamų apribojimų, susijusių su *in vivo* endogeninių genų mutacijų tyrimais (pvz., ne visi audiniai tinka analizei, neigiama/teigiama mutacijų atranka).

4. Iš įrodomosios vertės analizės matyti, kad transgenai reaguoja į mutagenus panašiai kaip endogeniniai genai, ypač tais atvejais, kai vertinamos bazių porų pakaitos, skaitymo rėmelio poslinkio mutacijos, nedidelės delecijos ir intarpai (24).

5. Per tarptautinius genotoksiškumo bandymų seminarus (angl. IWGT) patvirtinta, kad transgeninių graužikų genų mutacijų analizę galima taikyti *in vivo* genų mutacijoms nustatyti, ir rekomenduotas analizės įgyvendinimo protokolas (15) (29). Šis bandymų metodas parengtas pagal tas rekomendacijas. Išsamesnė analizė, kuria pagrindžiamas šio protokolo taikymas, pateikta (16).

6. Numatoma, kad ateityje transgeninių graužikų genų mutacijų analizę galbūt bus galima sujungti su kartotinių dozių toksiškumo tyrimu (šio priedo B.7 skyrius). Tačiau reikia surinkti duomenis, kuriais būtų patvirtinta, kad transgeninių graužikų genų mutacijų analizės jautrumas nepakis, jei laikotarpis nuo paskutinės dozės davimo iki mėginių paėmimo bus trumpesnis, t. y. viena diena, – toks laikotarpis yra taikomas per kartotinių dozių toksikologinį tyrimą, – o ne trys dienos, kaip atliekant transgeninių graužikų genų mutacijų analizę. Taip pat reikia surinkti duomenis, kuriais būtų parodyta, jog tai, kad naudojama transgeninė, o ne tradicinė graužikų veislė, neturės neigiamos įtakos kartotinių dozių analizei. Kai šie duomenys bus turimi, bandymų metodas bus atnaujintas.

7. Pagrindinių sąvokų apibrėžtys pateiktos priede.

▼**M5**

PRADINIAI ASPEKTAI

8. Transgeninių graužikų genų mutacijų analizė, kurios taikymui pagal šį bandymų metodą pagrįsti yra turima pakankamai duomenų, yra: bakteriofago su *lacZ* genu analizė naudojant peles (Muta™Mouse analizė); *lacZ* geno plazmidės analizė naudojant peles; *gpt* delta (*gpt* ir Spi⁻)analizė naudojant peles ir žiurkes; *lacI* geno analizė naudojant peles ir žiurkes (Big Blueä), kai šio įvairaus pobūdžio analizė atliekama standartinėmis sąlygomis. Be to, mutacijoms įvertinti pagal Big Blue® ir Muta™Mouse modelius galima taikyti *cII* teigiamos atrankos analizę. Pagal transgeninių graužikų modelius mutagenezė paprastai yra vertinama skaičiuojant mutacijų dažnį; tačiau jeigu reikia, iš molekulinės mutacijų analizės galima gauti papildomos informacijos (žr. 24 punktą).

9. Šie graužikų *in vivo* genų mutacijų bandymai ypač tinka mutageniniam pavojui vertinti, nes analizės rezultatai priklauso nuo *in vivo* metabolizmo, farmakokinetikos, DNR pažaidų reparacijos ir apeinančios pažaidas DNR sintezės, nors šie rezultatai gali skirtis dėl gyvūnų rūšies, audinio ir DNR pažaidos pobūdžio. Genų mutacijų *in vivo* analizė yra naudinga, kai norima išsamiau ištirti *in vitro* sistema nustatytą mutageninį poveikį ir papildyti bandymų, per kuriuos naudotos kitos *in vivo* vertinamosios baigtys, rezultatus (24). Genų mutacija yra ne tik priežastiniais ryšiais susijusi su vėžiniais susirgimais – ji yra svarbi vertinamoji baigtis prognozuojant mutacijų sukeliamas nevėžines somatinių audinių ligas (12) (13) ir per embrioninių ląstelių liniją perduodamas ligas.

10. Kai turima duomenų, kad bandomoji cheminė medžiaga arba atitinkamas metabolitas nepasieks nė vieno iš reikiamų audinių, transgeninių graužikų genų mutacijų analizę atlikti nėra tikslinga.

BANDYMŲ METODO PRINCIPAS

11. Atliekant 8 punkte aptartą analizę tiriamasis genas – pagal kilmę bakterinis arba bakteriofaginis – iš graužiko genomo DNR yra išgaunamas transgeną įterpus į λ bakteriofago arba plazmidės universalų vektorių. Per šią procedūrą iš reikiamo graužiko audinio genomo DNR išskiriama, paruošiama *in vitro* (t. y. liambda vektorių pakavimas, plazmidžių ligacija ir elektroporacija universaliam vektoriui išgauti), paskui nustatomos bakterijose nešiotojose tam tikromis sąlygomis vykstančios mutacijos. Analizei naudojami neutralūs transgenai, kuriuos lengva išskirti iš daugumos audinių.

12. Per pagrindinį transgeninių graužikų genų mutacijų bandymą graužikui tam tikrą laiką duodama cheminė medžiaga. Chemines medžiagas galima duoti bet kuriuo tam tinkamu būdu, taip pat ir implantuojant (pvz., kai bandyme naudojami medicininiai prietaisai). Visas laikotarpis, kuriuo gyvūnui duodamos dozės, vadinamas *medžiagos davimo laikotarpiu*. Pasibaigus medžiagos davimo laikotarpiui, iki gyvūnų numarinimo cheminė medžiaga paprastai nebeduodama, o neištaisytos DNR pažaidos fiksuojamos kaip stabilios mutacijos. Literatūros šaltiniuose šis laikotarpis vadinamas įvairiai: pasireiškimo, fiksavimo arba ekspresijos laikotarpiu; šio laikotarpio pabaiga yra *mėginių ėmimo laikas* (15) (29). Gyvūną numarinus genomo DNR yra izoliuojama iš reikiamo (-ų) audinio (-ių) ir išgryninama.

▼M5

13. Vieno gyvūno audinio duomenys, gauti iš kelių pakavimo/ligacijos operacijų, dažniausiai yra sumuojami, mutacijų dažnis paprastai įvertinamas imant 10^5–10^7 plokšteles arba kolonijas sudarančių vienetų. Kai taikomi teigiamos atrankos metodai, bendras plokšteles sudarančių vienetų skaičius yra nustatomas naudojant atskirą neselektyvių lėkštelių rinkinį.

14. Teigiami atrankos metodai buvo sukurti tam, kad būtų lengviau surasti *gpt* geno mutacijas *[gpt delt*a analizė naudojant peles ir žiurkes*, gpt*⁻ fenotipo analizė (20) (22) (28)] ir *lacZ* geno analizė [Muta™Mouse arba *lacZ* plazmidžių analizė naudojant peles (3) (10) (11) (30)]; *lacI* genų mutacijos Big Blue® gyvūnų organizmuose nustatomos naudojant neselektyvų metodą, kuriuo mutacijos nustatomos pagal spalvotų (mėlynų) plokštelių susidarymą. Yra ir teigiamos atrankos metodų, kuriuos galima taikyti λ bakteriofago universalaus vektoriaus *cII* geno taškinėms mutacijoms nustatyti [analizė, kai naudojamos Big Blue® pelės arba žiurkės, ir Muta™Mouse analizė (17)] ir λ *red* ir *gam* genų delecijos mutacijoms nustatyti [Spi ⁻ atrankos analizė naudojant *gpt* delta peles ir žiurkes (21) (22) (28)]. *Mutacijų dažnis* apskaičiuojamas plokštelių/plazmidžių, kuriose yra transgeno mutacijų, skaičių padalijus iš bendro plokštelių/plazmidžių, išskirtų iš to paties DNR mėginio, skaičiaus. TGR genų mutacijų tyrimuose mutacijų dažnis yra vienas iš ataskaitoje nurodomų parametrų. Be to, *mutacijų dažnis* gali būti apskaičiuojamas kaip ląstelių, nešančių *nepriklausomas* mutacijas, dalis; šio skaičiavimo rezultatus reikia koreguoti pagal kloninę ekspansiją, kuri įvertinama pagal išskirtų mutacijų seką (24).

15. Mutacijas, skaičiuojamas atliekant *lacI, lacZ, cII* ir *gpt* taškinių mutacijų analizę, pirmiausia sudaro bazių porų pakaitos, skaitymo rėmelio poslinkio mutacijos ir nedideli intarpai/delecijos. Santykinė šių tipų mutacijų dalis, palyginti su savaiminėmis mutacijomis, yra panaši į endogeninio *Hprt* geno. Didelių delecijų nustatoma tik atliekant Spi ⁻ atrankos ir *lacZ* plazmidžių analizę (24). Tiriamos mutacijos – pelėms arba žiurkėms *in vivo* pasireiškiančios mutacijos. *In vitro* ir *ex vivo* mutacijos, kurios gali kilti per fagų/-plazmidžių išgavos, sintezės arba pažaidų reparacinius procesus, yra santykinai retos ir kai kuriose sistemose gali būti specialiai pažymimos arba atmetamos taikant bakterijos nešiotojos/teigiamos atrankos sistemą.

METODO APRAŠYMAS

Paruošiamieji darbai

Gyvūnų rūšies parinkimas

16. Šiuo metu galima taikyti įvairius transgeninių pelių genų mutacijos nustatymo modelius, šios sistemos naudojamos plačiau negu transgeninių žiurkių modeliai. Jeigu žiurkių modelis yra akivaizdžiai tinkamesnis negu pelių (pvz., kai tiriamas tik žiurkėms nustatomų auglių karcinogenezės mechanizmas ir šis tyrimas derinamas su toksiškumo žiurkėms tyrimu arba jeigu yra žinoma, kad žiurkių metabolizmas geriau atspindi žmonių metabolizmą), reikėtų apsvarstyti galimybę naudoti transgeninių žiurkių modelius.

Laikymo ir šėrimo sąlygos

17. Bandomųjų gyvūnų patalpos temperatūra turi būti 22 °C (± 3 °C). Nors santykinė drėgmė turėtų būti mažiausiai 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikėtų siekti, kad santykinė oro drėgmė būtų 50–60 %. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis – pakaitomis 12 h šviesos ir 12 h tamsos per parą. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje

▼M5

naudojamas pašaras, o geriamojo vandens kiekis neribojamas. Jei bandomoji medžiaga duodama su pašarais, juos renkantis turi būti užtikrinama, kad bandomąją medžiagą būtų galima tinkamai su jais sumaišyti. Gyvūnai turėtų būti laikomi mažomis grupėmis (ne daugiau kaip po penkis) tos pačios lyties gyvūnus, jeigu nėra agresyvaus elgesio pavojaus. Moksliškai pagrįstais atvejais gyvūnus galima laikyti atskirai.

Gyvūnų paruošimas

18. Sveiki jauni lytiškai subrendę gyvūnai (kurių amžius pradedant duoti cheminę medžiagą yra 8–12 savaičių) atsitiktine tvarka suskirstomi į kontrolinę ir dozes gaunančią grupes. Kiekvienas gyvūnas paženklinamas unikalia žyma. Gyvūnams leidžiama aklimatizuotis prie laboratorinių sąlygų mažiausiai 5 dienas. Narveliai išdėstomi taip, kad būtų kiek įmanoma sumažintas bet koks galimas poveikis dėl narvelio vietos. Bandymo pradžioje gyvūnų svorio variacija turi būti kuo mažesnė; jų svoris turi būti ne didesnis kaip ± 20 % atitinkamos lyties gyvūnų vidutinio svorio.

Dozių ruošimas

19. Kietosios bandomosios cheminės medžiagos prieš duodant gyvūnams turėtų būti ištirpinamos atitinkamuose tirpikliuose ar nešikliuose arba turėtų būti paruošta jų suspensija, prireikus jos įmaišomos į pašarą arba geriamąjį vandenį. Skystos bandomosios cheminės medžiagos gali būti duodamos iš karto arba prieš tai praskiestos. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga duodama per kvėpavimo takus, ją galima duoti dujų, garų arba kieto/skysto aerozolio pavidalu atsižvelgiant į tai, kokios yra jos fizikinės ir cheminės savybės. Naudojami švieži bandomosios cheminės medžiagos preparatai, nebent duomenys apie medžiagos stabilumą rodo, kad ją galima laikyti.

Bandymo sąlygos

Tirpiklis/nešiklis

20. Naudojamos tirpiklio ar nešiklio dozės neturėtų kelti jokio toksinio poveikio ir neturėtų kilti spėlionių, kad jis gali chemiškai reaguoti su bandomąja chemine medžiaga. Jeigu naudojami kiti mažiau žinomi tirpikliai/nešikliai, prieš pradedant juos naudoti reikia pateikti jų tinkamumą įrodančius duomenis. Jeigu yra įmanoma, pirmiausia rekomenduojama naudoti vandeninį tirpiklį arba nešiklį.

Teigiamos kontrolės grupės

21. Paprastai reikėtų naudoti lygiagrečios teigiamos kontrolės grupių gyvūnus. Tačiau kiekviena laboratorija, kuri yra įrodžiusi savo kompetenciją (žr. 23 punktą) ir kuri šią analizę atlieka nuolat, metodo sėkmingumui patvirtinti gali į kiekvieną bandymą įtraukti ankstesnių bandymų teigiamos kontrolės gyvūnų DNR. Per ankstesnius bandymus paimtos DNR turėtų būti tų pačių rūšių gyvūnų ir audinių ir tinkamai laikomos (žr. 36 punktą). Kai naudojamos lygiagrečios teigiamos kontrolės grupės, dozes joms nėra būtina duoti tuo pačiu būdu, kokiu yra duodama bandomoji cheminė medžiaga; tačiau turėtų būti įrodyta, kad viename arba keliuose reikiamuose teigiamos kontrolės grupės gyvūnų audiniuose dėl bandomosios cheminės medžiagos vyksta mutacijos. Teigiamos kontrolės grupei duodamos cheminės medžiagos dozės turėtų būti pasirenkamos tokios, kad sukeltų silpną arba vidutinį poveikį, pagal kurį būtų galima kritiškai vertinti analizės rezultatyvumą ir jautrumą. Teigiamos kontrolės cheminių medžiagų pavyzdžiai ir kai kurie jų veikiami audiniai yra išvardyti 1 lentelėje.

▼M5

1 lentelė

Teigiamos kontrolės cheminių medžiagų pavyzdžiai ir kai kurie jų veikiami audiniai

Teigiamos kontrolės cheminė medžiaga ir CAS Nr.	Einecs pavadinimas ir Einecs Nr.	Apibūdinimas	Mutacijos tikslinis organas	
			Žiurkių	Pelių
N-etil-N-nitrozošlapalas [CAS Nr. 759–73–9]	N-etil-N-nitrošlapalas [212–072–2]	Tiesiogiai veikiantis mutagenas	Kepenys, plaučiai	Kaulų čiulpai, gaubtinė žarna, gaubtinės žarnos epitelis, plonoji žarna, kepenys, plaučiai, blužnis, inkstai, kiaušidžių granuliozinės ląstelės, patinėlių embrioninės ląstelės
Etilkarbamatas (uretanas) [CAS Nr. 51–79–6]	Uretanas [200–123–1]	Mutagenas, reikalingas metabolizmas, bet pasireiškia tik silpnas poveikis		Kaulų čiulpai, prieskrandis, plonoji žarna, kepenys, plaučiai, blužnis
2,4-Diaminotoluenas [CAS Nr. 95–80–7]	4-metil-m-fenilenediaminas [202–453–1]	Mutagenas, reikalingas metabolizmas, teigiamas atliekant Spi^- analizę	Kepenys	Kepenys
Benzo[a]pirenas [CAS Nr. 50–32–8]	Benzo[def]chrizenas [200–028–5]	Mutagenas, reikalingas metabolizmas	Kepenys, taukinė	Kaulų čiulpai, krūtys, gaubtinė žarna, prieskrandis, liaukinė skrandžio dalis, širdis, kepenys, plaučiai, patinėlių embrioninės ląstelės

Neigiamos kontrolės grupės

22. Kiekvieną kartą į imamus mėginius reikėtų įtraukti neigiamos kontrolės grupių, kurioms buvo duodamas tik tirpiklis arba tik nešiklis ir kurios visais kitais aspektais buvo laikomos tomis pačiomis sąlygomis kaip dozes gavusios grupės, mėginius. Jeigu neturima anksčiau surinktų arba nėra anksčiau paskelbtų kontrolinių duomenų, iš kurių būtų matyti, kad pasirinktas tirpiklis/nešiklis nesukelia delecijų arba nedaro mutageninio poveikio, kiekvieną kartą į imamus mėginius reikėtų įtraukti ir kontrolinių grupių, kurioms medžiagos neduota, mėginius, taip siekiant nustatyti, ar nešiklio kontrolinės grupės mėginiai yra tinkami.

Laboratorijos kompetencijos patikrinimas

23. Kompetenciją atlikti šią analizę reikėtų patikrinti įrodant, kad pagal paskelbtus duomenis gebama atkartoti šiuos numatytus rezultatus (24): 1) mutacijų dažnio naudojant teigiamas kontrolines chemines medžiagas (įskaitant silpną atsaką), pavyzdžiui, išvardytas 1 lentelėje, nemutagenus ir kontrolinius nešiklius; ir 2) transgenų išgavos iš genomo DNR (pvz., pakavimo efektyvumo).

Mutacijų sekos nustatymas

24. Reguliavimo tikslais nereikalaujama nustatyti mutacijų DNR sekos, ypač kai gaunami aiškūs teigiami arba neigiami rezultatai. Tačiau nustatytos sekos duomenys gali būti naudingi, kai pastebima atskirų atvejų skirtumų. Tuomet seka gali būti nustatoma tam, kad būtų galima atmesti mutacijų banko (angl. *jackpot*) arba klonavimosi tikimybę, – nustatoma unikalių mutacijų konkrečiame audinyje dalis. Norint nustatyti, ar kloninės mutacijos

▼M5

prisidėjo prie mutacijų dažnio, dažniausiai pakanka nustatyti maždaug 10 mutacijų viename vieno gyvūnų audinyje seką; norint matematiškai pakoreguoti mutacijų dažnį, atsižvelgiant į kloniškumą gali prireikti nustatyti bent 25 mutacijų sekas. Galimybė nustatyti mutacijų seką svarstytina ir tada, kai pastebimas šioks toks mutacijų dažnio padidėjimas (t. y. nedaug viršijantis kontrolinių grupių, kurioms medžiagos neduodama, vertes). Mutacijų spektro skirtumai tarp mutuojančių kolonijų palyginus gyvūnus, kuriems medžiagos duodama, ir gyvūnus, kuriems medžiagos neduodama, gali padėti patvirtinti mutageninį poveikį (29). Mutacijų spektras taip pat gali būti naudingas plėtojant mechanistines hipotezes. Jeigu sekos nustatymą ketinama įtraukti į tyrimo protokolą, reikėtų ypač atkreipti dėmesį į tokių tyrimų struktūrą, ypač į vieno mėginio mutacijų sekų skaičių, tam, kad pagal taikomą statistinį modelį būtų užtikrinta pakankama statistinė galia (žr. 43 punktą).

BANDYMO PROCEDŪRA

Gyvūnų skaičius ir lytis

25. Gyvūnų skaičius vienoje grupėje nustatomas iš anksto ir turėtų būti toks, kad gyvūnų pakaktų statistinei galiai užtikrinti ir kad būtų galima nustatyti bent mutacijų dažnio dvigubėjimą. Grupę turi sudaryti ne mažiau kaip penki gyvūnai; tačiau jeigu statistinė galia nepakankama, gyvūnų skaičių reikėtų didinti tiek, kiek reikia. Paprastai naudojami patinėliai. Tam tikrais atvejais būna pagrindo bandymus daryti tik su patelėmis; pavyzdžiui, kai bandomi konkrečiai moterims skirti vaistai arba kai tiriamas moterims būdingas metabolizmas. Jeigu tarp lyčių yra didelių toksiškumo arba metabolizmo skirtumų, reikia naudoti ir patinėlius, ir pateles.

Dozių davimo laikotarpis

26. Kadangi pastebėta, jog mutacijos didėja su kiekviena doze, dozes reikia kartoti, duoti kasdien 28 dienas. Paprastai manoma, kad toks laikotarpis yra pakankamas ir tam, kad silpni mutagenai sukeltų pakankamai mutacijų, ir tam, kad veikimo laiko pakaktų nustatyti mutacijoms organuose, kurių ląstelės lėtai proliferuoja. Kai kuriems vertinimams atlikti gali būti tikslinga taikyti kitokį dozavimo režimą; alternatyvūs dozavimo režimai turėtų būti moksliškai pagrįsti protokole. Dozės neturėtų būti duodamos trumpiau, negu reikia visiems atitinkamiems metabolizuojantiems fermentams iki galo sužadinti; jeigu dozės duodamos trumpiau, gali tekti paskirti kelis mėginių surinkimo laiko momentus, tinkamus organams, kurių ląstelių proliferacijos tempas yra skirtingas. Bet kuriuo atveju protokolui pagrįsti reikėtų remtis visa turima informacija (pvz., apie bendrąjį toksiškumą arba metabolizmą, farmakokinetiką), ypač tada, kai nukrypstama nuo pirmiau išdėstytų standartinių rekomendacijų. Nors esant ilgesniam negu 8 savaičių dozių davimo laikotarpiui ir būtų lengiau pasiekti didesnį jautrumą, tai reikėtų tiksliai paaiškinti ir pagrįsti, nes dozes duodant ilgiau, mutacijų dažnumas gali akivaizdžiai padidėti dėl kloninės ekspansijos (29).

Dozės dydžiai

27. Dozių dydis turėtų būti pagrįstas dozės dydžio intervalo nustatymo tyrimo, kuriuo vertintas bendrasis toksiškumas ir per kurį buvo taikytas tas pats medžiagos davimo būdas, rezultatais arba ankstesniais poūmio toksiškumo bandymų rezultatais. Tos pačios graužikų veislės netransgeniniai gyvūnai gali būti naudojami dozės dydžio intervalui nustatyti. Atliekant pagrindinį bandymą ir norint surinkti informaciją apie atsaką į dozes, iš viso per tyrimą reikėtų naudoti neigiamos kontrolės grupę (žr. 22 punktą), ne mažiau kaip trijų dydžių, kurie skiriasi tinkamais intervalais, dozes, išskyrus tuos atvejus, kai naudojama ribinė dozė (žr. 28 punktą). Didžiausia dozė turėtų būti maksimali toleruojama dozė (MTD). MTD laikoma dozė, kuri sukelia tokius toksiškumo požymius, kad pagal tą pačią seką duodama didesnė

▼M5

dozė būtų mirtina. Cheminėms medžiagoms, pasižyminčioms specifiniu biologiniu aktyvumu, kai jų dozės būna mažos ir netoksiškos (pavyzdžiui, hormonams ir mitogenams), ir cheminėms medžiagoms, kurioms būdinga toksikokinetinių savybių saturacija, gali būti taikoma dozės dydžio nustatymo kriterijų išimtis; šias chemines medžiagas reikėtų vertinti kiekvienu atveju atskirai. Naudojamų dozių dydis turėtų apimti intervalą nuo maksimalios dozės iki tokios, kuri yra labai mažai toksiška arba visai netoksiška.

Ribinis bandymas

28. Jeigu iš duomenų, gautų per dozės dydžio intervalo nustatymo bandymus arba bandymus su giminingomis graužikų veislėmis, matyti, kad tais atvejais, kai duodama dozė yra ne mažesnė už ribinę (žr. toliau), jokio pastebimo toksinio poveikio nebūna, ir, remiantis struktūriškai panašių cheminių medžiagų bandymų duomenimis, manoma, kad medžiaga neturėtų būti genotoksiška, išsamus bandymas su trijų dydžių dozėmis gali būti nebūtinas. Kai dozių davimo laikotarpis yra 28 dienas (t. y. dozės duodamos kasdien 28 dienas), ribinė dozė yra 1 000 mg/kg kūno masės per dieną. Jeigu dozė duodama 14 dienų arba trumpiau, ribinė dozė yra 2 000 mg/kg kūno masės per dieną (jeigu dozių davimo grafikas yra kitoks, dozės duodamos ne 28 dienas kasdien, tai protokole reikėtų moksliškai pagrįsti, žr. 26 punktą).

Dozių davimas

29. Bandomoji cheminė medžiaga paprastai būna duodama per zondą, naudojant skrandžio zondą arba tinkamą intubacinį vamzdelį. Apskritai rengiantis atlikti analizę reikėtų atsižvelgti į numatomą žmogaus sąlyčio su medžiaga būdą. Todėl kitus sąlyčio su medžiaga būdus (su geriamuoju vandeniu, poodinėmis, intraveninėmis injekcijomis, uždėjus ant odos, per kvėpavimo takus, lašinant į trachėją, su pašaru, implantuojant) galima taikyti, kai juos galima pagrįsti. Injekcijos į pilvą nerekomenduojamos, nes fiziologiškai šis būdas nėra artimas žmogaus sąveikos su medžiaga būdui. Maksimalus skysčio, kurį galima duoti per zondą arba sušvirkšti per vieną kartą, tūris priklauso nuo bandomojo gyvūno dydžio. Šis tūris neturėtų būti didesnis kaip 2 ml/100g kūno masės. Didesnio nei šis tūrio naudojimą reikėtų pagrįsti. Išskyrus dirginančias ar ėsdinančias medžiagas, kurių didesnės koncentracijos paprastai sukelia sunkesnį poveikį, bandomojo tūrio svyravimai turi būti kuo mažesni: koncentracija pakoreguojama taip, kad visų dozių tūris būtų toks pats.

Mėginių ėmimo laikas

Somatinės ląstelės

30. Mėginių ėmimo laikas yra svarbus veiksnys, nes jį nulemia mutacijoms pasireikšti reikalingas laikotarpis. Šis laikotarpis priklauso nuo audinio ir yra susijęs su ląstelių populiacijos dalijimosi ciklo trukme: kaulų čiulpų ir plonosios žarnos atsakas būna greitas, kepenų – lėtesnis. Tinkamas kompromisas mutacijų dažniui matuoti ir tuose audiniuose, kurių ląstelių proliferacija yra sparti, ir tuose, kurių ląstelių proliferacija yra lėta, – dozes duoti 28 dienas iš eilės (kaip nurodyta 26 punkte), o mėginius imti praėjus trims dienoms po paskutinės dozės davimo; vis dėlto audiniuose, kurių ląstelių proliferacija yra lėta, didžiausias mutacijų dažnis šiomis sąlygomis dar gali būti nepasiektas. Jeigu audiniai, kurių ląstelių proliferacija yra lėta, yra ypač svarbūs, tada mėginius gali būti tikslinga paimti vėliau, po 28 dienų nuo 28 dienų dozių davimo laikotarpio pabaigos (16) (29). Tokiais atvejais mėginiai imami vėliau, ne po 3 dienų; tai reikėtų moksliškai pagrįsti.

▼M5

Embrioninės ląstelės

31. Transgeninių graužikų analizė labai tinka patinėlių embrioninėse ląstelėse (7) (8) (27) sukeltoms genų mutacijoms tirti, nes spermatogenezės laikas ir kinetika yra tiksliai apibrėžta (27). Kadangi kiaušinėlių, kuriuos būtų galima analizuoti, skaičius būna nedidelis, net ir įvykus superovuliacijai, ir kadangi oocituose DNR sintezė nevyksta, mutacijų patelių embrioninėse ląstelėse transgenine analize nustatyti negalima (31).

32. Patinėlių embrioninių ląstelių mėginių paėmimo laiką reikėtų pasirinkti taip, kad į mėginį patektų įvairios įvairiais vystymosi etapais paveiktos embrioninės ląstelės ir kad tuo etapu, kada imamas mėginys, embrioninės ląstelės būtų pakankamai paveiktos. Pelių embrioninių ląstelių vystymosi nuo spermatogoninių kamieninių ląstelių iki subrendusių spermatozoidų, kurie pasiekia sėklinį lataką/antsėklidžio uodegą, laikotarpis trunka apie 49 dienas (36), žiurkių – apie 70 dienų (34) (35). Jeigu dozės duodamos 28 dienas, o paskui po trijų dienų paimami mėginiai, mėginių, paimtų iš sėkliniame latake/antsėklidžio uodegoje susikaupusios spermos (7) (8), ląstelės bus buvusios veikiamos apytiksliai vėlesniuoju spermatogenezės laikotarpiu, kuris apima mejozinį ir pomejozinį etapus, bet neapima spermatogonijų arba kamieninių ląstelių etapo. Norint tinkamai paimti ląstelių, kurios sąlyčio su medžiaga laikotarpiu buvo spermotogininės kamieninės ląstelės, mėginius iš sėklinio latako/antsėklidžio uodegos, reikia mėginius imti vėliau, praėjus ne mažiau kaip 7 savaitėms (kai naudojamos pelės) arba 10 savaičių (kai naudojamos žiurkės) nuo dozių davimo laikotarpio pabaigos.

33. Ląsteles, paimtas iš sėklinių kanalėlių laikantis 28 + 3 dienų režimo, sudaro mišri populiacija, atspindinti visus embrioninių ląstelių vystymosi etapus (7) (8). Vertinant genų mutacijoms nustatyti paimtus šių ląstelių mėginius gauti duomenys apie etapus, kuriais sukeliamos embrioninių ląstelių mutacijos, bus ne tokie tikslūs kaip tuo atveju, kai spermatozoidų mėginiai paimami iš sėklinio latako/antsėklidžio uodegos (nes iš kanalėlių paimtuose mėginiuose yra įvairaus pobūdžio embrioninių ląstelių, į šią ląstelių populiaciją patenka kai kurios somatinės ląstelės). Tačiau jeigu ląstelių mėginiai paimami ne tik iš sėkliniame kanale/antsėklidžio uodegoje esančių spermatozoidų, bet ir iš sėklinių latakėlių, laikantis tik 28 + 3 dienų mėginių ėmimo režimo, yra paimama ląstelių, kurios buvo veikiamos visais pagrindiniais embrioninės ląstelės vystymosi etapais, ir tokie mėginiai gali būti naudingi kai kuriems embrioninių ląstelių mutagenams nustatyti.

Stebėjimai

34. Bendrus klinikinius stebėjimus reikia atlikti mažiausiai kartą per dieną, geriausiai tuo pačiu dienos metu, atsižvelgiant į numatomų poveikių piką. Gyvūnų sveikatos būklę reikia registruoti. Mažiausiai du kartus per dieną visi gyvūnai turėtų būti patikrinami – ar negaišta, ar nenugaišę. Visi gyvūnai turėtų būti sveriami bent kartą per savaitę ir numarinant. Suvartojamo pašaro kiekis turi būti matuojamas bent kas savaitę. Jeigu bandomoji medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu, suvartoto vandens kiekį reikėtų išmatuoti kaskart, kai vanduo keičiamas, ir bent kartą per savaitę. Gyvūnus, kuriems pasireiškia nemirtini pernelyg didelio toksiškumo požymiai, reikėtų numarinti iki bandymo pabaigos (23).

▼M5

Audinių surinkimas

35. Audinių surinkimą reikėtų aiškiai apibrėžti. Kadangi galima tirti praktiškai bet kuriame audinyje sukeltas mutacijas, audinius, kurie bus surenkami, reikėtų pasirinkti remiantis tyrimo paskirtimi ir visais turimais tiriamos cheminės medžiagos mutageniškumo, karcinogeniškumo arba toksiškumo duomenimis. Svarbūs veiksniai, į kuriuos reikėtų atsižvelgti, – tai davimo būdas (pagal tai, koks (-ie) yra tikėtinas (-i) žmogaus sąlyčio su medžiaga būdas (-ai)), numatomas pasiskirstymas audinyje, galimas veikimo mechanizmas. Jeigu bendros informacijos nėra, reikėtų surinkti kelis galinčius būti svarbius somatinius audinius. Tarp jų turėtų būti greitos ląstelių proliferacijos, lėtos ląstelių proliferacijos audiniai ir audiniai iš sąlyčio vietos. Taip pat reikėtų paimti spermatozoidų iš sėklinio latako/antsėklidžio uodegos, besivystančių embrioninių ląstelių iš sėklinių kanalėlių (kaip paaiškinta 32 ir 33 punktuose) ir saugoti tam atvejui, jeigu ateityje prireiktų atlikti embrioninių ląstelių mutageniškumo analizę. Organus reikėtų pasverti; jei organai didesni, iš visų gyvūnų reikėtų surinkti vienodą jų plotą.

Audinių ir DNR saugojimas

36. Audinius (arba audinių homogenatus) reikėtų saugoti – 70 °C arba žemesnėje temperatūroje ir panaudoti DNR izoliavimui per 5 metus. Izoliuotą DNR, kuri saugoma sušaldyta 4 °C atitinkamoje buferinėje medžiagoje, mutacijų analizei geriausia panaudoti per vienus metus.

Audinių atranka mutacijų analizei atlikti

37. Audinius reikėtų pasirinkti pagal šiuos kriterijus: 1) tai, kaip dozės duodamos arba kurioje vietoje įvyksta pirmasis sąlytis (pvz., liaukinė skrandžio dalis, jeigu dozės duodamos per virškinamąjį traktą, plaučiai, jeigu dozės duodamos per kvėpavimo takus, arba oda, jeigu dozės dedamos ant kurios nors odos vietos); 2) bendrojo toksiškumo tyrimuose pastebimus farmakokinetinius parametrus, iš kurių matyti, kaip medžiaga pasiskirsto, išlieka arba kaupiasi audiniuose arba kuriuos audinius veikia toksiškai. Jeigu tyrimai atliekami karcinogeniškumo tyrimams papildyti, reikėtų atkreipti dėmesį į audinius, kuriems daromas karcinogeninis poveikis. Audinius analizei reikėtų pasirinkti taip, kad būtų galima kuo tiksliau aptikti chemines medžiagas, kurios tiesiogiai veikia kaip *in vitro* mutagenai, yra greitai metabolizuojamos, labai reaktyvios arba sunkiai absorbuojamos, arba chemines medžiagas, kurias duodant tikslinis audinys nustatomas pagal jos davimo būdą (6).

38. Jeigu anksčiau surinktos informacijos neturima, tada, atsižvelgiant į sąlyčio vietą pagal dozių davimo būdą, mutageniškumą reikėtų įvertinti bent kepenims ir bent vienam audiniui, kurio ląstelės sparčiai dalijasi (pvz., liaukinę skrandžio dalį, kaulų čiulpus). Dauguma atvejų pirmiau išdėstytus reikalavimus galima įvykdyti analizuojant du kruopščiai atrinktus audinius, bet kai kuriais atvejais reikės analizuoti tris arba daugiau audinių. Jeigu yra pagrindo nerimauti konkrečiai dėl poveikio embrioninėms ląstelėms, taip pat ir dėl teigiamo somatinių ląstelių atsako, reikėtų įvertinti, ar embrioninių ląstelių audiniuose nevyksta mutacijų.

Matavimo metodai

39. Standartinius laboratorinius arba paskelbtus mutacijų nustatymo metodus galima taikyti, kai vykdoma šių modelių transgeninė analizė: *lacZ* lambda bakteriofagų ir plazmidžių (30); *lacI* pelių (2) (18); *gpt* delta pelių (22); *gpt* delta žiurkių (28); *cII* (17). Pakeitimus reikėtų pagrįsti ir tinkamai aprašyti. Kelių pakavimų duomenis galima sumuoti ir panaudoti reikiamam plokštelių arba kolonijų skaičiui gauti. Tačiau tai, kad reikia didesnio pakavimo reakcijų skaičiaus, kad būtų gautas reikiamas plokštelių skaičius, gali būtų netinkamos DNR kokybės požymis. Tokiais atvejais duomenis reikėtų vertinti atsargiai, nes jie gali būti nepatikimi. Optimalus plokštelių arba kolonijų skaičius viename DNR mėginyje priklauso nuo statistinės pakankamo mutacijų skaičiaus aptikimo tikimybės esant pasirinktam savaiminių

▼M5

mutacijų dažniui. Bendrais atvejais, kai savaiminių mutacijų dažnis yra apie 3×10^{-5}, reikia ne mažiau kaip 125 000–300 000 plokštelių (15). Kai atliekama Big Blue® *lacI* analizė, svarbu parodyti, kad, lygiagrečiai į kiekvieną lėkštelę įterpus atitinkamas spalvų kontrolines priemones, galima nustatyti visų fenotipų spalvų mutacijas. Audinius ir iš jų paimtus mėginius (duomenis) reikėtų apdoroti ir analizuoti bloko principu, pagal kurį nešiklio/kontrolinės grupės, teigiamos kontrolės grupės (jei ji naudojama) arba teigiamos kontrolės DNR (jei naudojama) ir kiekvienos bandomosios grupės duomenys būtų apdorojami kartu.

DUOMENYS IR ATASKAITA

Rezultatų apdorojimas

40. Kiekvieno gyvūno bandymų rezultatai turėtų būti pateikiami lentelėse. Gyvūnas yra eksperimentinis vienetas. Ataskaitoje reikėtų nurodyti bendrą ląstelių plokšteles sudarančių vienetų (angl. pfu) arba kolonijas sudarančių vienetų (angl. cfu) skaičių, mutacijų skaičių, kiekvieno gyvūno kiekvieno audinio mutacijų dažnį. Jeigu vyksta kelios pakavimo/išlaisvinimo reakcijos, reikėtų nurodyti vienam DNR mėginiui tenkančių reakcijų skaičių. Reikėtų saugoti kiekvienos reakcijos duomenis, bet ataskaitoje nurodyti tik bendrą pfu arba cfu skaičių. Reikėtų nurodyti 34 punkte paaiškintus toksiškumo duomenis ir klinikinius požymius. Reikėtų nurodyti kiekvienos analizuotos mutacijos sekos nustatymo rezultatus, apskaičiuotą kiekvieno gyvūno ir audinio mutacijų dažnį.

Statistinis rezultatų įvertinimas ir aiškinimas

41. Teigiamą rezultatą galima nustatyti pagal keletą kriterijų, pavyzdžiui, nuo dozės dydžio priklausomų mutacijų dažnio padidėjimą arba akivaizdų mutacijų dažnio padidėjimą, gyvūnams gavus pavienę dozę ir paėmus vieną mėginį, palyginti su tirpiklio/nešiklio kontroline grupe. Norint gauti pakankamai duomenų dozės ir atsako tarpusavio ryšiui įvertinti, reikėtų analizuoti bent tris bandomąsias dozės grupes. Nors pirmiausia reikia siekti, kad rezultatai būtų biologiškai aktualūs, bandymo rezultatams įvertinti kaip pagalbinę priemonę galima taikyti atitinkamus statistinius metodus (4) (14) (15) (25) (26). Pagal taikomus statistinius testus eksperimentiniu vienetu turėtų būti laikomas gyvūnas.

42. Jei tiriant bandomąją cheminę medžiagą gaunami rezultatai, neatitinkantys pirmiau paminėtų kurio nors audinio kriterijų, medžiaga pagal šią analizę laikoma nemutageniška. Kad neigiamas rezultatas būtų biologiškai priimtinas, audinio sąlytį su medžiaga reikėtų patvirtinti.

43. DNR sekai analizuoti galima taikyti įvairius rezultatus aiškinti padedančius statistinius metodus (1) (5) (9) (19).

44. Patikrinus duomenis apie tai, ar stebimos vertės patenka į anksčiau nustatytą kontrolinį intervalą, galima gauti papildomos informacijos atsako biologiniam reikšmingumui įvertinti (32).

▼M5

Bandymo ataskaita

45. Bandymo ataskaitoje turėtų būti ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— tapatumo duomenys ir CAS Nr., jei žinomas;

— šaltinis, partijos numeris, jei yra;

— fizikinė būsena ir grynumas;

— atliekamam bandymui svarbios fizikinės ir cheminės savybės;

— bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, jei žinomas.

Tirpiklis/nešiklis:

— priežastys, dėl kurių buvo pasirinktas šis nešiklis;

— bandomosios cheminės medžiagos, esančios tirpiklyje/nešiklyje, tirpumas ir stabilumas, jei yra žinomas;

— preparatų su pašarais, geriamuoju vandeniu arba inhaliacinių preparatų ruošimas;

— analitiniai preparatų determinantai (pvz., stabilumas, vienalytiškumas, nominalioji koncentracija).

Bandomieji gyvūnai:

— rūšis/veislė ir jų pasirinkimo pagrindimas;

— gyvūnų skaičius, amžius ir lytis;

— šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir kt.;

— kiekvieno gyvūno svoris prieš pradedant bandymą ir kiekvienos grupės svorio intervalas, vidurkiai bei standartinis nuokrypis.

Bandymo sąlygos:

— teigiamos ir neigiamos (tirpiklis/nešiklis) kontrolės duomenys;

— dozės dydžio intervalo nustatymo bandymo duomenys;

— pagrindinė priežastis, nulėmusi dozės dydžio pasirinkimą;

— duomenys apie bandomosios medžiagos paruošimą;

— išsamūs duomenys apie bandomosios cheminės medžiagos davimo būdą;

— pagrindinė priežastis, nulėmusi davimo būdo pasirinkimą;

— toksiškumo gyvūnams matavimo metodai, įskaitant, jei galima, histopatologinę arba hematologinę analizę, tai, kaip dažnai gyvūnai buvo stebimi ir buvo matuojama jų kūno masė;

— metodai, kuriais patvirtinama, kad bandomoji cheminė medžiaga pateko į veikiamą organą arba bendrąją apytaką, jei gauti neigiami rezultatai;

▼M5

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos pašaruose ir (arba) geriamajame vandenyje (ppm) perskaičiavimas į tikrąją dozę (mg/kg kūno masės per parą) ir suvartojimas, jei tinka;

— išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę;

— išsamus veikimo bandomąja medžiaga ir mėginio paėmimo tvarkaraščio aprašymas, pasirinkimo pagrindimas;

— eutanazijos metodas;

— audinių izoliavimo ir konservavimo procedūros;

— graužikų genomo DNR izoliavimo, transgenų išlaisvinimo iš genomo DNR, transgeninės DNR perkėlimo į bakterijas nešiotojas metodai;

— visų ląstelių, priemonių rinkinių ir reagentų (jei naudojami) šaltinis, partijos numeris;

— mutacijų skaičiavimo metodai;

— mutacijų molekulinės analizės metodai ir jų naudojimas mutacijų dažniui tikslinti pagal kloniškumą ir (arba) mutacijų dažniui skaičiuoti, jei reikia.

Rezultatai:

— gyvūno būklė iki bandymo ir per bandymą, įskaitant toksiškumo požymius;

— kūno ir organo masė numarinimo metu;

— apie kiekvieną audinį/gyvūną: mutacijų skaičius, vertintų plokštelių arba kolonijų skaičius, mutacijų dažnis;

— apie kiekvieną audinį/gyvūnų grupę: vienam DNR mėginiui tenkančių pakavimo reakcijų skaičius, bendras mutacijų skaičius, vidutinis mutacijų dažnis, standartinis nuokrypis;

— dozės ir atsako tarpusavio ryšys (jei įmanoma nurodyti);

— apie kiekvieną audinį/gyvūną: nepriklausomų mutacijų skaičius, vidutinis mutacijų dažnis, jeigu molekulinė mutacijų analizė buvo atlikta;

— lygiagrečios kontrolės ir ankstesni kontroliniai duomenys, nurodant intervalus, vidurkius ir standartinius nuokrypius;

— lygiagrečios teigiamos kontrolės (arba nelygiagrečios DNR teigiamos kontrolės) duomenys;

— analitiniai determinantai, jei yra (pvz., DNR koncentracija, naudota pakavimui, DNR sekos nustatymo duomenys);

— statistinės analizės ir metodai, jei taikyta.

Rezultatų aptarimas

Išvada

▼M5

LITERATŪROS ŠALTINIAI

(1) *Adams,* W.T. and T.R. *Skopek* (1987), 'Statistical *Test* for the Comparison of Samples from Mutational Spectra', *J. Mol. Biol*., 194: 391–396.

(2) Bielas, J.H. (2002), 'A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement', *Mutation Res*., 518: 107–112.

(3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), 'Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo M*utations'- *Nature*, 377(6550): 657–659

(4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), 'Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246–255.

(5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), 'Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency', *Environ. Mol. Mutagen,* 28: 405–413.

(6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), 'Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens', *Mutagenesis*, 14(1): 141–151.

(7) Douglas, G.R.,J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper(1995), 'Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7485–7489.

(8) Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), 'Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells', *Mutation Res*., 388(2–3): 197–212.

(9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), 'Bayesian Analysis of Mutational Spectra', *Genetics*, 156: 1411–1418.

(10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg(1989), 'Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo', Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(20): 7971–7975.

(11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), 'A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli H*ost', *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.

(12) Erikson, R.P. (2003), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer', *Mutation Res*., 543: 125–136.

(13) Erikson, R.P. (2010), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update', *Mutation Res.*, **705: 96–106**.

(14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), 'Statistical Analysis of *lacZ* Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays', *Mutagenesis*, 13(3): 249–255.

(15) Heddle, J.A.,S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen*., 35: 253–259.

(16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), 'Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1–6.

▼**M5**

(17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), 'Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo M*utations in a Bacteriophage λ Transgene Target', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17): 9073–9078.

(18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), 'The Use of Transgenic Mice for Short-term, in vivo Mutagenicity Testing', Genet. Anal. Tech. Appl., 7(8): 212–218.

(19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), 'Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis', Carcinogenesis, 29(4): 772–778.

(20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), 'A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi – and 6-thioguanine Selections', Environ. Mol. Mutagen., 28(4): 465–470.

(21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), 'Spi $^-$ Selection: an Efficient Method to Detect γ-ray-induced Deletions in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen*., 34(1): 9–15.

(22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), 'Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays', *Mutation Res.*, 455(1–2): 191–215.

(23) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in SAFEty Evaluation, Series on Testing and Assessment, N^{o}19, ENV/JM/-MONO(2000)7, OECD, Paris.

(24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N^o 103, ENV/JM/-MONO(2009)7, OECD, Paris.

(25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), 'Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay', Environ. Mol. Mutagen., 25(3): 231–245.

(26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks,.G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), 'Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study', Mutation. Res., 388(2–3): 249–289.

(27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk(2006), 'Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays', Mutation. Res., 598: 164–193.

(28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), 'Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers', Toxicol. Sci., 114(1): 71–78.

(29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), '*In vivo* Transgenic Mutation Assays', *Mutation Res*., 540: 141–151.

(30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), 'Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ T*ransgenic Mice for studying Mutations *in vivo*' in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II,* Plenum Press, New York, NY, USA, pp. 391–410.

▼**M5**

(31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), 'A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells', *Mutation Res*., 578(1–2): 117–123.

(32) *Hayashi*, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), 'Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data', Mutation Res., doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.

(33) OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, N° 145, ENV/JM/-MONO(2011)20, OECD, Paris.

(34) Clermont, Y. (1972), 'Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal'. Physiol. Rev. 52: 198–236.

(35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), 'The Epididymis', in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M, Wassarman (eds.), Physiology of Reproduction, Elsevier, the Netherlands, pp. 1071–1148.

(36) Russell, L.B. (2004), 'Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse', Genetica, 122: 25–36.

▼M5

Priedėlis

APIBRĖŽTYS

Dozių davimo laikotarpis: visas laikotarpis, kuriuo gyvūnui duodamos dozės.

Bazių poros pakaita: mutacijos pobūdis, kai viena DNR nukleotido bazė pakeičiama kita DNR nukleotido baze.

Kapsidė: viruso dalelę gaubiantis baltyminis apvalkalėlis.

Cheminė medžiaga: medžiaga arba mišinys.

Kloninė ekspansija: didelio skaičiaus ląstelių pasigaminimas iš vienos (mutavusios) ląstelės.

Kolonijas sudarantis vienetas (angl. cfu): gyvybingų bakterijų skaičiaus matas.

Konkatemeras: ilga ištisinė biomolekulė, susidedanti iš kelių identiškų serijomis susijungusių kopijų.

Cos vieta: vienos gijos DNR 12 nukleotidų segmentas, esantis abiejuose lambda bakteriofago dvigubos gijos genomo galuose.

Delecija: mutacija, per kurią iš genomo prarandamas nukleotidas arba daugiau nukleotidų (seka).

Elektroporacija: elektros impulsų taikymas ląstelių membranos pralaidumui didinti.

Endogeninis genas: genomui būdingas genas.

Ekstrabinominė variacija: didesnė kartotinio populiacijos dalies įverčio variacija negu būtų galima tikėtis, jeigu populiacija turėtų binominį skirstinį.

Skaitymo rėmelio poslinkio mutacija: genetinė mutacija, kylanti dėl kelių įsiterpusių arba dingusių nukleotidų, kurių skaičius DNR sekoje, kuriuo koduojamas baltymas/peptidas, nesidalija iš trijų.

Įterpimas: vienos arba kelių nukleotidų bazių porų įterpimas į DNR seką.

Bankas (angl. *jackpot*): didelis skaičius mutacijų, kurios kilo iš vienos mutacijos dėl kloninės ekspansijos.

Didelės delecijos: daugiau negu keleto kilobazių delecijos DNR (kurios efektyviai nustatomos atliekant Spi ⁻ atrankos ir *lacZ* plazmidžių analizę).

Ligacija: dviejų DNR molekulės galų kovalentiškas susijungimas naudojant DNR ligazę.

Mitogenas: cheminė medžiaga, kuri stimuliuoja ląstelių dalijimosi pradžią, paskatindama mitozę (pvz., ląstelių dalijimąsi).

Neutralus genas: genas, kurio nepaveikė nei teigiami, nei neigiami atrankos veiksniai.

Pakavimas: infekcinių fago dalelių sintezė iš fago kapsidės ir uodegos baltymų preparato ir fago DNR molekulių konkatemero. Paprastai naudojamas DNR, klonuotai į lambda vektorių (atskirtai cos vietomis), pakuoti į infekcines lambda daleles.

Pakavimo efektyvumas: tai, kaip efektyviai supakuoti bakteriofagai yra išskiriami bakterijose nešiotojose.

▼M5

Plokšteles sudarantis vienetas (angl. pfu): gyvybingų bakteriofagų skaičiaus matas.

Taškinė mutacija: bendra sąvoka, kuria žymimos mutacijos, paveikiančios tik nedidelę DNR seką, įskaitant nedidelius įterpimus, delecijas ir bazių porų pakaitas.

Teigiama atranka: metodas, pagal kurį gali išlikti tik mutacijos.

Reporterinis genas: genas, pagal kurį mutavęs geno produktas yra lengvai nustatomas.

Mėginių ėmimo laikas: laikotarpio iki gyvūnų numarinimo, kuriuo cheminė medžiaga neduodama ir kuriuo neištaisytos DNR pažaidos fiksuojamos kaip stabilios mutacijos.

Universalus vektorius: vektorius, kuris yra sudarytas taip, kad gali daugintis dviejų skirtingų rūšių nešiotojuose; todėl į universalų vektorių įterptą DNR galima bandyti arba ta DNR galima manipuliuoti dviejų skirtingų tipų ląstelėse arba dviejuose skirtinguose organizmuose.

Bandomoji cheminė medžiaga: bet kuri pagal šį bandymų metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Transgeninis: organizmas, kurio genomas buvo pakeistas vieną arba kelis genus perkėlus iš kitų rūšių, ir tai, kas yra su tuo organizmu susiję arba yra jo dalis.

▼M7

B.59. ODOS JAUTRINIMAS IN CHEMICO. TIESIOGINIO PEPTIDŲ REAKTYVUMO BANDYMAS

ĮVADAS

Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) 442C (2015). Odą jautrinančia medžiaga vadinama medžiaga, kuri susilietusi su oda sukelia alerginį atsaką, kaip apibrėžta Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemoje (GHS) (1) ir Europos Sąjungos Reglamente (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo (CLP) ([1]). Šiame bandymų metode pateikta *in chemico* procedūra (tiesioginio peptidų reaktyvumo bandymas) (angl. *Direct Peptide Reactivity Assay*, DPRA) kuri turi būti taikoma siekiant patvirtinti skirtumą tarp odą jautrinančių medžiagų ir odos nejautrinančių medžiagų pagal JT GHS ir CLP.

Yra bendrasis susitarimas dėl pagrindinių biologinių reiškinių, kurie pagrįstų odos jautrinimą. Turimos žinios apie cheminius ir biologinius mechanizmus, susijusius su odos jautrinimu, buvo apibendrintos kaip nepalankios baigties kelias (angl. *Adverse Outcome Pathway*, AOP) (2) nuo molekulinio inicijavimo įvykio per tarpinius įvykius iki neigiamo poveikio, būtent, iki žmonių alerginio kontaktinio dermatito arba graužikų kontaktinio hiperjautrumo. Kalbant apie odos jautrinimo AOP, molekulinio inicijavimo įvykis yra kovalentinio ryšio atsiradimas tarp elektrofilinių medžiagų ir odos baltymų nukleofilinių centrų.

Odos jautrinimas paprastai yra įvertinamas naudojant laboratorinius gyvūnus. Klasikiniai metodai, atliekant bandymus su jūrų kiaulytėmis, yra *Magnussono Kligmano* jūrų kiaulyčių maksimizavimo bandymas (GMPT) ir *Buehlerio* bandymas (TM B.6 (3)), kuriuos taikant tiriamos odos jautrinimo indukcijos ir atsako sukėlimo tarpsniai. Bandymas su pelėmis, vietinių limfmazgių bandymas (LLNA, TM B.42 (4)) ir jo dvi modifikacijos nenaudojant radioaktyviųjų medžiagų, LLNA: DA (TM B.50 (5)) ir LLNA: BrdU-IFA (TM B.51 (6)), kurie visi vertina tik atsaką į indukciją, taip pat buvo priimti, nes jų privalumas palyginti su bandymais naudojant kiaulytes – gyvūnų gerovė ir odos jautrinimo indukcijos tarpsnio objektyvus matavimas.

Vėliau *in chemico* ir *in vitro* mechanizmų tyrimais pagrįsti bandymų metodai buvo patvirtinti kaip moksliniu požiūriu tinkami metodai cheminių medžiagų keliamam odos jautrinimo pavojui vertinti. Tačiau bandymų nenaudojant gyvūnų metodų deriniai (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*), kaip integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų (IATA) dalis, turės visiškai pakeisti šiuo metu atliekamus bandymus su gyvūnais, atsižvelgiant į kiekvieno iš dabar turimų bandymų be gyvūnų metodų apribojimus, susijusius su AOP mechanizmų aprėptimi (2) (7).

DPRA yra siūlomas, kad būtų galima ištirti odos jautrinimo AOP molekulinio inicijavimo įvykį, būtent, baltymų reaktyvumą, kiekybiškai įvertinant bandomųjų cheminių medžiagų aktyvumą lizino ar cisteino turinčių modelinių sintetinių peptidų atžvilgiu (8). Paskui cisteino ir lizino peptidų procentinio kiekio sumažėjimo vertės naudojamos medžiagos kategorijai nustatyti pagal vieną iš keturių reaktyvumo klasių, kad būtų galima patvirtinti skirtumą tarp odą jautrinančių medžiagų ir odos nejautrinančių medžiagų (9).

([1]) 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353, 2008 12 31.

▼M7

DPRA buvo įvertintas, Europos Sąjungos bandymų su gyvūnais alternatyvų etaloninei laboratorijai (angl. *European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing*, EURL ECVAM) atlikus tinkamumo patvirtinimo tyrimą ir vėliau EURL ECVAM patariamajam moksliniam komitetui (angl. *EURL ECVAM Scientific Advisory Committee*, ESAC) – nepriklausomą ekspertizę, ir buvo patvirtintas kaip moksliškai pagrįstas metodas (10), kuris gali būti taikomas kaip IATA dalis, kad būtų galima patvirtinti skirtumą tarp odą jautrinančių medžiagų ir odos nejautrinančių medžiagų pavojams klasifikuoti ir ženklinti. DPRA taikymo duomenys kartu su kita informacija yra pateikti literatūroje (11) (12) (13) (14).

Apibrėžtys pateiktos I priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI, TAIKOMUMAS IR APRIBOJIMAI

Baltymų reaktyvumo koreliacija su odos jautrinimo geba yra aiškiai nustatyta (15) (16) (17). Vis dėlto, kadangi baltymų surišimas yra tik vienas svarbus įvykis, nors tai būtų odos jautrinimo AOP molekulinio inicijavimo įvykis, vien tik baltymų reaktyvumo informacijos, gautos bandymų ir ne bandymų metodais, gali nepakakti gauti išvadą apie cheminių medžiagų jautrinimo gebos nebuvimą. Todėl į duomenis, gautus taikant šį bandymų metodą, reikėtų žiūrėti kaip į integruotųjų metodų, pvz., IATA, dalį, juos derinant su kita papildančia informacija, pvz., gauta atliekant *in vitro* bandymus, kurie nagrinėja kitus svarbius odos jautrinimo AOP įvykius, taip pat taikant ne bandymų metodus, įskaitant kryžmines nuorodas į cheminius analogus.

Šis bandymų metodas gali būti taikomas kaip IATA dalis kartu su kita papildančia informacija, kad būtų galima patvirtinti skirtumą tarp odą jautrinančių medžiagų (t. y. JT GHS ar CLP 1 kategorijos) ir odos nejautrinančių medžiagų. Šis bandymų metodas negali būti taikomas atskirai odą jautrinančioms medžiagoms priskirti 1A ir 1B subkategorijoms, kaip apibrėžta JT GHS ar CLP, arba prognozuoti jų jautrinimo gebą priimant saugos vertinimo sprendimus. Tačiau teigiamas rezultatas, gautas taikant DPRA, priklausomai nuo reglamentavimo sistemos gali būti naudojamas atskirai, kad cheminė medžiaga galėtų būti priskirta JT GHS ar CLP 1 kategorijai.

Buvo patvirtinta, kad DPRA bandymo metodą galima pritaikyti laboratorijose, kurios turi analizės efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) metodu patirties. Prognozių atkuriamumo lygis, kurio būtų galima tikėtis taikant bandymų metodą, yra maždaug 85 % laboratorijų viduje ir 80 % tarp laboratorijų (10). Rezultatų, gautų atliekant tinkamumo patvirtinimo tyrimą (18), ir paskelbtų tyrimų rezultatų (19) visuma rodo, kad, palyginti su LLNA rezultatais, DPRA tikslumas atskiriant jautrinančias medžiagas (t. y. JT GHS ar CLP 1 kategorijos) nuo nejautrinančių medžiagų yra 80 % (N=157), esant 80 % (88/109) jautriui ir 77 % (37/48) specifiškumui. Labiau tikėtina, kad DPRA sumažintų prognozę dėl cheminių medžiagų, kurios rodo mažą ar vidutinę odos jautrinimo gebą (t. y. JT GHS ar CLP 1B subkategorijos), nei cheminės medžiagos, kurios rodo didelę odos jautrinimo gebą (t. y. JT GHS ar CLP 1A kategorijos) (18) (19). Tačiau čia pateiktos DPRA, kaip atskirai taikomo bandymų metodo, tikslumo vertės yra tik orientacinės, kadangi bandymų metodo duomenis reikėtų nagrinėti kartu su kitais informacijos šaltiniais kaip IATA dalimis ir atsižvelgiant į 9 pastraipos nuostatas. Be to, įvertinant odos jautrinimo metodus, kurie nenaudoja gyvūnų, reikėtų turėti omenyje, kad LLNA bandymas, kaip ir kiti bandymai su gyvūnais, gali ne visiškai atitikti situaciją, susijusią su tiriamąja rūšimi, t. y. žmonėmis. Atsižvelgiant į turimų duomenų visumą, buvo įrodyta, kad DPRA tinka bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios aprėpia įvairias organines funkcines grupes, reakcijų mechanizmus, odos jautrinimo gebą (kaip nustatyta atliekant *in vivo* tyrimus) ir fizikines chemines medžiagų savybes (8) (9) (10) (19). Kartu paimta ši informacija rodo DPRA naudą prisidedant prie odos jautrinimo pavojaus identifikavimo.

▼M7

Šiame bandymų metode vartojamas terminas *bandomoji cheminė medžiaga* reiškia tai, kas yra bandoma, ir nėra susijęs su DPRA tinkamumu bandyti chemines medžiagas ir (arba) mišinius. Šis bandymų metodas netinka metalų junginiams, nes, kaip žinoma, jie su baltymais reaguoja pagal kitus nei kovalentinio ryšio mechanizmus. Bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti tirpi atitinkamame tirpiklyje, kai jos galutinė koncentracija būtų 100 mmol/l (žr. 18 pastraipą). Tačiau bandomąsias chemines medžiagas, kurios netirpsta tiek, kad būtų gauta ši koncentracija, vis vien galima bandyti esant mažesnei tirpumo koncentracijai. Tokiu atveju teigiamas rezultatas vis tiek galėtų būti taikomas bandomajai cheminei medžiagai patvirtinti kaip odą jautrinančiai medžiagai, bet pagal neigiamą rezultatą negalima daryti tvirtos išvados dėl reaktyvumo nebuvimo. Šiuo metu turima nedaug informacijos apie DPRA tinkamumą žinomos sudėties mišiniams (18) (19). DPRA vis dėlto laikomas techniškai tinkamu bandyti daugiakomponentes medžiagas ir žinomos sudėties mišinius (žr. 18 pastraipą). Prieš taikant bandymų metodą mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar šiuo metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, tai dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį. Dabartinis prognozavimo modelis negali būti taikomas nežinomos sudėties sudėtingiems mišiniams arba nežinomos ar kintamos sudėties medžiagoms, sudėtingųjų reakcijų produktams ar biologinėms medžiagoms (t. y. UVCB medžiagoms) dėl tam tikro bandomosios cheminės medžiagos ir peptido molinio santykio. Šiam tikslui reikės sukurti gravimetriniu metodu pagrįstą naują prognozavimo modelį. Tais atvejais, kai galima pateikti įrodymų dėl bandymų metodo netinkamumo kitų specifinių kategorijų cheminėms medžiagoms, bandymų metodo nereikėtų taikyti toms specifinių kategorijų cheminėms medžiagoms.

Šis bandymų metodas yra *in chemico* metodas, kuris neaprėpia metabolinės sistemos. Cheminės medžiagos, kurioms būtinas biologinis aktyvinimas fermentais, kad galėtų pasireikšti jų odos jautrinimo geba (t. y. prohaptenai) negali būti aptiktos šiuo bandymų metodu. Yra pranešimų, kad cheminės medžiagos, kurios tampa odą jautrinančiomis po abiotinio virsmo (t. y. prehaptenai) kartais tiksliai aptinkamos šiuo bandymų metodu (18). Atsižvelgiant į tai, kas buvo pasakyta pirmiau, taikant bandymų metodą gauti neigiami rezultatai turėtų būti aiškinami, atsižvelgiant į nurodytus apribojimus ir kartu su kitais IATA sistemos informacijos šaltiniais. Dėl bandomųjų cheminių medžiagų, kurios kovalentiškai nesijungia su peptidu, bet skatina jo oksidaciją (t. y. cisteino dimerizaciją) galėtų būti pervertintas peptidų kiekio sumažėjimas, dėl ko galbūt būtų gautos klaidingai teigiamos prognozės ir (arba) medžiagos būtų priskirtos didesnio reaktyvumo klasei (žr. 29 ir 30 pastraipas).

Kaip aprašyta, DPRA padeda patvirtinti skirtumą tarp odą jautrinančių medžiagų ir odos nejautrinančių medžiagų. Tačiau jis taip pat gali prisidėti prie jautrinimo gebos vertinimo (11), kai taikomas kaip integruotųjų metodų, pvz IATA, dalis. Tačiau būtinas tolesnis darbas, pageidautina pagrįstas gautais duomenimis apie žmones, kad būtų galima nustatyti, kaip DPRA rezultatai gali prisidėti prie veikimo gebos vertinimo.

BANDYMO PRINCIPAS

DPRA yra *in chemico* metodas, kuriuo kiekybiškai nustatoma cisteino ar lizino turinčio peptido liekamoji koncentracija po 24 h trukmės inkubavimo su bandomąja chemine medžiaga 25 ± 2,5 °C temperatūroje. Aptikimui palengvinti sintetiniai peptidai turi fenilalanino. Santykinė peptidų koncentracija matuojama efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) metodu, taikant gradientinį eliuavimą ir UV aptikimą esant 220 nm. Apskaičiuojamos cisteino ir lizino peptido kiekio sumažėjimo procentinės vertės, ir jos naudojamos kuriant prognozavimo modelį (žr. 29 pastraipą), pagal kurį bandomąją cheminę medžiagą galima priskirti vienai iš keturių reaktyvumo klasių, naudojamų patvirtinti skirtumą tarp odą jautrinančių medžiagų ir odos nejautrinančių medžiagų.

▼M7

Prieš pradėdamos taikyti bandymų metode aprašytą procedūrą įprastiniu būdu, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, naudodamos dešimt kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų, išvardytų 2 priedėlyje.

PROCEDŪRA

Šis bandymų metodas yra pagrįstas DPRA DB-ALM protokolu Nr. 154 (20), kuris atitinka protokolą, taikytą atliekant EURL ECVAM koordinuotą tinkamumo patvirtinimo tyrimą. Rekomenduojama šį protokolą taikyti tada, kai metodas įdiegiamas ir taikomas laboratorijoje. Toliau pateiktas pagrindinių DPRA komponentų ir procedūrų aprašymas. Jei naudojama alternatyvioji HPLC schema, reikėtų įrodyti jos atitiktį patvirtintai schemai, aprašytai DB-ALM protokole (pvz., bandant 2 priedėlyje nurodytas kvalifikacijai tikrinti skirtas chemines medžiagas).

Cisteino ar lizino turinčių peptidų paruošimas

Sintetinių peptidų, turinčių cisteino (Ac-RFAACAA-COOH) ir lizino (Ac-RFAAKAA-COOH), pradiniai tirpalai, kurių grynumas yra didesnis kaip 85 % ir pageidautina 90–95 % intervale, turėtų būti iš naujo paruošti visiškai prieš jų inkubavimą su bandomąja chemine medžiaga. Galutinė cisteino peptido koncentracija turėtų būti 0,667 mmol/l fosfatinio buferinio tirpalo, kurio pH 7,5, o lizino peptido – 0,667 mmol/l amonio acetato buferinio tirpalo, kurio pH 10,2. HPLC eigos seka turėtų būti sudaryta taip, kad HPLC analizės trukmė būtų trumpesnė kaip 30 h. Jei tai HPLC įrenginys, naudotas atliekant tinkamumo patvirtinimo tyrimą ir aprašytas šiame bandymų metode, atliekant vieną HPLC bandymų seriją galima įdėti iki 26 analizės ėminių (kuriuos sudaro bandomosios cheminės medžiagos ėminiai, teigiami kontroliniai ėminiai ir reikiamas skaičius tirpiklio kontrolinių ėminių, pagrįstas atskirų bandyme naudojamų tirpiklių skaičiumi, kiekvieną ėminį bandant kaip trijų kartotinių ėminių rinkinį). Visus vienos serijos analizuojamus kartotinius ėminius reikėtų ruošti iš identiškų cisteino ir lizino peptidų pradinių tirpalų. Prieš naudojant, rekomenduojama patikrinti atskiras peptidų partijas, ar jie pakankamai gerai tirpsta.

Bandomosios cheminės medžiagos paruošimas

Prieš atliekant bandymą, reikėtų įvertinti bandomosios cheminės medžiagos tirpumą tinkamame tirpiklyje pagal soliubilizavimo procedūrą, aprašytą DPRA DB-ALM protokole (20). Tinkamas tirpiklis – tai tirpiklis, kuriame bandomoji cheminė medžiaga visiškai ištirpsta. Kadangi taikant DPRA bandomoji cheminė medžiaga inkubuojama esant dideliam jos pertekliui palyginti su cisteino ar lizino peptidais, pakankamu įrodymu, kad bandomoji cheminė medžiaga (ir visi jos komponentai, jei bandoma daugiakomponentė medžiaga ar mišinys) yra ištirpusi, yra skaidraus tirpalo susidarymas. Tinkami tirpikliai yra acetonitrilas, vanduo, vandens ir acetonitrilo 1:1 mišinys, izopropanolis, acetonas arba acetono ir acetonitrilo 1:1 mišinys. Galima naudoti kitus tirpiklius, jei jie neturi įtakos peptidų stabilumui, kuriam kontroliuoti naudojami etaloniniai kontroliniai ėminiai C (t. y. ėminiai, kuriuos sudaro vien tik peptidas, ištirpintas tinkamame tirpiklyje; žr. 3 priedėlį). Jei bandomoji cheminė medžiaga netirpsta nei viename iš šių tirpiklių, blogiausiu atveju reikėtų mėginti ją soliubilizuoti 300 µl DMSO ir gautą tirpalą atskiesti 2 700 µl acetonitrilo, o jei bandomoji cheminė medžiaga netirpsta šiame mišinyje, reikėtų mėginti tą patį bandomosios cheminės medžiagos kiekį soliubilizuoti 1 500 µl DMSO ir gautą tirpalą atskiesti 1 500 µl acetonitrilo. Bandomąją cheminę medžiagą reikėtų iš anksto pasverti į stiklinius buteliukus ir nedelsiant ištirpinti prieš pat bandymą tinkamame tirpiklyje, paruošiant 100 mmol/l tirpalą. Jei tiriami žinomos sudėties mišiniai ir daugiakomponentės medžiagos, reikėtų nustatyti vieną grynumą, kaip jų sudedamųjų

▼M7

dalių (išskyrus vandenį) sumą, ir vieną vidutinę molekulinę masę – atsižvelgiant į kiekvieno atskiro mišinio komponento (išskyrus vandenį) molekulinę masę ir kiekvieno iš jų dalį. Gautas grynumo ir vidutinės molekulinės masės vertes reikėtų naudoti apskaičiuojant bandomosios cheminės medžiagos masę, kurios reikia 100 mmol/l tirpalui paruošti. Kadangi negalima nustatyti polimerų pagrindinės molekulinės masės, galima imti monomero molekulinę masę (ar polimerą sudarančių monomerų vidutinę molekulinę masę) 100 mmol/l tirpalui paruošti. Tačiau, bandant žinomos sudėties mišinius, daugiakomponentes medžiagas ar polimerus, reikėtų numatyti galimybę bandyti grynąją cheminę medžiagą. Skystąsias grynas chemines medžiagas reikėtų bandyti kaip tokias ir iš anksto neskiestas, inkubuojant atitinkamai 1:10 ir 1:50 moliniu santykiu su cisteino ir lizino peptidais. Kietąsias bandomąsias chemines medžiagas reikėtų ištirpinti gaunant maksimalią tirpumo koncentraciją tame pačiame tirpiklyje, kuris naudojamas 100 mmol/l efektyviosios koncentracijos tirpalui ruošti. Jas reikėtų bandyti kaip tokias ir papildomai neskiesti, inkubuojant atitinkamai 1:10 ir 1:50 moliniu santykiu su cisteino ir lizino peptidais. Jei efektyviosios koncentracijos 100 mmol/l tirpalui ir grynai cheminei medžiagai gauti rezultatai (reaktyvumo ar nereaktyvumo) sutaptų, būtų galima padaryti tvirtą išvadą dėl rezultato.

Teigiamų kontrolinių ėminių, etaloninių kontrolinių ėminių ir koeliuavimo kontrolinių ėminių paruošimas

Kaip teigiamą kontrolinę cheminę medžiagą (PC) reikėtų naudoti cinamono aldehidą (CAS 104-55-2; ≥95 % maistinio grynumo), ruošiant 100 mmol/l koncentracijos tirpalą acetonitrile. Galima naudoti kitas tinkamas teigiamas kontrolines chemines medžiagas, kurioms būtų gautos vidutinės kiekio sumažėjimo vertės, jei yra istorinių duomenų, kad būtų galima gauti palyginamuosius bandymo eigos priimtinumo kriterijus. Be to, į HPLC bandymų seką reikėtų įtraukti etaloninius kontrolinius ėminius (t. y. ėminius, kuriuos sudaro vien tik peptidas, ištirpintas tinkamame tirpiklyje), kurie naudojami HPLC sistemos tinkamumui tikrinti prieš analizę (etaloninius kontrolinius ėminius A), etaloninių kontrolinių ėminių laikiniam stabilumui tikrinti (etaloninius kontrolinius ėminius B), ir ėminius, kurie patikrintų, ar bandomajai cheminei medžiagai ištirpinti naudojamas tirpiklis nedaro įtakos procentiniam peptidų kiekio sumažėjimui (etaloninius kontrolinius ėminius C) (žr. 3 priedėlį). Kiekvienai cheminei medžiagai naudojamas reikiamas kontrolinis ėminys tos cheminės medžiagos procentiniam peptidų kiekio sumažėjimui apskaičiuoti (žr. 26 pastraipą). Be to, kiekvienai analizuojamai bandomajai cheminei medžiagai į bandymų seką reikėtų įtraukti koeliuavimo kontrolinį ėminį, kurį sudarytų vien tik bandomoji cheminė medžiaga, kad būtų galima aptikti galimą bandomosios cheminės medžiagos koeliuavimą su lizino ar cisteino peptidu.

Bandomosios cheminės medžiagos inkubavimas su cisteino ir lizino peptidų tirpalais

Cisteino ir lizino peptidų tirpalus reikėtų inkubuoti su bandomąja chemine medžiaga stikliniuose automatinio ėminių ėmiklio buteliukuose atitinkamai 1:10 ir 1:50 santykiu. Jei iš karto po bandomosios cheminės medžiagos tirpalo įpylimo į peptidų tirpalą atsiranda nuosėdų dėl jos mažo tirpumo vandenyje, šiuo atveju nėra aišku, koks bandomosios cheminės medžiagos kiekis liko tirpale reakcijai su peptidu. Todėl tokiu atveju teigiamą rezultatą vis tiek būtų galima panaudoti, bet neigiamas rezultatas yra neapibrėžtas ir jį reikėtų aiškinti gana atsargiai (taip pat žr. 11 pastraipos nuostatas dėl cheminių medžiagų, kurių tirpumo nepakanka 100 mmol/l koncentracijai gauti, bandymo). Prieš atliekant HPLC analizę, reakcijos tirpalą reikėtų laikyti 24 ± 2 h tamsoje ir 25 ± 2,5 °C temperatūroje. Kiekviena bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti analizuojama tris kartus su abiem peptidais. Prieš HPLC analizę ėminiai turi būti vizualiai patikrinti. Jei stebimos nuosėdos arba fazių atsiskyrimas, atsargumo dėlei ėminius galima centrifuguoti mažu greičiu (100–400 × *g*), kad nuosėdos nusėstų ant buteliuko dugno, nes dėl didelio nuosėdų kiekio gali užsikimšti HPLC vamzdeliai ar kolonėlės. Jei, pasibaigus inkubavimo laikotarpiui, stebimos nuosėdos arba fazių atsiskyrimas, peptidų kiekio sumažėjimo įvertis gali būti per mažas ir neigiamo rezultato atveju negalima padaryti pakankamai patikimos išvados dėl reaktyvumo nebuvimo.

▼M7

HPLC etaloninės kalibravimo kreivės sudarymas

Reikėtų sudaryti abiejų peptidų, cisteino ir lizino, etaloninę kalibravimo kreivę. Peptidų etalonus reikėtų ruošti 20 % ar 25 % acetonitrilo ir buferinio tirpalo mišinio tirpale, naudojant fosfatinį buferinį tirpalą (pH 7,5) cisteino peptidui ir amonio acetato buferinį tirpalą (pH 10,2) lizino peptidui. Naudojant peptidų pradinio tirpalo (0,667 mmol/l) praskiestų etaloninių tirpalų seriją, reikėtų paruošti 6 kalibravimo tirpalus, kurie apimtų 0,534–0,0167 mmol/l intervalą. Į etaloninę kalibravimo kreivę taip pat reikėtų įtraukti buferinio tirpalo tuščiąjį ėminį. Tinkamos kalibravimo kreivės turėtų turėti r^2>0,99.

Pasiruošimas HPLC ir analizė

Prieš atliekant analizę reikėtų patikrinti HPLC sistemos tinkamumą. Peptidų kiekio sumažėjimas stebimas HPLC sistema, sujungta su UV detektoriumi (fotodiodinės matricos detektoriumi ar fiksuoto bangos ilgio sugerties detektoriumi, matuojant 220 nm signalą). HPLC sistemoje įrengiama reikiama kolonėlė. HPLC įrenginio struktūra yra aprašyta patvirtintame protokole, kuriame kaip tinkamiausia kolonėlė naudojama Zorbax SB-C-18 2,1 mm × 100 mm × 3,5 mikronų kolonėlė. Naudojant šią atvirkštinių fazių HPLC kolonėlę 2 h iki bandymo pradžios visoje sistemoje turi būti nustatyta pusiausvyra 30 °C su 50 % A fazės (0,1 % (tūrio) trifluoracto rūgšties tirpalas vandenyje) ir 50 % B fazės (0,085 % (tūrio) trifluoracto rūgšties tirpalas acetonitrile) tirpalu.. HPLC analizė turėtų būti atliekama esant 0,35 ml/min srautui ir tiesiniam gradientui nuo 10 % iki 25 % acetonitrilo per 10 min, tada staigiai padidinama iki 90 % acetonitrilo kitoms medžiagoms pašalinti. Reikėtų įpurkšti vienodą kiekvieno etalono, ėminio ir kontrolinio ėminio tūrį. Tarp įpurškimų pradinėmis sąlygomis kolonėlėje 7 min turėtų būti nustatoma pusiausvyra. Jei naudojama kitokia atvirkštinių fazių HPLC kolonėlė, pirmiau aprašytus nustatomuosius parametrus reikėtų reguliuoti, kad būtų užtikrintas reikiamas eliuavimas ir cisteino bei lizino peptidų smailių integravimas, įskaitant įpurškiamą tūrį, kuris gali skirtis atsižvelgiant į naudojamą sistemą (paprastai 3–10 µl). Svarbu pažymėti, kad naudojant alternatyviąją HPLC schemą, reikėtų įrodyti jos atitiktį pirmiau aprašytai patvirtintai schemai (pvz., bandant 2 priedėlyje nurodytas kvalifikacijai tikrinti skirtas chemines medžiagas). Sugerties koeficientas matuojamas esant 220 nm. Jei naudojamas fotodiodinės matricos detektorius, reikėtų registruoti sugerties koeficientą esant 258 nm. Reikėtų pažymėti, kad kai kurių tiekėjų acetonitrilas gali daryti neigiamą įtaką peptidų stabilumui ir tai reikėtų įvertinti, kai naudojama nauja acetonitrilo partija. Kaip koeliuavimo rodiklį galima naudoti 220 smailės ploto ir 258 smailės ploto santykį. Jei kiekvieno ėminio santykio intervalas atitinka 90 % < kontrolinių ėminių santykio vidurkis ([1]) <100 %, tai būtų tinkamas įrodymas, kad koeliuavimo nebuvo.

Gali būti bandomųjų cheminių medžiagų, kurios galėtų skatinti cisteino peptido oksidaciją. Cisteino peptido dimero smailę galima stebėti vizualiai. Jei pasirodytų, kad vyko dimerizacija, ji būtų stebima kaip galimas per didelis procentinio peptidų kiekio sumažėjimo įvertis, dėl ko būtų gaunamos klaidingai teigiamos prognozės ir (arba) medžiaga priskirta aukštesnei reaktyvumo klasei (žr. 29 ir 30 pastraipas).

Cisteino ir lizino peptidų HPLC analizę galima atlikti vienu metu (jei yra dvi HPLC sistemos) ar skirtingomis dienomis. Jei analizė atliekama skirtingomis dienomis, visi bandomosios cheminės medžiagos tirpalai turėtų būti iš naujo ruošiami abiem bandymams kiekvieną dieną. Analizės trukmę reikėtų matuoti, siekiant užtikrinti, kad pirmasis ėminys būtų įpurškiamas praėjus 22–26 h nuo

([1]) Visame dokumente vidurkis reiškia aritmetinį vidurkį.

▼M7

bandomosios cheminės medžiagos sumaišymo su peptidų tirpalu. HPLC eigos seka turėtų būti sudaryta taip, kad HPLC analizės trukmė būtų trumpesnė kaip 30 h. Jei tai HPLC įrenginys, naudotas atliekant tinkamumo patvirtinimo tyrimą ir aprašytas šiame bandymų metode, atliekant vieną HPLC bandymų seriją galima įdėti iki 26 analizės ėminių (taip pat žr. 17 pastraipą). HPLC analizės sekos pavyzdys pateiktas 3 priedėlyje.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenų įvertinimas

Kiekvieno ėminio cisteino ar lizino peptidų koncentracija nustatoma fotometriškai, matuojant 220 nm bangos ilgį atitinkančių reikiamų smailių plotą (plotą po kreive) ir peptidų koncentraciją apskaičiuojant pagal etalonams gautą tiesinio kalibravimo kreivę.

Kiekvieno ėminio procentinis peptidų kiekio sumažėjimas nustatomas, matuojant smailės plotą, kuris dalijamas iš atitinkamų etaloninių kontrolinių ėminių C vidutinio smailės ploto (žr. 3 priedėlį) pagal toliau pateiktą formulę.

$$\textit{Peptidų kiekio umažėjimo procentinė dalis} = \left[1 - \left(\frac{\textit{Įpurkštų kartoninių ėminių peptidų smailės plotas}}{\textit{Etaloninų kontrolinių ėminių C vidutinis peptidų smailės plotas}}\right)\right] \times 100$$

Priimtinumo kriterijai

Bandymų seka būtų laikoma tinkama, jei ji atitiktų šiuos kriterijus:

a) etaloninė kalibravimo kreivė turėtų turėti r^2>0,99,

b) cinamono aldehido, kaip teigiamos kontrolinės medžiagos, trijų kartotinių ėminių vidutinė procentinio peptidų kiekio sumažėjimo vertė, gauta cisteino peptidui, turėtų būti 60,8 %–100 %, o lizino peptidui – 40,2 %–69,0 %, kartotinių teigiamų kontrolinių ėminių cisteino procentinio kiekio sumažėjimo maksimalus standartinis nuokrypis (SN) turėtų būti <14,9 %, lizino – <11,6 %, ir

c) etaloninių kontrolinių ėminių A vidutinė peptidų koncentracija turėtų būti 0,50 ± 0,05 mmol/l, devynių etaloninių kontrolinių ėminių B ir C tirpalo acetonitrile smailių plotų variacijos koeficientas (CV) turėtų būti <15,0 %.

Jei nėra atitikties vienam arba daugiau kriterijų, bandymą reikėtų pakartoti.

Bandomajai cheminei medžiagai gauti rezultatai būtų laikomi tinkamais, jei jie atitiktų šiuos kriterijus:

a) bandomosios cheminės medžiagos kartotinių ėminių cisteino procentinio kiekio sumažėjimo maksimalus standartinis nuokrypis turėtų būti < 14,9 %, lizino – < 11,6 %,

b) trijų etaloninių kontrolinių ėminių C vidutinė peptidų koncentracija atitinkamame tirpiklyje turėtų būti 0,50 ± 0,05 mmol/l. Jei šių kriterijų nesilaikoma, duomenys turėtų būti atmesti ir bandymas su ta konkrečia bandomąja chemine medžiaga turėtų būti pakartotas.

Prognozavimo modelis

Apskaičiuojamas kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai gautas cisteino ir lizino vidutinis kiekio sumažėjimas procentais. Skaičiuojant vidurkį, neigiamas sumažėjimas prilyginamas nuliui. Naudojant cisteino 1:10 ir lizino 1:50 prognozavimo modelį, pateiktą 1 lentelėje, peptidų kiekio sumažėjimo vidurkio 6,38 % riba turėtų būti naudojama kaip odą jautrinančių medžiagų ir odos nejautrinančių medžiagų skiriamoji riba IATA sistemoje. Prognozavimo modelio taikymas, bandomąją cheminę medžiagą priskiriant reaktyvumo klasei (t. y. mažo, vidutinio ir didelio reaktyvumo), gali būti naudingas jautrinimo gebos vertinimo informacijai gauti IATA sistemoje.

▼M7

1 lentelė

Cisteino 1:10 ir lizino 1:50 prognozavimo modelis (1)

Cisteino ir lizino vidutinis kiekio sumažėjimas %	Reaktyvumo klasė	DPRA prognozė (2)
0 % ≤ vidutinis kiekio sumažėjimas % ≤ 6,38 %	Jokio reaktyvumo arba jis minimalus	Neigiama
6,38 % < vidutinis kiekio sumažėjimas % ≤ 22,62 %	Mažas reaktyvumas	Teigiama
22,62 % < vidutinis kiekio sumažėjimas % ≤ 42,47 %	Vidutinis reaktyvumas	
42,47 % < vidutinis kiekio sumažėjimas % ≤ 100 %	Didelis reaktyvumas	

(1) Skaičiai rodo statistiškai gautas ribines vertes ir nėra susiję su matavimo tikslumu.
(2) Į DPRA prognozę reikėtų žiūrėti kaip IATA sistemos dalį ir atsižvelgti į 9 ir 12 pastraipų nuostatas.

Gali pasitaikyti atvejų, kai bandomoji cheminė medžiaga (medžiaga ar vienas arba keli daugiakomponentės medžiagos ar mišinio komponentai) reikšmingai sugeria esant 220 nm bangos ilgiui ir sulaikymo trukmė yra lygi peptido sulaikymo trukmei (koeliuavimas). Koeliuavimo problemą galima išspręsti šiek tiek suderinant HPLC įrenginį, kad labiau atsiskirtų bandomosios cheminės medžiagos ir peptido sulaikymo trukmė. Jei sprendžiant atskyrimo problemą naudojamas alternatyvus HPLC įrenginys, turėtų būti įrodyta jo atitiktis patvirtintai procedūrai (pvz., bandant 2 priedėlyje nurodytas kvalifikacijai tikrinti skirtas chemines medžiagas). Jei vyksta koeliuavimas, peptido smailė negali būti integruojama ir neįmanoma apskaičiuoti procentinio peptidų kiekio sumažėjimo. Kai tokios bandomosios cheminės medžiagos koeliuavimas vyksta su abiem, cisteino ir lizino, peptidais, analizė turėtų būti pateikta ataskaitoje kaip „nedavusi rezultato“. Jei koeliuavimas vyksta tik su lizino peptidu, galima naudoti cisteino 1:10 prognozavimo modelį, pateiktą 2 lentelėje.

2 lentelė

Cisteino 1:10 prognozavimo modelis (1)

Cisteino (Cys) kiekio sumažėjimas %	Reaktyvumo klasė	DPRA prognozė (2)
0 % ≤ Cys kiekio sumažėjimas, % ≤ 13,89 %	Jokio reaktyvumo arba jis minimalus	Neigiama
13,89 % < Cys kiekio sumažėjimas, % ≤ 23,09 %	Mažas reaktyvumas	Teigiama
23,09 % < Cys kiekio sumažėjimas, % ≤ 98,24 %	Vidutinis reaktyvumas	
98,24 % < Cys kiekio sumažėjimas, % ≤ 100 %	Didelis reaktyvumas	

(1) Skaičiai rodo statistiškai gautas ribines vertes ir nėra susiję su matavimo tikslumu.
(2) Į DPRA prognozę reikėtų žiūrėti kaip IATA sistemos dalį ir atsižvelgti į 9 bei 12 pastraipų nuostatas.

Gali būti kitų atvejų, kai bandomosios cheminės medžiagos ir kurio nors iš peptidų sulaikymo trukmės persidengimas yra nepakankamas. Tokiais atvejais procentinį peptidų kiekio sumažėjimą galima įvertinti apytikriai ir naudoti kaip cisteino 1:10 ar lizino 1:50 prognozavimo modelį, tačiau bandomosios cheminės medžiagos negalima tiksliai priskirti reaktyvumo klasei.

▼M7

Vienos cisteino ir lizino peptidų HPLC analizės turėtų pakakti bandomajai cheminei medžiagai, kai rezultatas yra aiškus. Tačiau kai rezultatai yra arti naudojamos teigiamo ir neigiamo rezultatų atskyrimo ribos (t. y. tarpiniai rezultatai), gali prireikti papildomo bandymo. Jei pagal cisteino 1:10 ar lizino 1:50 prognozavimo modelį procentinio peptidų kiekio sumažėjimo vidurkis yra 3 %–10 % intervale, o pagal cisteino 1:10 prognozavimo modelį cisteino procentinio kiekio sumažėjimo vidurkis yra 9 %–17 % intervale, reikėtų spręsti klausimą dėl antrojo bandymo, taip pat dėl trečiojo, jei per pirmuosius du būtų gauti prieštaraujantys rezultatai.

Bandymo ataskaita

Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga

— Vienkomponentė medžiaga

  — cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;

  — fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje, molekulinė masė ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės, atsižvelgiant į turimus duomenis;

  — grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka ir praktiškai įmanoma, kt.;

  — apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);

  — bandymo koncentracijos vertė (-ės);

  — laikymo sąlygos ir stabilumas, atsižvelgiant į turimus duomenis.

— Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišinys:

  — kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, pvz., cheminis pavadinimas (žr. pirmiau), grynumas, kiekybinis paplitimas ir būdingos fizikinės ir cheminės savybės, atsižvelgiant į turimus duomenis;

  — fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės, atsižvelgiant į turimus duomenis;

  — molekulinė masė arba vidutinė molekulinė masė, jei tai žinomos sudėties mišiniai ar polimerai arba kita tyrimams atlikti svarbi informacija;

  — apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);

  — bandymo koncentracijos vertė (-ės);

  — laikymo sąlygos ir stabilumas, atsižvelgiant į turimus duomenis;

Kontroliniai ėminiai

— Teigiami kontroliniai ėminiai

  — cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;

  — fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje, molekulinė masė ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės, atsižvelgiant į turimus duomenis;

  — grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka ir praktiškai įmanoma, kt.;

▼M7

— apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);

— bandymo koncentracijos vertė (-ės);

— laikymo sąlygos ir stabilumas, atsižvelgiant į turimus duomenis;

— nuoroda į istorinių teigiamų kontrolinių ėminių rezultatus, kurie įrodytų tinkamus bandymo priėmimo kriterijus, jei tinka.

— Tirpiklis ir (arba) nešiklis

— naudotas tirpiklis ir (arba) nešiklis ir jų sudedamųjų dalių santykis, jei tinka;

— cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai) ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;

— grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka ir praktiškai įmanoma, kt.;

— fizinė išvaizda, molekulinė masė ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės, jei naudojami kiti nei bandymų metode nurodyti tirpikliai ar nešikliai, atsižvelgiant į turimus duomenis;

— laikymo sąlygos ir stabilumas, atsižvelgiant į turimus duomenis;

— kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio pasirinkimo pagrindimas;

— įtakos peptido stabilumui bandymo rezultatai, jei naudojamas acetonitrilas.

Peptidų, teigiamo kontrolinio ėminio ir bandomosios cheminės medžiagos paruošimas

— peptidų tirpalų apibūdinimas (tiekėjas, partija, tiksli peptido masė, į pradinį tirpalą įpiltas tūris);

— teigiamo kontrolinio ėminio tirpalo apibūdinimas (tiksli teigiamos kontrolinės cheminės medžiagos masė, į bandymo tirpalą įpiltas tūris);

— bandomosios cheminės medžiagos tirpalų apibūdinimas (tiksli bandomosios cheminės medžiagos masė, į bandymo tirpalą įpiltas tūris).

HPLC prietaiso nuostačiai ir analizė

— HPLC prietaiso, HPLC ir prieškolonėlių, detektoriaus, automatinio ėminių ėmiklio tipas;

— su HPLC analize susiję parametrai, pvz., kolonėlės temperatūra, įpurškiami tūriai, srautas ir gradientas.

Sistemos tinkamumas

— kiekvieno etalono ir etaloninio kontrolinio ėminio A kartotinių ėminių peptidų smailių plotas esant 220 nm;

— grafinis tiesinės kalibravimo kreivės vaizdas ir ataskaitoje pateikta r^2 vertė;

— etaloninio kontrolinio ėminio A kiekvieno kartotinio ėminio peptidų koncentracija;

— trijų etaloninių kontrolinių ėminių A peptidų koncentracija (mmol/l), standartinis nuokrypis ir variacijos koeficientas;

— etaloninių kontrolinių ėminių A ir C peptidų koncentracija.

▼M7

Analizės seka

— Etaloninių kontrolinių ėminių:

  — kiekvieno B ir C kartotinio ėminio peptidų smailių plotas esant 220 nm;

  — devynių etaloninių kontrolinių ėminių B ir C peptidų tirpalo acetonitrile vidutinis smailių plotas esant 220 nm, standartinis nuokrypis ir variacijos koeficientas (dėl kontrolinių ėminių stabilumo per visą analizės trukmę);

  — kiekvieno naudoto tirpiklio trijų atitinkamų etaloninių kontrolinių ėminių C vidutinis peptidų smailės plotas esant 220 nm (procentiniam peptidų kiekio sumažėjimui skaičiuoti);

  — kiekvieno naudoto tirpiklio trijų atitinkamų etaloninių kontrolinių ėminių C peptidų koncentracija (mmol/l);

  — kiekvieno naudoto tirpiklio trijų atitinkamų etaloninių kontrolinių ėminių C vidutinė peptidų koncentracija (mmol/l), standartinis nuokrypis ir variacijos koeficientas.

— Teigiamų kontrolinių ėminių:

  — kiekvieno kartotinio ėminio peptidų smailių plotas esant 220 nm;

  — kiekvieno kartotinio ėminio procentinis peptidų kiekio sumažėjimas;

  — trijų kartotinių ėminių procentinio peptidų kiekio sumažėjimo vidurkis, standartinis nuokrypis ir variacijos koeficientas.

— Kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos:

  — reakcijos mišinyje susidariusių nuosėdų išvaizda inkubavimo laikotarpio pabaigoje, jei jų yra. Ar nuosėdos buvo pakartotinai soliubilizuojamos ar centrifuguojamos;

  — koeliuavimo buvimas;

  — visų kitų svarbių stebėjimų aprašymas, jei tinka;

  — kiekvieno kartotinio ėminio peptidų smailių plotas esant 220 nm;

  — kiekvieno kartotinio ėminio procentinis peptidų kiekio sumažėjimas;

  — trijų kartotinių ėminių procentinio peptidų kiekio sumažėjimo vidurkis, standartinis nuokrypis ir variacijos koeficientas;

  — vidutinės cisteino ir lizino procentinio sumažėjimo vertės;

  — naudotas prognozavimo modelis ir DPRA prognozė.

Kvalifikacijos tikrinimas

— Procedūra, taikyta įrodant laboratorijos kvalifikaciją atlikti bandymus pagal šį metodą, jei tinka (pvz., bandant kvalifikacijai tikrinti skirtas chemines medžiagas) arba įrodant metodo taikymo charakteristikų atkuriamumą laikui bėgant.

Rezultatų aptarimas

— Rezultatų, gautų taikant DPRA bandymų metodą, aptarimas;

— bandymų metodo rezultatų aptarimas atsižvelgiant į IATA, jei turima kita susijusi informacija.

Išvada

▼M7

LITERATŪRA

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD, Paris.

(3) Šio priedo B.6 skyrius. Odos jautrinimas.

(4) Šio priedo B.42 skyrius. Vietinio limfmazgio bandymas

(5) Šio priedo B.50 skyrius. Odos jautrinimas: Vietinio limfmazgio bandymas. DA.

(6) Šio priedo B.51 skyrius: Odos jautrinimas: Vietinio limfmazgio bandymas. BrdU-ELISA

(7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367-485.

(8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332-343.

(9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97:417-427.

(10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Available at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

(11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

(12) Bauch *et al*. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. Regulatory Toxicology and Pharmacology 63: 489-504.

(13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. Toxicology *in vitro* 27:609 618.

(14) Ball *et al* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regulatory Toxicology and Pharmacology 60:389-400.

(15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64:625-639.

(16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.

(17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.

(18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Accessible at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_-labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

▼M7

(19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.

(20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Accessible at: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

(21) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

(22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Accessible at: www.fda.gov/downloads/-drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf - 138

(23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

▼M7

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo metodo taikymo charakteristikų matas ir vienas iš „tinkamumo“ aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „atitiktis“ tinkamų bandymo metodo rezultatų daliai išreikšti (21).

Nepalankios baigties kelias (angl. *Adverse Outcome Pathway*, AOP) – įvykių seka nuo tikslinės cheminės medžiagos ar panašių cheminių medžiagų grupių cheminės sandaros per molekulinio inicijavimo įvykį iki *in vivo* tiriamo rezultato (2).

Kalibravimo kreivė – bandant žinomą cheminę medžiagą gauto atsako vertės priklausomybė nuo analizinės koncentracijos (tai pat vadinama *etalonine kalibravimo kreive*).

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Variacijos koeficientas – kintamumo matas, apskaičiuojamas kartotinių ėminių duomenų grupei kaip standartinio nuokrypio ir vidurkio dalmuo. Jį galima padauginti iš 100, kad būtų išreikštas procentais.

Pavojus – būdingoji agento savybė arba situacija, galinti sukelti neigiamų padarinių, kai organizmą, sistemą ar populiaciją (arba jos dalį) veikia tas agentas.

Integruotasis bandymo ir vertinimo metodas (angl. *Integrated Approach to Testing and Assessment*, IATA) – struktūrinis metodas, taikomas cheminės medžiagos ar cheminių medžiagų grupės (galimam) pavojui identifikuoti, pavojui (veikimo gebai) apibūdinti ir (arba) saugai vertinti (galimo pavojaus ir (arba) veikimo gebos ir paveikimo), kurį taikant strategiškai apjungiami į vieną visumą ir įvertinami visi susiję duomenys, kad būtų galima pateikti informaciją reglamentavimo sprendimui priimti dėl galimo pavojaus ir (arba) rizikos, ir (arba) dėl būtinumo atlikti papildomą tikslinį, taigi minimalų bandymą.

Molekulinio inicijavimo įvykis – cheminės medžiagos sukelta biologinės sistemos triktis molekuliniu lygiu, kuri identifikuojama kaip nepalankios baigties kelio pradinis įvykis.

Mišinys – iš dviejų arba daugiau medžiagų sudarytas mišinys arba tirpalas, kuriame jos nereaguoja (1)

Vienkomponentė medžiaga – medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai vienas pagrindinis komponentas sudaro ne mažiau kaip 80 % (masės).

Daugiakomponentė medžiaga – medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai daugiau kaip vieno pagrindinio komponento koncentracija $\geq$ 10 % (masės) ir $<$ 80 % (masės). Daugiakomponentė medžiaga yra gamybos proceso rezultatas. Skirtumas tarp mišinio ir daugiakomponentės medžiagos yra tas, kad mišinys gaunamas sumaišant dvi medžiagas arba daugiau nevykstant cheminei reakcijai. Daugiakomponentė medžiaga yra cheminės reakcijos rezultatas.

Teigiamas kontrolinis ėminys – kartotinis ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus ir apdorotas chemine medžiaga, kuri yra žinoma kaip sukelianti teigiamą atsaką. Siekiant užtikrinti galimybę vertinti teigiamo kontrolinio ėminio atsako kintamumą per tam tikrą laiką, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus.

Pamatinis kontrolinis ėminys – visus bandymo sistemos komponentus, įskaitant tirpiklį ar nešiklį, turintis neapdorotas ėminys, kuris tiriamas kartu su bandomąja chemine medžiaga, apdorotais ėminiais ir kitais kontroliniais ėminiais, siekiant

▼M7

nustatyti atskaitos vertę ėminiams, apdorotiems bandomąja chemine medžiaga, ištirpinta tame pačiame tirpiklyje ar nešiklyje. Kai bandomas kartu su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu, šis ėminys taip pat parodo, ar vyksta tirpiklio arba nešiklio sąveika su bandymo sistema.

Tinkamumas – santykio tarp bandymo ir tiriamo poveikio bei bandymo reikšmingumo bei naudingumo siekiant tam tikro tikslo apibūdinimas. Tai yra atliekant bandymą tiriamo biologinio poveikio matavimo ar prognozavimo tikslumo laipsnis. Tinkamumas aprėpia bandymų metodo tikslumo (atitikties) aspektą (21).

Patikimumas – pagal tą patį protokolą atliekamo bandymų metodo, tam tikrą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų, atkuriamumo laipsnio matas. Jis įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų ir pakartojamumą laboratorijoje (21).

Atkuriamumas – rezultatų, gautų pagal vienodą bandymų protokolą bandant tą pačią cheminę medžiagą, sutapimas (žr. *patikimumas*) (21).

Jautris – visų teigiamų ar veikliųjų cheminių medžiagų, kurios buvo tiksliai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymų metodo, kuriuo gaunami kategorijos nustatymo rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymų metodo tinkamumą (21).

Specifiškumas – visų neigiamų ar neveikliųjų cheminių medžiagų, kurios buvo tiksliai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymų metodo, kuriuo gaunami kategorijos nustatymo rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymų metodo tinkamumą (21).

Medžiaga – gamtoje randami arba gamybos procese gaunami cheminiai elementai ir jų junginiai, įskaitant visus priedus, kurių reikia produkto stabilumui užtikrinti, ir visas priemaišas, patenkančias į produktą taikomo proceso metu, tačiau neįskaitant tirpiklio, kurį galima atskirti, nepaveikiant medžiagos stabilumo ar nekeičiant jos sudėties (1).

Sistemos tinkamumas – prietaiso eksploatacinių charakteristikų (pvz., jautrio) nustatymas analizuojant pamatinį etaloną prieš atliekant ėminių partijos analizę (22).

Bandomoji cheminė medžiaga – terminas *bandomoji cheminė medžiaga* vartojamas bandomam dalykui nurodyti.

Jungtinių Tautų visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema (JT GHS)– sistema, kurioje pateikiamas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimas pagal standartizuotus fizikinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir nagrinėjami atitinkami informaciniai elementai, pvz., piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų galima informuoti apie medžiagų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbuotojus, darbininkus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likvidatorius) ir aplinką (1).

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

Patvirtinto tinkamumo bandymų metodas – bandymų metodas, kurio tinkamumo ir patikimumo pakanka tam tikram tikslui pasiekti ir kuriam taikomi moksliškai pagrįsti principai. Bandymų metodas niekuomet nėra visiškai tinkamas absoliučiąja prasme, bet tik tam tikro tikslo atžvilgiu (21).

▼M7

2 priedėlis

KVALIFIKACIJAI TIKRINTI SKIRTOS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

Odos jautrinimas *in chemico*. Tiesioginio peptidų reaktyvumo tyrimas

Prieš pradėdamos įprastiniu būdu taikyti šį bandymų metodą, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, pateikdamos tikslią DPRA prognozę, tam naudodamos 10 cheminių medžiagų, kurios rekomenduojamos 1 lentelėje, siekiant nustatyti kiekvienam peptidui cisteino ir lizino kiekio sumažėjimo vertes, kurios patektų į atitinkamą 8 iš 10 kvalifikacijos tikrinimui panaudotų etaloninių medžiagų nurodytą intervalą. Šios kvalifikacijai tikrinti skirtos etaloninės medžiagos buvo pasirinktos taip, kad atitiktų odos jautrinimo pavojaus intervalą. Kiti atrankos kriterijai buvo galimybė pirkti chemines medžiagas ir tai, ar yra aukštos kokybės *in vivo* etaloniniai duomenys bei aukštos kokybės *in vitro* DPRA bandymų metodo duomenys ir ar jie buvo naudojami atliekant EURL ECVAM koordinuotą tinkamumo patvirtinimo tyrimą, siekiant įrodyti sėkmingą bandymų metodo įdiegimą tyrime dalyvaujančiose laboratorijose.

1 lentelė

Rekomenduojamos kvalifikacijai tikrinti skirtos cheminės medžiagos laboratorijos techninei kvalifikacijai įrodyti atliekant tiesioginio peptidų reaktyvumo tyrimą

Kvalifikacijai tikrinti skirtos cheminės medžiagos	CAS Nr.	Agregatinė būsena	Prognozė *in vivo* [1]	DPRA prognozė [2]	Cisteino peptido kiekio sumažėjimo, %, intervalas [3]	Lizino peptido kiekio sumažėjimo, %, intervalas [3]
2,4-dinitrochlorbenzenas	97-00-7	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (ypač stipriai)	Teigiama	90–100	15–45
Oksazolonas	15646-46-5	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (ypač stipriai)	Teigiama	60–80	10–55
Formaldehidas	50-00-0	Skystis	Jautrinanti medžiaga (stipriai)	Teigiama	30–60	0–24
Benzilidenacetonas	122-57-6	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (vidutinio stiprumo)	Teigiama	80–100	0–7
Farnezalis	19317-11-4	Skystis	Jautrinanti medžiaga (silpnai)	Teigiama	15–55	0–25
2,3-butandionas	431-03-8	Skystis	Jautrinanti medžiaga (silpnai)	Teigiama	60–100	10–45
1-butanolis	71-36-3	Skystis	Nejautrinanti medžiaga	Neigiama	0–7	0–5,5
6-metilkumarinas	92-48-8	Kietoji medžiaga	Nejautrinanti medžiaga	Neigiama	0–7	0–5,5
Pieno rūgštis	50-21-5	Skystis	Nejautrinanti medžiaga	Neigiama	0–7	0–5,5
4-metoksiacetofenonas	100-06-1	Kietoji medžiaga	Nejautrinanti medžiaga	Neigiama	0–7	0–5,5

([1]) Pavojaus (ir veikimo gebos) prognozės *in vivo* yra pagrįstos LLNA duomenimis (19). Veikimo geba *in vivo* gauta taikant ECETOC pasiūlytus kriterijus (23).

([2]) Į DPRA prognozę reikėtų žiūrėti kaip į IATA sistemos dalį ir atsižvelgti į 9 bei 11 pastraipų nuostatas.

([3]) Intervalai nustatyti pagal ne mažiau kaip 10 kiekio sumažėjimo verčių, gautų 6 nepriklausomose laboratorijose.

▼M7

3 priedėlis

ANALIZĖS SEKOS PAVYZDŽIAI

Kalibravimo etalonai ir etaloniniai kontroliniai ėminiai	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Skiesti naudotas buferinis tirpalas Etaloninis kontrolinis ėminys A, 1 kartotinis ėminys Etaloninis kontrolinis ėminys A, 2 kartotinis ėminys Etaloninis kontrolinis ėminys A, 3 kartotinis ėminys
Koeliuavimo kontroliniai ėminiai	1-osios bandomosios cheminės medžiagos 1 koeliuavimo kontrolinis ėminys 2-osios bandomosios cheminės medžiagos 2 koeliuavimo kontrolinis ėminys
Etaloniniai kontroliniai ėminiai	Etaloninis kontrolinis ėminys B, 1 kartotinis ėminys Etaloninis kontrolinis ėminys B, 2 kartotinis ėminys Etaloninis kontrolinis ėminys B, 3 kartotinis ėminys
Pirmasis kartotinių ėminių rinkinys	Etaloninis kontrolinis ėminys C, 1 kartotinis ėminys Cinamono aldehidas, 1 kartotinis ėminys 1ėminys, 1 kartotinis ėminys 2 ėminys, 1 kartotinis ėminys
Antrasis kartotinių ėminių rinkinys	Etaloninis kontrolinis ėminys C, 2 kartotinis ėminys Cinamono aldehidas, 2 kartotinis ėminys 1ėminys, 2 kartotinis ėminys 2 ėminys, 2 kartotinis ėminys
Trečiasis kartotinių ėminių rinkinys	Etaloninis kontrolinis ėminys C, 3 kartotinis ėminys Cinamono aldehidas, 3 kartotinis ėminys 1ėminys, 3 kartotinis ėminys 2 ėminys, 3 kartotinis ėminys
Etaloniniai kontroliniai ėminiai	Etaloninis kontrolinis ėminys B, 4 kartotinis ėminys Etaloninis kontrolinis ėminys B, 5 kartotinis ėminys Etaloninis kontrolinis ėminys B, 6 kartotinis ėminys

Į kiekvieną analizės seką turėtų būti įtraukti trys etaloninių kontrolinių ėminių rinkiniai (t. y. ėminiai, kuriuos sudaro vien tik peptidas, ištirpintas tinkamame tirpiklyje):
etaloninis kontrolinis ėminys A naudojamas HPLC sistemos tinkamumui tikrinti;
etaloninis kontrolinis ėminys B įtraukiamas į analizės seką jos pradžioje ir pabaigoje, kad būtų galima patikrinti etaloninių kontrolinių ėminių stabilumą visą analizės trukmę;
etaloninis kontrolinis ėminys C įtraukiamas į analizės seką, kad būtų galima patikrinti, ar bandomajai cheminei medžiagai ištirpinti naudojamas tirpiklis nedaro įtakos procentinio peptidų kiekio sumažėjimui.

▼M7

B.60. ODOS JAUTRINIMAS IN VITRO. ARE-NRF2 LIUCIFERAZĖS BANDYMŲ METODAS

ĮVADAS

Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) 442D (2015). Odą jautrinančia medžiaga vadinama medžiaga, kuri susilietusi su oda sukelia alerginį atsaką, kaip apibrėžta Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemoje (GHS) (1) ir Europos Sąjungos Reglamente (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo (CLP) ([1]). Šiame bandymų metode pateikiama procedūra *in vitro* (ARE-Nrf2 liuciferazės bandymas), kuri turi būti taikoma, kad būtų galima nustatyti skirtumą tarp odą jautrinančių medžiagų ir odos nejautrinančių medžiagų pagal JT GHS (1) ir CLP.

Yra bendrasis susitarimas dėl pagrindinių biologinių reiškinių, kurie pagrįstų odos jautrinimą. Turimos žinios apie cheminius ir biologinius mechanizmus, susijusius su odos jautrinimu, buvo apibendrintos kaip nepalankios baigties kelias (angl. *Adverse Outcome Pathway*, AOP) (2) nuo molekulinio inicijavimo įvykio per tarpinius įvykius iki neigiamo poveikio sveikatai, t. y. žmonių alerginio kontaktinio dermatito arba graužikų kontaktinio hiperjautrumo (2) (3). Molekulinio inicijavimo įvykis yra kovalentinio ryšio atsiradimas tarp elektrofilinių medžiagų ir odos baltymų nukleofilinių centrų. Antrasis pagrindinis šio AOP įvykis vyksta keratinocituose ir aprėpia uždegiminius atsakus, taip pat genų ekspresiją, susijusią su specifiniais ląstelių signalizacijos keliais, pvz., nuo antioksidacinio ar elektrofilinio atsako elemento (ARE) priklausomais keliais. Trečiasis pagrindinis įvykis – dendritinių ląstelių aktyvinimas, paprastai įvertinamas kaip specifinių ląstelių paviršinių žymeklių, chemokinų ir citokinų, ekspresija. Ketvirtasis pagrindinis įvykis – yra T ląstelių proliferacija, kuri netiesiogiai vertinama atliekant pelių vietinių limfmazgių bandymą (4).

Odos jautrinimas paprastai buvo įvertinamas naudojant laboratorinius gyvūnus. Klasikiniai metodai, atliekant bandymus su jūrų kiaulytėmis, yra *Magnussono Kligmano* jūrų kiaulyčių maksimizavimo bandymas (GMPT) ir *Buehlerio* bandymas (TM B.6 (5)), kurie tiria odos jautrinimo indukcijos ir atsako sukėlimo tarpsnius. Bandymas su pelėmis, vietinių limfmazgių bandymas (LLNA, TM B.42 (4)) ir jo dvi modifikacijos nenaudojant radioaktyviųjų medžiagų, LLNA: DA (TM B.50 (6)) ir LLNA: BrdU-IFA (TM B.51 (7)), kurie visi vertina tik atsaką į indukciją, taip pat buvo priimti, nes jų privalumai palyginti su bandymais naudojant kiaulytes – gyvūnų gerovė ir odos jautrinimo indukcijos tarpsnio objektyvus matavimas.

Vėliau *in chemico* ir *in vitro* mechanizmų tyrimais pagrįsti bandymų metodai buvo patvirtinti kaip moksliniu požiūriu tinkami metodai cheminių medžiagų keliamam odos jautrinimo pavojui vertinti. Tačiau bandymų nenaudojant gyvūnų metodų deriniai (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*), kaip integruotųjų bandymo ir vertinimo metodų (IATA) dalis, turės visiškai pakeisti šiuo metu atliekamus bandymus su gyvūnais, atsižvelgiant į kiekvieno iš dabar turimų bandymų be gyvūnų metodų apribojimus, susijusius su AOP mechanizmų aprėptimi (2) (3).

Šis bandymų metodas (ARE-Nrf2 liuciferazės bandymas) siūlomas antrajam įvykiui tirti, kaip paaiškinta 2 pastraipoje. Buvo pranešimų, kad odą jautrinančios medžiagos indukuoja genus, kuriuos reguliuoja antioksidacinis atsako elementas (ARE) (8) (9). Mažos molekulinės masės elektrofilinės medžiagos, pvz., odą

([1]) 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353, 2008 12 31.

▼M7

jautrinančios medžiagos gali veikti receptorinį baltymą Keap1 (angl. *Kelch-like ECH-associated protein 1*), pvz., kovalentiškai modifikuodamos jo cisteino liekaną, dėl ko jis atsiskiria nuo transkripcijos faktoriaus Nrf2 (angl. *nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*). Atsiskyręs Nrf2 gali aktyvinti nuo ARE priklausomus genus, pvz., kurie koduoja II fazės detoksikuojančius fermentus (8) (10) (11).

Šiuo metu pagal šį bandymų metodą atliekamas *in vitro* ARE-Nrf2 liuciferazės bandymas yra tik KeratinoSens™ bandymas, kurio tinkamumo patvirtinimo tyrimai buvo baigti (9) (12) (13) ir jo nepriklausomą ekspertizę atliko Europos Sąjungos bandymų su gyvūnais alternatyvų etaloninė laboratorija (angl. *European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing*, EURL ECVAM) (14). KeratinoSens™ bandymas buvo laikomas moksliškai pagrįstu, kad galėtų būti naudojamas kaip IATA dalis, kad būtų galima patvirtinti skirtumą tarp odą jautrinančių medžiagų ir odos nejautrinančių medžiagų pavojams klasifikuoti ir ženklinti (14). Laboratorijos, kurios norėtų įdiegti bandymų metodą, gali gauti rekombinantinių ląstelių liniją, naudojamą atliekant KeratinoSens™ bandymą, sudarydamos licencinę sutartį su bandymų metodo kūrėju (15).

Apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI, TAIKOMUMAS IR APRIBOJIMAI

Kadangi Keap1-Nrf2-ARE kelio aktyvinimu tiriamas tik antrasis odos jautrinimo AOP atvejis, neatrodo, kad vien šios informacijos, gautos taikant šio kelio aktyvinimu pagrįstus bandymų metodus pakaktų ją naudojant išvadai apie cheminės medžiagos odos jautrinimo gebą gauti. Todėl į duomenis, gautus taikant šį bandymų metodą, reikėtų žiūrėti kaip į integruotųjų metodų, pvz., IATA, dalį, juos derinant su kita papildančia informacija, pvz., gauta atliekant *in vitro* bandymus, kurie nagrinėja kitus svarbius odos jautrinimo AOP įvykius, taip pat taikant ne bandymų metodus, įskaitant kryžmines nuorodas į cheminius analogus. ARE-Nrf2 liuciferazės bandymų metodo taikymo kartu su kita informacija pavyzdžiai pateikti literatūroje (13) (16) (17) (18) (19).

Šis bandymų metodas gali būti taikomas kaip IATA dalis, kad būtų galima patvirtinti skirtumą tarp odą jautrinančių medžiagų (t. y. JT GHS ar CLP 1 kategorijos) ir odos nejautrinančių medžiagų. Šis bandymų metodas negali būti taikomas atskirai odą jautrinančioms medžiagoms priskirti 1A ir 1B subkategorijoms, kaip apibrėžta JT GHS ar CLP, arba prognozuoti jų jautrinimo gebą priimant saugos vertinimo sprendimus. Tačiau teigiamas rezultatas priklausomai nuo reglamentavimo sistemos gali būti naudojamas atskirai, kad cheminė medžiaga galėtų būti priskirta JT GHS ar CLP 1 kategorijai.

Atsižvelgiant į tinkamumo patvirtinimo tyrime gautą duomenų rinkinį ir į duomenis, gautus atliekant vidinę bandymo metodo nepriklausomą ekspertizę, buvo patvirtinta, kad KeratinoSens™ bandymų metodą galima pritaikyti laboratorijose, kurios turi darbo su ląstelių kultūromis patirties. Taikant metodą tikėtinas prognozių laboratorinio ir tarplaboratorinio atkuriamumo lygis yra 85 % eilės (14). Su LLNA palyginti KeratinoSens™ bandymo tikslumo (77 % – 155/201), jautrio (78 % – 71/91) ir specifiškumo (76 % – 84/110) rezultatai, atskiriant odą jautrinančias medžiagas (t. y. JT GHS ar CLP 1 kategorijos) ir nejautrinančias medžiagas, buvo apskaičiuoti atsižvelgiant į visus duomenis, pateiktus EURL ECVAM bandymo metodui įvertinti ir ekspertizei atlikti (14). Šie skaičiai yra panašūs į neseniai paskelbtus skaičius, pagrįstus maždaug 145

▼M7

medžiagų bandymais laboratorijos viduje (tikslumas – 77 %, jautris – 79 %, specifiškumas – 72 %) (13). Labiau tikėtina, kad *KeratinoSens*™ sumažintų prognozę dėl cheminių medžiagų, kurios rodo mažą ar vidutinę odos jautrinimo gebą (t. y. JT GHS ar CLP 1B subkategorijos), nei dėl cheminių medžiagų, kurios rodo didelę odos jautrinimo gebą (t. y. JT GHS ar CLP 1A subkategorijos) (13) (14). Kartu paimta ši informacija rodo *KeratinoSens*™ bandymo naudą prisidedant prie odos jautrinimo pavojaus identifikavimo. Tačiau čia pateiktos *KeratinoSens*™, kaip atskirai taikomo bandymų metodo, tikslumo vertės yra tik orientacinės, kadangi bandymų metodo duomenis reikėtų nagrinėti kartu su kitais informacijos šaltiniais kaip IATA dalimis ir atsižvelgiant į 9 pastraipos nuostatas. Be to, įvertinant odos jautrinimo metodus, kurie nenaudoja gyvūnų, reikėtų turėti omenyje, kad LLNA bandymas, kaip ir kiti bandymai su gyvūnais, gali nevisiškai atitikti situaciją, susijusią su tiriamąja rūšimi, t. y. žmonėmis.

Šiame bandymų metode vartojamas terminas *bandomoji cheminė medžiaga* reiškia tai, kas yra bandoma, ir nėra susijęs su ARE-Nrf2 liuciferazės bandymo metodo tinkamumu bandyti chemines medžiagas ir (arba) mišinius. Atsižvelgiant į šiuo metu turimų duomenų visumą, buvo įrodyta, kad *KeratinoSens*™ bandymas tinka bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios aprėpia įvairias organines funkcines grupes, reakcijų mechanizmus, odos jautrinimo gebą (nustatyta atliekant *in vivo* tyrimus) ir fizikines chemines medžiagų savybes (9) (12) (13) (14). Daugiausia buvo bandomos vienkomponentės medžiagos, nors yra šiek tiek duomenų apie mišinių bandymus (20). Badymų metodas vis dėlto laikomas techniškai tinkamu bandyti daugiakomponentes medžiagas ir žinomos sudėties mišinius. Tačiau, prieš taikant bandymų metodą mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, tai dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį. Be to, bandant daugiakomponentes medžiagas ar mišinius, reikėtų atsižvelgti į citotoksinių sudedamųjų dalių galimus trikdžius, keliamus stebimiems atsakams. Bandymų metodas taikomas tirpioms bandomosioms cheminėms medžiagoms arba jų stabilioms dispersijoms (t. y. koloidams ar suspensijoms, iš kurių bandomoji cheminė medžiaga neiškrenta į nuosėdas ar nesudaro su tirpikliu skirtingų fazių) vandenyje arba DMSO (įskaitant visus bandomosios cheminės medžiagos komponentus, jei bandoma daugiakomponentė medžiaga ar mišinys). Bandomosios cheminės medžiagos, kurios neatitinka šių sąlygų, būdamos reikiamos didžiausios galutinės koncentracijos 2 000 μmol/l (*žr.* 22 pastraipą), vis tiek gali būti bandomos mažesnės koncentracijos. Tokiu atveju rezultatai, kurie atitinka teigiamo atsako kriterijus, aprašytus 39 pastraipoje, vis tiek galėtų būti naudojami bandomosios cheminės medžiagos, kaip odą jautrinančios medžiagos, identifikavimui patvirtinti, bet neigiamą rezultatą, gautą esant < 1 000 μmol/l koncentracijai, reikėtų laikyti negalutiniu (žr. 39 pastraipoje pateiktą prognozavimo modelį). Paprastai tų medžiagų, kurių logP yra ne didesnis kaip 5, bandymas buvo sėkmingas, o ypač hidrofobinės medžiagos, kurių logP didesnis kaip 7, nepatenka į žinomą metodo taikymo sritį (14). Apie medžiagas, kurių logP yra nuo 5 iki 7, turima tik ribota informacija.

Neigiamus rezultatus reikėtų aiškinti atsargiai, nes, taikant bandymų metodą, kaip neigiamos gali būti aptiktos medžiagos, kurios rodo ypač didelį reaktyvumą lizino liekanų atžvilgiu. Be to, dėl ribotos naudojamos ląstelių linijos metabolinės gebos (21) ir dėl bandymo sąlygų prohaptenai (t. y. cheminės medžiagos, kurias būtina aktyvinti fermentais, pvz., P450 fermentais) ir prehaptenai (t. y. cheminės medžiagos, kurios aktyvinamos autooksidacija), ypač esant mažam oksidacijos greičiui, taip pat gali duoti neigiamus rezultatus. Kita vertus, klaidingai teigiami rezultatai gali būti gauti bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios neveikia kaip jautrinančios, bet yra stresą sukeliantys cheminiai veiksniai (14). Be to, neįmanoma visuomet patikimai įvertinti ypač didelio citotoksiškumo bandomąsias chemines medžiagas. Pagaliau, bandomosios cheminės medžiagos, kurios

▼M7

kelia trukdžius liuciferazės fermentui, gali iškreipti jos aktyvumą atliekant bandymus su ląstelėmis, sukeldamos akivaizdų slopinimą arba padidėjusią liuminescenciją (22). Pavyzdžiui, buvo pranešta, kad fitoestrogenai, būdami didesnės kaip 1 μmol/l koncentracijos, trikdo liuminescencijos signalus, kai atliekami kiti liuciferazės reporterinių genų bandymai dėl per didelio liuciferazės reporterinio geno aktyvinimo (23). Dėl to liuciferazės ekspresiją reikia tirti atidžiai, kai ji gaunama esant didelei koncentracijai fitoestrogenų ar panašių cheminių medžiagų, kurios, kaip manoma, sukelia fitoestrogenams būdingą per didelį liuciferazės reporterinio geno aktyvinimą (23). Tais atvejais, kai galima pateikti įrodymų dėl bandymų metodo netinkamumo kitų specifinių kategorijų cheminėms medžiagoms, toms specifinių kategorijų cheminėms medžiagoms bandymų metodo nereikėtų taikyti.

Be to, kad patvirtinamas skirtumas tarp odą jautrinančių medžiagų ir nejautrinančių medžiagų, atliekant *KeratinoSens*™ bandymą, taip pat gaunama informacijos apie koncentracijos ir atsako priklausomybę, ir ši informacija galėtų papildyti jautrinimo gebos vertinimą, kai bandymas naudojamas kaip integruotųjų metodų, pvz., IATA, dalis (19). Tačiau būtinas papildomas darbas, pageidautina pagrįstas gautais patikimais duomenimis apie žmones, kad būtų galima nustatyti, kaip *KeratinoSens*™ bandymo rezultatai gali prisidėti prie veikimo gebos vertinimo (24) ir jautrinančių medžiagų skirstymo į subkategorijas pagal JT GHS ar CLP.

BANDYMO PRINCIPAS

ARE-Nrf2 liuciferazės bandymų metode naudojama imortalizuotų adhezinių ląstelių linija, gauta iš HaCaT žmogaus keratinocitų, stabiliu būdu atlikus transfekciją pasirinkta plazmide. Ląstelių linija turi liuciferazės geną, kurio transkripcinę kontrolę atlieka konstitutyvinis promotorius, sujungtas su geno ARE elementu, apie kurį yra žinoma, kad jo aktyvumą gali skatinti odą jautrinančios medžiagos (25) (26). Liuciferazės signalas rodo nuo Nrf2 priklausančių endogeninių genų aktyvinimą odą jautrinančiomis medžiagomis, ir ši rekombinantinių ląstelių linijos liuciferazės signalo priklausomybė nuo Nrf2 buvo įrodyta (27). Todėl, naudojant gerai ištirtus liuminescenciją sukeliančius liuciferazės substratus, galima kiekybiškai matuoti (aptikti liuminescenciją) elektrofilinėmis medžiagomis apdorotų ląstelių liuciferazės geno indukciją, kaip Nrf2 transkripcijos faktoriaus aktyvumo rodiklį.

Atliekant *KeratinoSens*™ bandymą, laikoma, kad bandomųjų cheminių medžiagų atsakas yra teigiamas, jei jos sukelia statistiškai reikšmingą liuciferazės aktyvumo indukciją, kuri būtų didesnė už tam tikrą ribinę vertę (t. y. padidėtų > 1,5 karto arba 50 %), esant koncentracijai, kuri būtų mažesnė nei tam tikra koncentracija, kuri nedaro reikšmingos įtakos ląstelių gyvybingumui (t. y. mažesnei kaip 1 000 μmol/l ir kuriai esant ląstelių gyvybingumas būtų didesnis kaip 70 % (9) (12)). Šiuo tikslu nustatomas maksimalus liuciferazės aktyvumo indukcijos padidėjimas kartais (I_{max}) palyginti su tirpiklio (neigiamu) kontroliniu ėminiu. Be to, kadangi ląstelės apdorojamos bandomosiomis cheminėmis medžiagomis, imant koncentracijos verčių seriją, koncentraciją, kuri sukeltų didesnę nei ribinė (t. y. $EC_{1,5}$ vertės) statistiškai reikšmingą liuciferazės aktyvumo indukciją, reikėtų interpoliuoti pagal dozės ir atsako priklausomybės kreivę (skaičiavimai pateikti 32 pastraipoje). Galiausiai reikėtų atlikti vienalaikius citotoksiškumo matavimus, siekiant įvertinti, ar liuciferazės aktyvumo indukcija vyksta esant mažesnėms nei citotoksinės koncentracijos vertėms.

Prieš pradėdamos taikyti ARE-Nrf2 liuciferazės bandymų metodą nuolatiniam naudojimui, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, naudodamos dešimt kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų, išvardytų 2 priedėlyje.

Galima gauti naudojimo charakteristikų standartus (28), kurie padėtų patvirtinti naujus arba modifikuotus į KeratinoSens™ bandymą panašius *in vitro* ARE-Nrf2 liuciferazės bandymų metodus, kad būtų galima laiku iš dalies pakeisti šį bandymų metodą ir juos įtraukti į bandymų gaires. Savitarpis duomenų pripažinimas (angl. *Mutual Acceptance of Data*, MAD) pagal EBPO susitarimą bus užtikrintas tik bandymų metodams, kurių tinkamumas būtų patvirtintas atsižvelgiant į naudojimo charakteristikų standartus, jei būtų atlikta šių bandymų metodų ekspertizė ir EBPO juos įtrauktų į atitinkamas bandymų gaires.

▼M7

PROCEDŪRA

Šiuo metu į šį bandymų metodą yra įtrauktas tik vienas moksliškai pagrįstas KeratinoSens™ bandymas (9) (12) (13) (14). Galima gauti keratinoSens™ bandymo standartines veiklos procedūras (angl. *Standard Operating Procedures*, SOP), kurias reikėtų naudoti, įdiegiant ir taikant šį bandymų metodą laboratorijoje (15). Laboratorijos, kurios norėtų įdiegti bandymų metodą, gali gauti rekombinantinių ląstelių liniją, naudojamą atliekant KeratinoSens™ bandymą, sudarydamos licencinę sutartį su bandymų metodo kūrėju. Tolesnėse pastraipose pateikiamas ARE-Nrf2 liuciferazės bandymų metodo pagrindinių komponentų ir procedūrų aprašymas.

Keratinocitų kultūrų paruošimas

Reikėtų naudoti transgeninių ląstelių liniją, turinčią stabilų liuciferazės reporterinio geno intarpą, kontroliuojamą ARE elemento (pvz., *KeratinoSens*™ ląstelių linija). Gautos ląstelės dauginamos (pvz., nuo 2 iki 4 sėjimų) ir laikomos užšaldytos kaip vienalytė pradinė kultūra. Šios pradinės kultūros ląstelės gali būti dauginamos iki maksimalaus sėjimų skaičiaus (t. y. 25 sėjimų *KeratinoSens*™ atveju) ir naudojamos nuolatiniams bandymams, jas imant iš reikiamos maitinimo terpės (*KeratinoSens*™ atveju tai yra DMEM, turinti serumo ir geneticino).

Bandomos ląstelės turėtų būti 80–90 % susiliejusios ir reikėtų imtis priemonių užtikrinti, kad ląstelės niekuomet neaugtų iki visiško susiliejimo. Vieną dieną prieš bandymą ląstelės yra surenkamos ir paskirstomos į 96 duobučių plokšteles (10 000 ląstelių vienai duobutei *KeratinoSens*™ atveju). Reikėtų žiūrėti, kad sėjant nebūtų ląstelių nusėdimo, ir taip užtikrinti tolygų ląstelių skaičiaus pasiskirstymą tarp duobučių. Jei taip nėra, dėl šio veiksmo gali atsirasti didelis kintamumas tarp duobučių. Kiekvienam kartotiniam liuciferazės aktyvumo matavimų veiksmui naudojami trys kartotiniai ėminiai ir vienas analogiškas ląstelių gyvybingumo bandymo ėminys.

Bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinių cheminių medžiagų paruošimas

Bandomoji cheminė medžiaga ir kontrolinės cheminės medžiagos ruošiamos bandymo dieną. Atliekant *KeratinoSens*™ bandymą, bandomosios cheminės medžiagos ištirpinamos dimetilsulfokside (DMSO) galutinei reikiamai koncentracijai gauti (pvz., 200 mmol/l). Galima laikyti, kad DMSO tirpalai yra sterilūs savaime, todėl sterilus filtravimas nebūtinas. DMSO netirpios bandomosios cheminės medžiagos ištirpinamos steriliame vandenyje ar kultūros terpėje ir tirpalai sterilizuojami, pvz., filtruojant. Jei bandomoji cheminė medžiaga neturi nustatytos molekulinės masės, *KeratinoSens*™ bandymui atlikti ruošiamas numatytosios koncentracijos pradinis tirpalas (40 mg/ml arba 4 % (m/V)). Jei vietoj DMSO, vandens ar kultūros terpės naudojami kiti tirpikliai, tai reikėtų tinkamai moksliškai pagrįsti.

Iš pradinių bandomosios cheminės medžiagos tirpalų ruošiama praskiestų tirpalų serija, tirpikliu naudojant DMSO, kad būtų gauta 12 pagrindinių bandomų cheminės medžiagos koncentracijos verčių (nuo 0,098 iki 200 mmol/l *KeratinoSens*™ bandyme). Jei bandomoji cheminė medžiaga netirpsta DMSO, praskiesti tirpalai pagrindinėms koncentracijos vertėms gauti ruošiami naudojant sterilų vandenį ar sterilią kultūros terpę. Neatsižvelgiant į naudojamą tirpiklį, pagrindinių koncentracijos verčių tirpalai papildomai skiedžiami 25 kartus serumo turinčia kultūros terpe ir galiausiai dar kartą praskiesti 4 kartus naudojami apdorojimui, taigi *KeratinoSens*™ bandymo bandomosios cheminės medžiagos galutinių koncentracijos verčių intervalas yra nuo 0,98 iki 2 000 μmol/l. Galima naudoti alternatyvias koncentracijos vertes, jei jos būtų pagrįstos (pvz., dėl citotoksiškumo ar blogo tirpumo).

Neigiamas (tirpiklio) kontrolinis ėminys, naudojamas *KeratinoSens*™ bandyme, yra DMSO (CAS Nr. 67-68-5, ≥ 99 % grynumo), kiekvienoje plokštelėje paruošiant šešias jo duobutes. Jis skiedžiamas vienodai su pagrindinių koncentracijos verčių tirpalais, kaip aprašyta 22 pastraipoje, todėl neigiamo (tirpiklio) kontrolinio ėminio galutinė DMSO koncentracija yra 1 %, nes, kaip žinoma, tokios

▼M7

koncentracijos DMSO nedaro įtakos ląstelių gyvybingumui, ir ji atitinka bandomosios cheminės medžiagos ir teigiamo kontrolinio ėminio DMSO koncentraciją. Jei bandomoji cheminė medžiaga netirpsta DMSO ir buvo skiedžiama vandeniu, DMSO koncentracija visose duobutėse su galutiniu bandymo tirpalu turi būti nustatyta lygi 1 %, kaip kitų bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių cheminių medžiagų.

Teigiama kontrolinė medžiaga, naudojama atliekant *KeratinoSens*™ bandymą, yra cinamono aldehidas (CAS Nr. 14371-10-9, ≥ 98 % grynumo), iš kurio, skiedžiant DMSO, ruošiama 5 pagrindinių koncentracijos verčių nuo 0,4 iki 6,4 mmol/l tirpalų serija (iš 6,4 mmol/l pradinio tirpalo) ir tirpalai toliau skiedžiami, kaip aprašyta 22 pastraipoje dėl pagrindinių koncentracijos verčių, taigi galutinė teigiamo kontrolinio ėminio koncentracija yra nuo 4 iki 64 μmol/l. Galima naudoti kitas teigiamas kontrolines medžiagas, pageidautina tas, kurioms $EC_{1,5}$ vertė būtų gaunama per intervalo vidurį, jei yra istorinių duomenų palyginamiems bandymų priėmimo kriterijams gauti.

Bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinių cheminių medžiagų įterpimas

Reikia atlikti vieną kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos ir teigiamos kontrolinės cheminės medžiagos bandymą, kurį sudarytų ne mažiau kaip du nepriklausomi kartotiniai trijų kartotinių ėminių bandymai (t. y. $n = 6$) kad būtų gauta prognozė (teigiama ar neigiama). Jei nepriklausomų kartotinių bandymų rezultatai būtų prieštaraujantys, reikėtų atlikti trečiąjį kartotinį bandymą naudojant tris kartotinius ėminius (t. y. $n = 9$). Kiekvienas nepriklausomas kartotinis bandymas atliekamas ne tą pačią dieną, naudojant naują bandomosios cheminės medžiagos pradinį tirpalą ir nepriklausomai surinktas ląsteles. Tačiau ląstelės gali būti to paties sėjimo.

Pasėtos, kaip aprašyta 20 pastraipoje, ląstelės 24 h auginamos 96 duobučių mikrotitravimo plokštelėse. Tada terpė pašalinama ir pakeičiama nauja kultūros terpe (150 μl kultūros terpės, turinčios serumo, bet be geneticino *KeratinoSens*™ atveju), į kurią įlašinama 50 μl 25 kartus praskiestos bandomosios cheminės medžiagos ir kontrolinių cheminių medžiagų. Bent vieną plokštelės duobutę reikėtų palikti tuščią (be ląstelių ir be apdorojimo), kad būtų įvertintos foninės vertės.

Atliekant *KeratinoSens*™ bandymą, apdorotos plokštelės inkubuojamos maždaug 48 h 37 ± 1 °C temperatūroje, esant 5 % CO_2. Reikėtų imtis priemonių lakiųjų bandomųjų cheminių medžiagų nuostoliams ir kryžminei bandomųjų cheminių medžiagų taršai tarp duobučių išvengti, pvz., uždengiant plokšteles folija prieš inkubavimą su bandomąja chemine medžiaga.

Liuciferazės aktyvumo matavimai

Trys veiksniai yra labai svarbūs, kad būtų galima užtikrinti reikiamus liuminescencijos rodmenis:

— jautraus liuminometro parinkimas,

— plokštelių, kurių aukščio pakaktų šviesos kryžminei taršai išvengti, naudojimas ir

— pakankamos šviesos išeigos liuciferazės substrato naudojimas, kad būtų užtikrintas pakankamas jautris ir mažas kintamumas.

Prieš bandymą reikėtų atlikti kontrolinį bandymą pagal 3 priedėlyje aprašytą procedūrą, kad būtų galima įsitikinti, ar šie trys reikalavimai yra įvykdyti.

Po 48 h trukmės apdorojimo bandomąja chemine medžiaga ir kontrolinėmis cheminėmis medžiagomis, atliekant *KeratinoSens*™ bandymą, ląstelės plaunamos fiziologiniu tirpalu fosfatiniame buferiniame tirpale ir atitinkamu lizės buferiniu tirpalu, įlašinamu į kiekvieną duobutę 20 min kambario temperatūroje, liuminescencijos rodmenims gauti.

▼M7

Plokštelės su ląstelių lizatu dedamos į liuminometrą rodmenims gauti, kuris atliekant *KeratinoSens*™ bandymą yra suprogramuotas: i) įlašinti liuciferazės substrato į kiekvieną duobutę (t. y. 50 µl), ii) palaukti 1 s ir iii) integratuoti liuciferazės aktyvumą 2 s laikotarpiu. Jei naudojami alternatyvūs nuostačiai, pvz., atsižvelgiant į naudojamo liuminometro modelį, juos reikėtų pagrįsti. Be to, galima naudoti švytinti substratą, jei sėkmingai atliekamas 3 priedėlyje aprašytas kokybės kontrolės bandymas.

Citotoksiškumo vertinimas

Kad būtų galima atlikti KeratinoSens™ ląstelių gyvybingumo bandymą, veikimo terpė po 48 h trukmės pakeičiama nauja terpe, turinčia MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolinio bromido, tiazolilo mėlynojo tetrazolinio bromido, CAS Nr. 298–93–1)] ir ląstelės inkubuojamos 4 h 37 °C temperatūroje esant 5 % CO_2. MTT terpė pašalinama ir per naktį atliekama ląstelių lizė (pvz., į kiekvieną duobutę įpilant 10 % natrio dodecilsulfato tirpalo). Sumaišius tirpalą, fotometru matuojama absorbcija, esant 600 nm bangos ilgiui.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenų įvertinimas

Atliekant KeratinoSens™ tyrimą, apskaičiuojami šie parametrai:

— maksimalus vidutinis liuciferazės aktyvumo padidėjimas (I_{max}), stebimas esant tam tikrai bandomosios cheminės medžiagos ir teigiamo kontrolinio ėminio koncentracijai;

— $EC_{1,5}$ – koncentracijos vertė, atitinkanti koncentraciją, kuriai esant liuciferazės aktyvumo indukcija daugiau kaip 1,5 karto didesnė už ribinę (t. y. 50 % didesnis liuciferazės aktyvumas); ir

— IC_{50} ir IC_{30} – koncentracijos vertės, kurioms esant ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % ir 30 %.

— Liuciferazės indukcijos padidėjimas kartais, apskaičiuojamas pagal 1 lygtį, o visuminis maksimalus liuciferazės aktyvumo padidėjimas (I_{max}) kartais, yra apskaičiuojamas kaip atskirų kartotinių ėminių vidurkis.

1 lygtis:

$$Indukcijos\ padidėjimas\ kartais = \frac{(L_{sample} - L_{blank})}{(L_{solvent} - L_{blank})}$$

čia

L_{sample} duobutės su bandomąja chemine medžiaga liuminescencijos rodmuo;

L_{blank} tuščiojo ėminio duobutės be ląstelių ir be apdorojimo liuminescencijos rodmuo;

$L_{solvent}$ duobučių su ląstelėmis ir tirpiklio (neigiamu) kontroliniu ėminiu vidutinis liuminescencijos rodmuo;

$EC_{1,5}$ apskaičiuojama tiesinės interpoliacijos metodu pagal 2 lygtį, o visuminė $EC_{1,5}$ apskaičiuojama kaip atskirų kartotinių ėminių geometrinis vidurkis.

2 lygtis:

$$EC1{,}5 = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1{,}5 - I_\alpha}{I_b - I_\alpha}\right) + C_\alpha$$

▼M7

čia:

C_a mažiausia koncentracija, kuriai esant indukcija didesnė > 1,5 karto, µmol/l;

C_b didžiausia koncentracija, kuriai esant indukcija didesnė < 1,5 karto, µmol/l;

I_a indukcijos padidėjimas kartais, išmatuotas esant mažiausiai koncentracijai, kuriai indukcija buvo didesnė > 1,5 karto (trijų kartotinių duobučių vidurkis);

I_b indukcijos padidėjimas kartais, išmatuotas esant didžiausiai koncentracijai, kuriai indukcija buvo didesnė < 1,5 karto (trijų kartotinių duobučių vidurkis).Gyvybingumas apskaičiuojamas pagal 3 lygtį:

3 lygtis:

$$Gyvybingumas = \frac{(V_{band} - V_{tuščio})}{V_{tirpiklio} - V_{tuščio}} \times 100$$

čia:

V_{band} duobutės su bandomąja chemine medžiaga MTT optinio tankio rodmuo;

$V_{tuščio}$ tuščiojo ėminio duobutės be ląstelių ir be apdorojimo MTT optinio tankio rodmuo;

$V_{tirpiklio}$ duobučių su ląstelėmis ir tirpiklio (neigiamu) kontroliniu ėminiu MTT vidutinio optinio tankio rodmuo;

IC_{50} ir IC_{30} apskaičiuojamos tiesinės interpoliacijos metodu pagal 4 lygtį, o visuminės IC_{50} ir IC_{30} yra apskaičiuojamos kaip atskirų kartotinių ėminių geometrinis vidurkis

4 lygtis:

$$IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

čia:

X sumažėjimas esant koncentracijai, kuriai jį reikia apskaičiuoti, % (50 ir 30, kai IC_{50} ir IC_{30});

C_a mažiausia koncentracija, kuriai esant gyvybingumas sumažėja > x %, µmol/l;

C_b didžiausia koncentracija, kuriai esant gyvybingumas sumažėja < x %, µmol/l;

V_a gyvybingumas esant mažiausiai koncentracijai, kuriai buvo gautas > x % mažesnis gyvybingumas, %;

V_b gyvybingumas esant didžiausiai koncentracijai, kuriai buvo gautas < x % mažesnis gyvybingumas, %.

Kiekvienai koncentracijos vertei, kuriai gaunama > 1,5 karto didesnė liuciferazės aktyvumo indukcija, apskaičiuojamas statistinio reikšmingumo lygmuo (pvz., taikant dvipusį Stjudento *t* kriterijų), lyginant trijų kartotinių ėminių liuminescencijos vertes su liuminescencijos vertėmis tirpiklio (neigiamo) kontrolinio ėminio duobutėse, kad būtų nustatyta, ar liuciferazės aktyvumo indukcija yra statistiškai reikšminga ($p < 0,05$). Mažiausia koncentracija, kuriai esant gaunama > 1,5 karto didesnė liuciferazės aktyvumo indukcija, yra vertė, pagal kurią nustatoma $EC_{1,5}$ vertė. Kiekvieną kartą tikrinama, ar ši vertė yra mažesnė nei IC_{30} vertė, ir tai rodytų, kad esant $EC_{1,5}$ apsprendžiančiai koncentracijai ląstelių gyvybingumo sumažėjimas yra mažesnis kaip 30 %.

▼M7

Rekomenduojama duomenis tikrinti vizualiai pagal grafikus. Jei nėra aiškios dozės ir atsako kreivės arba gauta dozės ir atsako kreivė yra dvifazė (t. y. 1,5 karto atitinkančią ribą kerta du kartus), bandymą reikėtų pakartoti, kad būtų galima patikrinti, ar tai yra susiję su bandomąja chemine medžiaga ar dėl bandymo artefakto. Jei, atliekant nepriklausomą bandymą, dvifazis atsakas pasikartoja, ataskaitoje reikėtų nurodyti mažesnę $EC_{1,5}$ vertę (koncentracija, kuriai esant 1,5 karto atitinkanti riba kertama pirmą kartą).

Retais atvejais, kai stebima statistiškai nereikšminga daugiau kaip 1,5 karto didesnė indukcija, po kurios didesnei koncentracijai gaunama statistiškai reikšminga indukcija, šio kartotinio bandymo rezultatai laikomi tinkamais ir teigiamais, jei didesnė kaip ribinė 1,5 karto statistiškai reikšminga indukcija buvo gauta esant citotoksiškumo nesukeliančiai koncentracijai.

Galiausiai, jei 1,5 karto ar dar didesnę indukciją bandomosios cheminės medžiagos sukelia esant mažiausiai bandymo koncentracijai 0,98 μmol/l, nustatoma $EC_{1,5} < 0,98$ vertė pagal vizualiai ištirtą dozės ir atsako kreivę.

Priimtinumo kriterijai

Atliekant *KeratinoSens*™ bandymą, reikėtų atitikti šiuos priimtinumo kriterijus. Pirma, teigiamai kontrolinei cheminei medžiagai, cinamono aldehidui, gauta liuciferazės aktyvumo indukcija turėtų būti statistiškai reikšmingai didesnė nei 1,5 karto ribinė vertė (pvz., taikant *t* kriterijų) bent vienai bandymo koncentracijai (nuo 4 iki 64 μmol/l).

Antra, $EC_{1,5}$ vertė turėtų patekti bandymo laboratorijos istorinio vidurkio dviejų standartinių nuokrypių intervalą (pvz., nuo 7 μmol/l iki 30 μmol/l, pagal tinkamumo patvirtinimo duomenų rinkinį), vidurkį reguliariai atnaujinant. Be to, 64 μmol/l koncentracijos cinamono aldehido trijų kartotinių ėminių vidutinė indukcija turėtų būti nuo 2 iki 8. Jei pastarasis kriterijus nevykdomas, cinamono aldehidą reikėtų kruopščiai patikrinti ir bandymai gali būti priimti tik tuo atveju, jei yra aiški dozės ir atsako priklausomybė, kai, didėjant teigiamos kontrolinės cheminės medžiagos koncentracijai, liuciferazės aktyvumo indukcija didėja.

Galiausiai, atliekant kiekvieną kartotinį bandymą, kurį sudaro trijų kartotinių ėminių 6 duobutės, neigiamo (tirpiklio) DMSO kontrolinio ėminio liuminescencijos rodmens vidutinis variacijos koeficientas turėtų būti mažesnis kaip 20 %. Jei kintamumas didesnis, rezultatus reikėtų atmesti.

Rezultatų aiškinimas ir prognozavimo modelis

KeratinoSens™ prognozė laikoma teigiama, jei visos šios 4 sąlygos įvykdomos 2 iš 2 ar 2 iš 3 kartotinių bandymų, kitaip *KeratinoSens*™ prognozė laikoma neigiama (1 paveikslas):

1. I_{max} yra didesnė kaip (>) 1,5 karto ir statistiškai reikšmingai skiriasi palyginti su tirpiklio (neigiamu) kontroliniu ėminiu (nustatyta taikant dvipusį neporinį Stjudento *t* kriterijų);

2. ląstelių gyvybingumas yra didesnis kaip (>) 70 % esant mažiausiai koncentracijai, kai liuciferazės aktyvumo indukcija yra didesnė kaip 1,5 karto (t. y. esant $EC_{1,5}$ apsprendžiančiai koncentracijai);

3. $EC_{1,5}$ vertė yra mažesnė kaip (<) 1 000 μmol/l (ar < 200 μg/ml, jei tai nenustatytos molekulinės masės bandomoji cheminė medžiaga);

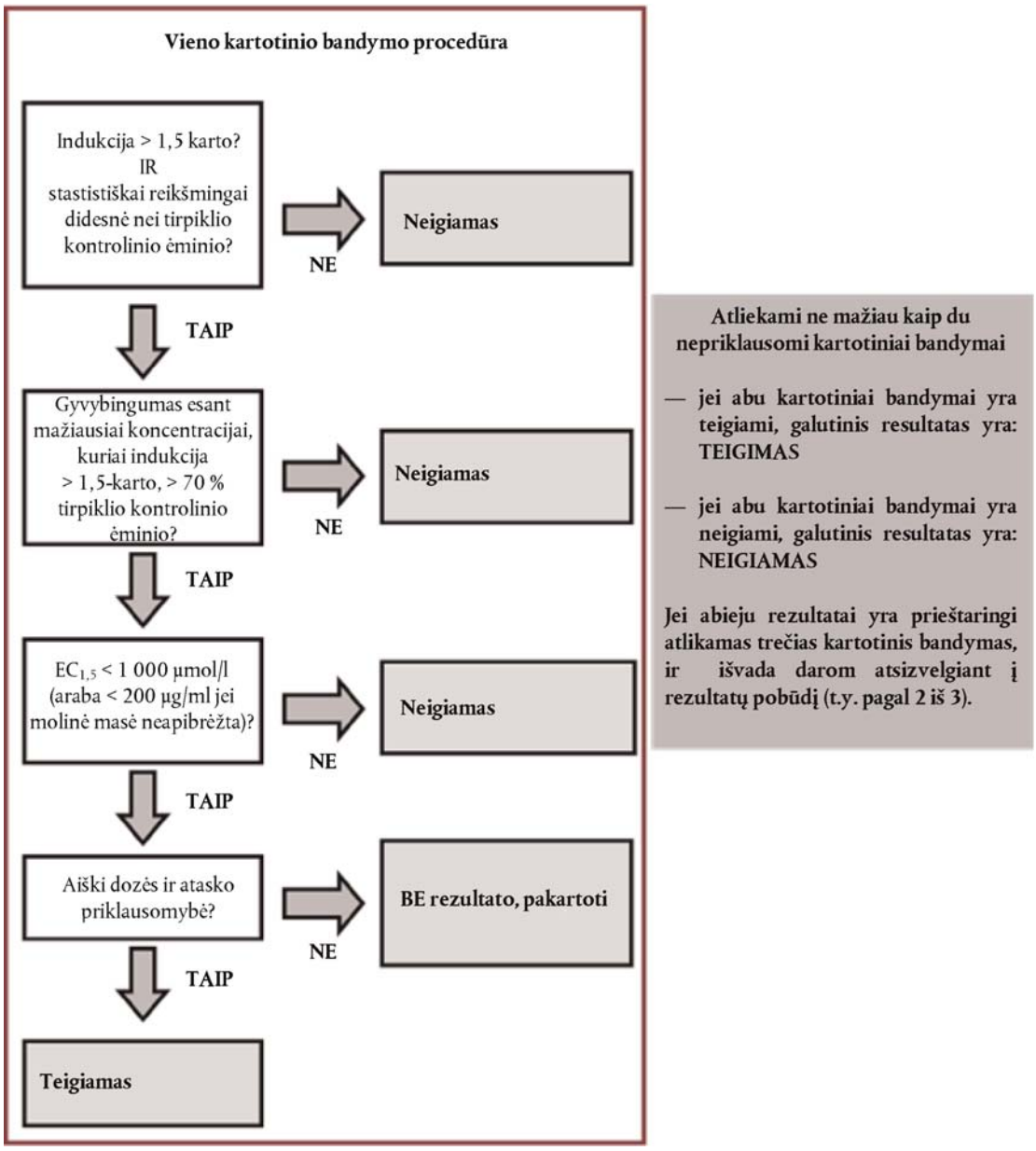
4. yra aiški liuciferazės indukcijos dozės ir atsako priklausomybė visoje kreivėje (arba atsakas yra dvifazis, kaip nurodyta 33 pastraipoje).

▼M7

Jei atliekant tam tikrą kartotinį bandymą, įvykdomos visos trys pirmosios sąlygos, bet negalima matyti aiškios liuciferazės indukcijos dozės ir atsako priklausomybės, to kartotinio bandymo rezultatą reikėtų laikyti negalutiniu ir gali prireikti papildomų bandymų (1 paveikslas). Be to, negalutiniu reikėtų laikyti neigiamą rezultatą, gautą < 1 000 μmol/l (ar < 200 μg/ml, jei tai nenustatytos molekulinės masės bandomoji cheminė medžiaga) koncentracijai (žr. 11 pastraipą).

1 paveikslas.

Prognozavimo modelis, naudojamas atliekant KeratinoSens™ bandymą. Į KeratinoSens™ prognozę reikėtų žiūrėti kaip į IATA sistemos dalį ir atsižvelgti į 9 ir 11 pastraipų nuostatas.



Retais atvejais bandomosios cheminės medžiagos, sukeliančios liuciferazės aktyvumo indukciją, kai jų koncentracija yra labai arti citotoksiškumo koncentracijos, atliekant vienus kartotinius bandymus gali būti teigiamos, kai jų koncentracija mažesnė nei citotoksiškumo koncentracija (t. y. $EC_{1,5}$ apsprendžianti koncentracija mažesnė nei (<) IC_{30}), o atliekant kitus kartotinius bandymus, gali būti

▼M7

teigiamos tik esant citotoksiškumo koncentracijai (t. y. $EC_{1,5}$ apsprendžiančiai koncentracijai didesnei kaip (>) IC_{30}). Tokias bandomąsias chemines medžiagas reikėtų bandyti pakartotinai, dozės ir atsako analizę atliekant siauresniame intervale ir naudojant mažesnį skiedimo faktorių (pvz., praskiedimas tarp duobučių skiriasi 1,33 ar Ö2 (= 1,41) karto), kad būtų nustatyta, ar esant citotoksiškumo koncentracijai indukcija vyko ar nevyko (9).

Bandymo ataskaita

Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga

— Vienkomponentė medžiaga

  — cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;

  — fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje, tirpumas DMSO, molekulinė masė ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės, atsižvelgiant į turimus duomenis;

  — grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka ir praktiškai įmanoma, kt.;

  — apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);

  — bandymo koncentracijos vertė (-ės);

  — laikymo sąlygos ir stabilumas, atsižvelgiant į turimus duomenis;

— daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišinys:

  — kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, pvz., cheminis pavadinimas (žr. pirmiau), grynumas, kiekybinis paplitimas ir būdingos fizikinės ir cheminės savybės, atsižvelgiant į turimus duomenis;

  — fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje, tirpumas DMSO ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės, atsižvelgiant į turimus duomenis;

  — molekulinė masė arba vidutinė molekulinė masė, jei tai žinomos sudėties mišiniai ar polimerai arba kita tyrimams atlikti svarbi informacija;

  — apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);

  — bandymo koncentracijos vertė (-ės);

  — laikymo sąlygos ir stabilumas, atsižvelgiant į turimus duomenis.

Kontroliniai ėminiai

— Teigiamas kontrolinis ėminys

  — cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai), SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;

  — fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje, tirpumas DMSO, molekulinė masė ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės, atsižvelgiant į turimus duomenis ir jei tinka;

  — grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka ir praktiškai įmanoma, kt.;

  — apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);

  — bandymo koncentracijos vertė (-ės);

  — laikymo sąlygos ir stabilumas, atsižvelgiant į turimus duomenis;

▼M7

— nuoroda į istorinių teigiamų kontrolinių ėminių rezultatus, kurie įrodytų tinkamus bandymo priėmimo kriterijus, jei tinka.

— Neigiamas (nešiklio) kontrolinis ėminys

— cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas (-ai), CAS numeris (-iai) ir (arba) kiti identifikavimo duomenys;

— grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka ir praktiškai įmanoma, kt.;

— fizinė išvaizda, molekulinė masė ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės, jei naudojami kiti nei šiame bandymų metode nurodyti neigiami kontroliniai ėminiai ar nešikliai, atsižvelgiant į turimus duomenis;

— laikymo sąlygos ir stabilumas, atsižvelgiant į turimus duomenis;

— kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos tirpiklio pasirinkimo pagrindimas.

Bandymų metodo sąlygos

— rėmėjo pavadinimas ir adresas, bandymų laboratorija ir tyrimo vadovas;

— taikyto bandymo metodo aprašymas;

— naudota ląstelių linija, jos laikymo sąlygos ir šaltinis (pvz., įmonė, iš kurios ląstelės buvo gautos);

— bandant naudotų ląstelių sėjimų skaičius ir susiliejimo laipsnis;

— ląstelių skaičiavimo metodas, taikytas sėjant prieš bandymus, ir priemonės, kurių buvo imtasi, kad būtų užtikrintas tolygus ląstelių skaičiaus pasiskirstymas (žr. 20 pastraipą);

— naudojamas liuminometras (pvz., modelis), įskaitant prietaiso nuostačius, naudojamas liuciferazės substratas, ir reikiamų liuminescencijos matavimų įrodymas pagal 3 priedėlyje aprašytą kontrolinį bandymą;

— procedūra, taikyta įrodant laboratorijos kvalifikaciją atlikti bandymus pagal šį metodą (pvz., bandant kvalifikacijai tikrinti skirtas chemines medžiagas) arba įrodant metodo taikymo charakteristikų atkuriamumą laikui bėgant.

Bandymų procedūra

— Atliktų kartotinių bandymų ir naudotų kartotinių ėminių skaičius;

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertės, įterpimo procedūra ir naudota veikimo trukmė (jei skiriasi nuo rekomenduojamos);

— taikytų įvertinimo ir sprendimo priėmimo kriterijų aprašymas;

— taikytų tyrimo priimtinumo kriterijų aprašymas;

— visų bandymo procedūros pakeitimų aprašymas.

Rezultatai

— Lentelės, į kurias įtraukiamos kiekvieno kartotinio bandymo metu gautos bandomosios cheminės medžiagos ir teigiamos kontrolinės cheminės medžiagos I_{max}, $EC_{1,5}$ ir gyvybingumo (t. y. IC_{50}, IC_{30}) vertės, taip pat vidutinės vertės (I_{max}– vidurkio; o $EC_{1,5}$ ir gyvybingumo verčių – geometrinio vidurkio), standartinis nuokrypis, apskaičiuotas naudojant visų atskirų kartotinių bandymų duomenis, bandomosios cheminės medžiagos įvertis pagal prognozavimo modelį;

▼M7

— kiekvienam bandymui gautas neigiamo kontrolinio ėminio liuminescencijos rodmenų variacijos koeficientas;

— grafikas, kuriame pateiktos dozės ir atsako priklausomybės kreivės, gautos liuciferazės aktyvumo indukcijai ir gyvybingumui;

— visų kitų svarbių stebėjimų aprašymas, jei tinka.

Rezultatų aptarimas

— Rezultatų, gautų atliekant *KeratinoSens*™ bandymą, aptarimas;

— bandymų metodo rezultatų nagrinėjimas atsižvelgiant į IATA, jei turima kita susijusi informacija.

Išvada

LITERATŪRA

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.

(3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85, 367-485.

(4) Šio priedo B.42 skyrius. Odos jautrinimas. Vietinio limfmazgio bandymas.

(5) Šio priedo B.6 skyrius. Odos jautrinimas.

(6) Šio priedo B.50 skyrius. Odos jautrinimas: Vietinio limfmazgio bandymas. DA.

(7) Šio priedo B.51 skyrius: Odos jautrinimas: Vietinio limfmazgio bandymas. BrdU-ELISA.

(8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284-292.

(9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281-290.

(10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779-1791.

▼M7

(11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 1(1), 45-49.

(12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. Toxicol. *In Vitro* 25, 733-744.

(13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, 33, 1337-1352.

(14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.

(15) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™., 17 pp. Available: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index

(16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. Toxicol. Sci. 107, 106-121.

(17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regul. Toxicol. Pharmacol. 60, 389-400.

(18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. Regul. Toxicol. Pharmacol. 63, 489-504.

(19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. J Appl Toxicol. 33, 1353-1364.

(20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. Toxicology *In Vitro* 27, 1220-1225.

(21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch. Toxicol. 87, 1683-1969.

(22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. Chemistry and Biology 17, 646-657.

(23) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris.

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

(25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. J. Invest. Dermatol., 126, 1813-1822.

▼M7

(26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. Toxicol. Lett. 150, 301-316.

(27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. Toxicol. *in vitro* 27, 2225-2232.

(28) OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N0 213, OECD, Paris.

(29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.

(30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides – (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 pp. http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf

▼M7

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo metodo taikymo charakteristikų matas ir vienas iš „tinkamumo“ aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „atitiktis“ tinkamų bandymo metodo rezultatų daliai išreikšti (29).

Nepalankios baigties kelias (angl. *Adverse Outcome Pathway*, AOP) – įvykių seka nuo tikslinės cheminės medžiagos ar panašių cheminių medžiagų grupių cheminės sandaros per molekulinio inicijavimo įvykį iki *in vivo* tiriamo rezultato (2).

ARE – antioksidacinis atsako elementas (angl. *Antioxidant response element*) (taip pat vadinamas EpRE, elektrofilinis atsako elementas) yra atsako elementas, randamas daugelio citoprotektorių genų ir II fazės genų priekinėje promotorinėje srityje. Aktyvinamas Nfr2, jis tarpininkauja šių genų transkripcinei indukcijai.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Variacijos koeficientas – kintamumo matas, apskaičiuojamas kartotinių ėminių duomenų grupei kaip standartinio nuokrypio ir vidurkio dalmuo. Jį galima padauginti iš 100, kad būtų išreikštas procentais.

$\boldsymbol{EC_{1,5}}$ – koncentracija gauta interpoliacijos būdu, kai liuciferazės indukcijos vertė yra didesnė 1,5 karto.

$\boldsymbol{IC_{30}}$ – koncentracija, kuriai esant ląstelių gyvybingumas sumažėja 30 %.

$\boldsymbol{IC_{50}}$ – koncentracija, kuriai esant ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 %.

Pavojus – būdingoji agento savybė arba situacija, galinti sukelti neigiamų padarinių, kai organizmą, sistemą ar populiaciją (arba jos dalį) veikia tas agentas.

Integruotasis bandymo ir vertinimo metodas (angl. *Integrated Approach to Testing and Assessment*, IATA) – struktūrinis metodas, taikomas cheminės medžiagos ar cheminių medžiagų grupės (galimam) pavojui identifikuoti, pavojui (veikimo gebai) apibūdinti ir (arba) saugai vertinti (galimo pavojaus ir (arba) veikimo gebos ir veikimo), kurį taikant strategiškai apjungiami į vieną visumą ir įvertinami visi susiję duomenys, kad būtų galima pateikti informaciją reglamentavimo sprendimui priimti dėl galimo pavojaus ir (arba) rizikos, ir (arba) dėl būtinumo atlikti papildomą tikslinį, taigi minimalų bandymą.

I_{max} – maksimalus liuciferazės aktyvumo indukcijos padidėjimo palyginti su tirpiklio (neigiamu) kontroliniu ėminiu rodiklis, išmatuotas esant kuriai nors bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai.

Keap1 – Keap1 (angl. *Kelch-like ECH-associated protein 1*) yra receptorinis baltymas, kuris gali reguliuoti Nrf2 aktyvumą. Indukavimo nebuvimo sąlygomis Keap1 receptorinis baltymas pasirenka Nrf2 transkripcijos faktorių kaip ubikvitinilinimo ir proteolitinio skaidymo proteasomoje taikinį. Dėl reaktyviųjų Keap1 cisteino liekanų modifikavimo, susidarant jų kovalentiniam ryšiui su mažomis molekulėmis, Nrf2 gali atsiskirti nuo Keap1 (8) (10) (11)8) (10) (11).

Mišinys – iš dviejų arba daugiau medžiagų sudarytas mišinys arba tirpalas, kuriame jos nereaguoja (1)

▼M7

Vienkomponentė medžiaga – medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai vienas pagrindinis komponentas sudaro ne mažiau kaip 80 % (masės).

Daugiakomponentė medžiaga – medžiaga, kurią apibrėžia jos kiekybinė sudėtis, kai daugiau kaip vieno pagrindinio komponento koncentracija ≥ 10 % (masės) ir < 80 % (masės). Daugiakomponentė medžiaga yra gamybos proceso rezultatas. Skirtumas tarp mišinio ir daugiakomponentės medžiagos yra tas, kad mišinys gaunamas sumaišant dvi medžiagas arba daugiau nevykstant cheminei reakcijai. Daugiakomponentė medžiaga yra cheminės reakcijos rezultatas.

Nrf2 – Nrf2, branduolinis faktorius (angl. *nuclear factor* (*erythroid-derived 2*)*-like 2 factor*), yra transkripcijos faktorius, kuris dalyvauja antioksidacinio atsako kelyje. Kai Nrf2 nėra ubikvitinilintas, jis gaminasi citoplazmoje ir perkeliamas į branduolius, kur jis jungiasi prie ARE daugelio citoprotekcinių genų priekinėje promotorinėje srityje, inicijuodamas jų transkripciją (8) (10) (11).

Teigiamas kontrolinis ėminys – kartotinis ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus ir apdorotas chemine medžiaga, kuri yra žinoma kaip sukelianti teigiamą atsaką. Siekiant užtikrinti galimybę vertinti teigiamo kontrolinio ėminio atsako kintamumą per tam tikrą laiką, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus.

Tinkamumas – santykio tarp bandymo ir tiriamo poveikio bei bandymo reikšmingumo bei naudingumo siekiant tam tikro tikslo apibūdinimas. Tai yra atliekant bandymą tiriamo biologinio poveikio matavimo ar prognozavimo tikslumo laipsnis. Tinkamumas aprėpia bandymų metodo tikslumo (atitikties) aspektą (29).

Patikimumas – pagal tą patį protokolą atliekamo bandymų metodo, tam tikrą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų, atkuriamumo laipsnio matas. Jis įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų ir pakartojamumą laboratorijoje (29).

Atkuriamumas – rezultatų, gautų pagal vienodą bandymų protokolą bandant tą pačią cheminę medžiagą, sutapimas (žr. *patikimumas*) (29).

Jautris – visų teigiamų ar veikliųjų cheminių medžiagų, kurios buvo tiksliai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymų metodo, kuriuo gaunami kategorijos nustatymo rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymų metodo tinkamumą (29).

Tirpiklio ar nešiklio kontrolinis ėminys – visus bandymo sistemos komponentus, įskaitant tirpiklį ar nešiklį, turintis kartotinis ėminys. Jis naudojamas tam, kad būtų nustatyta atskaitos vertė ėminiams, apdorotiems bandomąja chemine medžiaga, ištirpinta tame pačiame tirpiklyje.

Specifiškumas – visų neigiamų ar neveikliųjų cheminių medžiagų, kurios buvo tiksliai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymų metodo, kuriuo gaunami kategorijos nustatymo rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymų metodo tinkamumą (29).

Medžiaga – gamtoje randami arba gamybos procese gaunami cheminiai elementai ir jų junginiai, įskaitant visus priedus, kurių reikia produkto stabilumui užtikrinti, ir visas priemaišas, patenkančias į produktą taikomo proceso metu, tačiau neįskaitant tirpiklio, kurį galima atskirti, nepaveikiant medžiagos stabilumo ar nekeičiant jos sudėties (1).

Bandomoji cheminė medžiaga – terminas *bandomoji cheminė medžiaga* vartojamas bandomam dalykui nurodyti.

▼M7

Jungtinių Tautų visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema (JT GHS) – sistema, kurioje pateikiamas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimas pagal standartizuotus fizikinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir nagrinėjami atitinkami informaciniai elementai, pvz., piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų galima informuoti apie medžiagų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbuotojus, darbininkus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likvidatorius) ir aplinką (1).

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

Patvirtinto tinkamumo bandymų metodas – bandymų metodas, kurio tinkamumo ir patikimumo pakanka tam tikram tikslui pasiekti ir kuriam taikomi moksliškai pagrįsti principai. Bandymų metodas niekuomet nėra visiškai tinkamas absoliučiąja prasme, bet tik tam tikro tikslo atžvilgiu (29).

▼M7

2 priedėlis

KVALIFIKACIJAI TIKRINTI SKIRTOS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

Odos jautrinimas *in vitro*. ARE-Nrf2 liuciferazės bandymų metodas

Prieš pradėdamos įprastiniu būdu taikyti šį bandymų metodą, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, gaudamos tinkamą *KeratinoSens*™ prognozę dėl 10 kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų, rekomenduotų 1 lentelėje, ir gaudamos $EC_{1,5}$ bei IC_{50} vertes, kurios patenka į atitinkamus etaloninius intervalus, ne mažiau kaip 8 iš 10 kvalifikacijai tikrinti skirtų cheminių medžiagų. Kvalifikacijai tikrinti skirtos cheminės medžiagos buvo pasirinktos taip, kad atitiktų odos jautrinimo pavojų intervalą. Kiti atrankos kriterijai buvo galimybė pirkti chemines medžiagas ir tai, ar galima gauti aukštos kokybės *in vivo* etalonus ir aukštos kokybės *KeratinoSens*™ bandymo *in vitro* duomenis.

1 lentelė

Cheminės medžiagos, rekomenduojamos techninei kvalifikacijai tikrinti taikant KeratinoSens™ bandymą

Kvalifikacijai tikrinti skirtos cheminės medžiagos	CAS Nr.	Agregatinė būsena	Prognozė *in vivo* (1)	Keratino-Sens™ prognozė (2)	$EC_{1,5}$ (μmol/l) etaloninis intervalas (3)	IC_{50} (μmol/l) etaloninis intervalas (3)
Izopropanolis	67-63-0	Skystis	Nejautrinanti medžiaga	Neigiama	> 1 000	> 1 000
Salicilo rūgštis	69-72-7	Kietoji medžiaga	Nejautrinanti medžiaga	Neigiama	> 1 000	> 1 000
Pieno rūgštis	50-21-5	Skystis	Nejautrinanti medžiaga	Neigiama	> 1 000	> 1 000
Glicerolis	56-81-5	Skystis	Nejautrinanti medžiaga	Neigiama	> 1 000	> 1 000
Cinamilo alkoholis	104-54-1	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (silpnai)	Teigiama	25–175	> 1 000
Etilenglikolio dimetilakrilatas	97-90-5	Skystis	Jautrinanti medžiaga (silpnai)	Teigiama	5–125	> 500
2-merkaptobenztiazolas	149-30-4	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (vidutinio stiprumo)	Teigiama	25–250	> 500
Metildibromglu-taronitrilas	35691-65-7	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (strong)	Teigiama	< 20	20–100
4-metilaminofenolio sulfatas	55-55-0	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (stipriai)	Teigiama	< 12,5	20 – 200
2,4-dinitrochlorbenzenas	97-00-7	Kietoji medžiaga	Jautrinanti medžiaga (ypač stipriai)	Teigiama	< 12,5	5–20

(1) Pavojaus (ir veikimo gebos) prognozės *in vivo* yra pagrįstos LLNA duomenimis (13). Veikimo geba *in vivo* gauta taikant ECETOC pasiūlytus kriterijus (24).
(2) Į KeratinoSens™ prognozę reikėtų žiūrėti kaip į IATA sistemos dalį ir atsižvelgti į šio bandymų metodo 9 ir 11 pastraipų nuostatas.
(3) Pagrįstas stebimais istoriniais duomenimis (12).

▼M7

3 priedėlis

LIUMINESCENCIJOS MATAVIMO KOKYBĖS KONTROLĖ

Pagrindinis bandymas atliekant KeratinoSens™ tyrimą, kad būtų užtikrinti optimalūs liuminescencijos matavimai

Šie trys parametrai yra ypač svarbūs, kad liuminometru būtų gauti patikimi rezultatai:

— pakankamas jautris, kad būtų užtikrintas stabilus fonas kontrolinėse duobutėse;

— nėra jokio gradiento per visą plokštelę dėl didelės rodmenų skaitymo trukmės; ir

— nėra šviesos taršos gretimose duobutėse nuo ypač aktyvių duobučių.

Prieš bandymus rekomenduojama užtikrinti tinkamus liuminescencijos matavimus, bandant kontrolinės plokštelės rinkinį, kaip aprašyta toliau (trijų kartotinių ėminių analizė).

Pirmojo mokomojo bandymo plokštelės rinkinys

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	**EGDMA 0,98**	**EGDMA 1,95**	**EGDMA 3,9**	**EGDMA 7,8**	**EGDMA 15,6**	**EGDMA 31,25**	**EGDMA 62,5**	**EGDMA 125**	**EGDMA 250**	**EGDMA 500**	**EGDMA 1000**	**EGDMA 2000**
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	**CA 4**	**CA 8**	**CA 16**	**CA 32**	**CA 64**	**Tuščiasis ėminys**

EGDMA – etilenglikolio dimetakrilatas (CAS Nr. 97-90-5), stipriai indukuojanti cheminė medžiaga,

CA – cinamono aldehidas, teigiama etaloninė cheminė medžiaga (CAS Nr. 104-55-2).

Kokybės kontrolės analizė turėtų rodyti:

— aiškų dozės atsaką D eilutėje, kai I_{max} > 20 kartų didesnis nei fonas (dažniausiai gaunamos 100–300 I_{max} vertės);

— jokio dozės atsako C ir E eilutėse (indukcija ne didesnė kaip 1,5 (būtų gerai, jei nebūtų didesnis kaip 1,3) dėl galimos šviesos taršos, ypač šalia didelio aktyvumo duobučių EGDMA eilutėje;

— jokio statistiškai reikšmingo skirtumo tarp A, B, C, E, F ir G eilučių (t. y. jokio gradiento per visą plokštelę); ir

— ne didesnį kaip 20 % kintamumą visose A, B, C, E, F ir G eilutėse ir H eilutės DMSO duobutėse (t. y. stabilų foną).

▼M7

B.61. FLUORESCEINO NUOTĖKIO BANDYMŲ METODAS AKIS ĖSDINANČIOMS IR STIPRIAI DIRGINANČIOMS MEDŽIAGOMS IDENTIFIKUOTI

ĮVADAS

Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) 460 (2012). Fluoresceino nuotėkio (angl. *Fluorescein Leakage*, FL) bandymų metodas yra bandymų metodas *in vitro*, kuris tam tikromis aplinkybėmis ir esant tam tikriems apribojimams gali būti taikomas cheminėms medžiagoms (medžiagoms ir mišiniams) klasifikuoti kaip akis ėsdinančias ir stipriai dirginančias medžiagas, kaip apibrėžta Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemoje (GHS) (1 kategorijos), Reglamente (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo (CLP) ([1]) (1 kategorijos) ir JAV Aplinkos apsaugos agentūros (AAA) (angl. *Environmental Protection Agency*, EPA) (I kategorijos) (1)(2). Šiame bandymų metode kaip stipriai dirginančios cheminės medžiagos yra apibrėžiamos cheminės medžiagos, kurios sukelia akies audinių pažeidimą, neišnykstantį per 21 parą nuo įterpimo, arba sukelia smarkų fizinį regėjimo pablogėjimą, o akis ėsdinančios cheminės medžiagos yra cheminės medžiagos, kurios sukelia negrįžtamąjį akies audinio pažeidimą. Šios cheminės medžiagos yra klasifikuojamos kaip JT GHS 1 kategorijos, ES CLP 1 kategorijos arba JAV AAA I kategorijos.

Nors FL bandymų metodas nelaikomas tinkamu visiškai pakeisti triušių akių bandymą *in vivo*, FL rekomenduojamas kaip klasifikavimo ir ženklinimo reguliavimo tikslais taikomų nuosekliųjų bandymų strategijos dalis. Todėl FL rekomenduojamas kaip pirmas žemynkrypčio metodo etapas akis ėsdinančioms ar stipriai dirginančioms cheminėms medžiagoms identifikuoti, specialiai skirtas tik tam tikro tipo cheminėms medžiagoms (t. y. vandenyje tirpioms medžiagoms ir mišinimas) (3)(4).

Šiuo metu visuotinai pripažįstama, kad artimiausioje ateityje joks atskiras *in vitro* akių dirginimo bandymas negalės pakeisti *in vivo* akių bandymo (TM B.5 (5)), kad būtų galima prognozuoti skirtingų cheminių klasių visą dirginimo būdų intervalą. Tačiau kelių alternatyvių bandymų metodų strateginiai deriniai taikant (nuosekliųjų) bandymų strategiją galėtų pakeisti *in vivo* akių bandymą (4). Žemynkryptis metodas (4) skirtas taikyti tada, kai, atsižvelgiant į esamą informaciją, daroma prielaida apie didelę cheminės medžiagos dirginamojo poveikio gebą.

Taikant prognozavimo modelį, išsamiai aprašytą 35 pastraipoje, FL bandymų metodu be jokio papildomo bandymo galima identifikuoti chemines medžiagas kaip akis ėsdinančias ar stipriai dirginančias (JT GHS 1 kategorijos; ES CLP 1 kategorijos; JAV AAA I kategorijos), esant ribotai metodo taikymo sričiai. Tokia pati prielaida daroma dėl mišinių, nors atliekant tinkamumo patvirtinimą, mišiniai nebuvo naudojami. Todėl FL bandymų metodas gali būti taikomas cheminių medžiagų akių dirginimo ar ėsdinimo gebai nustatyti, laikantis TM B.5 nuosekliųjų bandymų strategijos (5). Tačiau cheminę medžiagą, kuriai taikant FL bandymų metodą nebuvo gauta akių ėsdinimo ar stipraus dirginimo prognozės, reikėtų bandyti vienu ar keliais papildomais bandymų metodais (*in vitro* ir (arba) *in vivo*), kad būtų galima tiksliai identifikuoti i) chemines medžiagas, kurios pagal FL yra *in vitro* klaidingai neigiamos akis ėsdinančios ar stipriai

([1]) 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, OL L 353, 2008 12 31.

▼M7

dirginančios (JT GHS 1 kategorijos, ES CLP 1 kategorijos, JAV AAA I kategorijos); ii) chemines medžiagas, kurios neklasifikuojamos dėl akių ėsdinimo ar dirginimo (JT GHS *be kategorijos*, ES CLP *be kategorijos*, U.S. EPA IV kategorijos) ir (arba) iii) chemines medžiagas, kurios yra vidutiniškai ar nestipriai akis dirginančios (JT GHS 2A ir 2B kategorijos, ES CLP 2 kategorijos, JAV AAA II ir III kategorijos).

Šio bandymo metodo tikslas – aprašyti procedūras, taikomas įvertinant akių ėsdinimo ar stipraus dirginimo bandomąja chemine medžiaga galimybę, matuojant jos gebą pažeisti sandarų susiliejusių epitelio ląstelių monosluoksnį. Epitelio pralaidumo vientisumas yra pagrindinė epitelio funkcija, kurią atlieka junginės ir ragenos epitelis. Epitelio pralaidumą reguliuoja įvairios sandarios jungtys. Buvo įrodyta, kad epitelio pralaidumo padidėjimas *in vivo* yra susijęs su uždegimo lygiu ir paviršiaus pažeidimu, stebimu stiprėjant akių dirginimui.

Taikant FL bandymų metodą, toksinis bandomosios cheminės medžiagos poveikis po trumpalaikio veikimo matuojamas kaip fluoresceino natrio druskos pralaidumo per epitelio monosluoksnį, kurį sudaro ant pralaidžių įdėklų auginamos Madin Darby šunų inkstų (angl. *Madin-Darby Canine Kidney*, MDCK) ląstelės, padidėjimas. Vykstančio fluoresceino nuotėkio vertė yra proporcinga cheminės medžiagos sukeltam sandarių jungčių, desmosominių jungčių ir ląstelių membranų pažeidimui ir gali būti naudojama kaip bandomosios cheminės medžiagos toksiškumo akims stiprumo įvertis. 1 priedėlyje pateikta FL bandymų metodui skirtų MDCK ląstelių auginimo ant įdėklo membranos schema.

Apibrėžtys pateiktos 2 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

Šis bandymų metodas yra pagrįstas INVITTOX protokolu Nr. 71 (6), kuris buvo įvertintas tarptautiniame tinkamumo patvirtinimo tyrime, kurį atliko Europos alternatyvių metodų patvirtinimo centras (ECVAM), bendradarbiaudamas su JAV alternatyvių metodų patvirtinimo tarpžinybiniu koordinavimo komitetu (ICCVAM) ir Japonijos alternatyvių metodų patvirtinimo centru (JaCVAM).

FL bandymų metodas nerekomenduojamas, kai reikia identifikuoti chemines medžiagas, kurias reikėtų klasifikuoti kaip akis vidutiniškai ar nestipriai dirginančias, arba chemines medžiagas (medžiagas ir mišinius), kurių nereikėtų klasifikuoti dėl akių dirginimo (t. y. JT GHS 2A ar 2B kategorijos, *be kategorijos*, ES CLP 2 kategorijos, *be kategorijos*, JAV AAA II, III ir IV kategorijos), kaip buvo įrodyta atliekant patvirtinimo tyrimą (3) (7).

Bandymų metodas taikomas tik vandenyje tirpioms cheminėms medžiagoms (medžiagoms ir mišiniams). Taikant FL bandymų metodą, paprastai galima tiksliai prognozuoti vandenyje tirpių cheminių medžiagų stiprų akių dirginimą ir (arba) chemines medžiagas, kurių toksiniam poveikiui įtakos nedaro praskiedimas (7). Cheminė medžiaga turėtų būti tirpi steriliame kalcio jonų turinčiame (1,0-1,8 mmol/l koncentracijos) Hankso subalansuotame druskos tirpale (HBSS) be fenolio raudonojo, esant koncentracijai $\geq$ 250 mg/ml (didesnei nei 100 mg/ml ribinei dozei), kad ją būtų galima klasifikuoti kaip bandymo sąlygomis vandenyje tirpią cheminę medžiagą. Tačiau jei bandomosios cheminės medžiagos tirpumas yra mažesnis kaip 100 mg/ml, bet toje koncentracijoje ji sukelia 20 % FL (t. y. FL_{20} < 100 mg/ml), ją vis dar galima klasifikuoti kaip GHS 1 kategorijos ar AAA I kategorijos.

Dėl nustatytų šio bandymų metodo apribojimų į jo taikymo sritį neįtraukiamos stiprios rūgštys ir bazės, ląstelių fiksavimo priemonės ir labai lakios cheminės medžiagos. Šių cheminių medžiagų veikimo mechanizmo negalima nustatyti FL bandymų metodu, pvz., didelio laipsnio koaguliacija, muilinimas ar specifinės cheminės reakcijos. Kiti nustatyti šio metodo apribojimai yra pagrįsti prognozavimo dėl spalvotųjų ir klampių bandomųjų cheminių medžiagų gebos rezultatais (7). Daroma prielaida, kad abiejų tipų chemines medžiagas sunku pašalinti nuo

▼M7

monosluoksnio po trumpalaikio veikimo ir kad bandymų metodo prognozavimo gebą būtų galima pagerinti atliekant didesnį plovimo veiksmų skaičių. Kietųjų cheminių medžiagų suspensijos turi polinkį iškristi į nuosėdas ir gali būti sunku nustatyti jų galutinę koncentraciją prie ląstelių. Iš duomenų bazės pašalinus šių cheminių ir fizikinių klasių chemines medžiagas, FL bandymų metodo tikslumas pagal ES, EPA ir GHS klasifikavimo sistemas iš esmės pagerėjo (7).

Tačiau, atsižvelgiant į šio bandymų metodo tikslą (t. y. identifikuoti tik akis ėsdinančias ar stipriai dirginančias chemines medžiagas), klaidingai neigiamų rezultatų dalis (žr. 13 pastraipą) esmės nekeičia, nes priklausomai nuo reglamentavimo reikalavimų tokios cheminės medžiagos vėliau būtų bandomos atliekant tinkamai patvirtintus bandymus *in vitro* arba bandymą su triušiais įrodomosios duomenų galios metodui (5) taikant nuosekliųjų bandymų strategiją (taip pat žr. 3 ir 4 pastraipas).

Kiti nustatyti FL bandymų metodo apribojimai yra pagrįsti klaidingai neigiamų rezultatų ir klaidingai teigiamų rezultatų dalimi. Kai taikomas kaip pradinis žemynkrypčio metodo etapas, kad būtų identifikuotos akis ėsdinančios ar stipriai dirginančios vandenyje tirpios cheminės medžiagos ir mišiniai (JT GHS 1 kategorijos, ES CLP 1 kategorijos, JAV AAA I kategorijos), su *in vivo* rezultatais palygintų FL bandymų metodo klaidingai teigiamų rezultatų dalis buvo nuo 7 % (7/103, JT GHS ir ES CLP) iki 9 % (9/99, JAV AAA), o klaidingai neigiamų rezultatų dalis buvo nuo 54 % (15/28, JAV AAA) iki 56 % (27/48, JT GHS ir ES CLP). Cheminės grupės, kurioms taikant FL bandymų metodą gaunami klaidingai teigiami ir (arba) klaidingai neigiami rezultatai, šame dokumente neapibrėžtos.

Tam tikri techniniai apribojimai yra susiję su MDCK ląstelių kultūra. Didėjant sėjimų skaičiui, blogėja sandarių jungčių, kurios trukdo fluoresceino natrio druskos dažikliui prasiskverbti per monosluoksnį, kokybė. Dėl nevisiško sandarių jungčių susidarymo padidėja neapdorotiems kontroliniams ėminiams gautas FL. Todėl svarbu nustatyti tam tikrą leidžiamą maksimalų nuotėkį, kuris būtų gautas neapdorotiems kontroliniams ėminiams (žr. 38 pastraipą, nuotėkis 0 %). Kaip visų kitų bandymų *in vitro* atveju, ląstelės bėgant laikui turi galimybę pasikeisti, todėl svarbu nurodyti bandant atliekamų ląstelių sėjimų skaičiaus intervalus.

Dabartinę taikomumo sritį kai kuriais atvejais galima išplėsti, bet tik atlikus tirtų bandomųjų cheminių medžiagų išplėsto duomenų rinkinio, pageidautina gauto bandymų keliu, analizę (3). Šis bandymų metodas bus atnaujinamas, kai tik bus išnagrinėta nauja informacija ir duomenys.

Kiekviena laboratorija, kuri pradėtų taikyti šį bandymo metodą, turėtų naudoti kvalifikacijai tikrinti skirtas chemines medžiagas, nurodytas 3 priedėlyje. Laboratorijos gali naudoti šias chemines medžiagas, norėdamos įrodyti savo techninę kompetenciją taikyti FL bandymų metodą, prieš pateikdama FL bandymų duomenis teisės aktuose numatytais pavojų klasifikavimo tikslais.

BANDYMO PRINCIPAS

FL bandymų metodas yra citotoksiškumu ir ląstelių funkcija pagrįstas bandymas *in vitro*, atliekamas su susiliejusiu monosluoksniu, kurį sudaro MDCK CB997 kanalėlių epitelio ląstelės, auginamos ant pusiau pralaidžių įdėklų, ir kuris modeliuoja ragenos epitelio *in vivo* nesidalijančių ląstelių būseną. MDCK ląstelių linija yra gerai ištirta ir sudaro sandarias jungtis bei desmosomines jungtis, panašias į tas, kurios yra junginės ir ragenos epitelio priekinėje pusėje. Sandarios ir desmosominės jungtys *in vivo* neleidžia tirpalams ir pašalinėms medžiagoms prasiskverbti per ragenos epitelį. Epitelio sandarumo praradimas dėl sandarių jungčių ir desmosominių jungčių pažeidimo yra vienas iš ankstesnių įvykių, kuriuos sukelia dirginimas chemine medžiaga.

▼M7

Bandomoji cheminė medžiaga įterpiama ant susiliejusio sluoksnio, sudaryto iš įdėklo viršutinėje pusėje auginamų ląstelių. Paprastai taikomas trumpalaikis 1 min veikimas, kad būtų galima aptikti įprastinio pralaidumo padidėjimą, kai veikiami žmonės. Trumpalaikio veikimo privalumas yra tas, kad vandenyje ištirpintas medžiagas ir mišinius galima bandyti grynus, jei juos galima nesunkiai pašalinti pasibaigus veikimo laikotarpiui. Tai yra labiau tiesioginis būdas palyginti su cheminio poveikio žmonėms rezultatais. Bandomoji cheminė medžiaga pašalinama ir viršutinė monosluoksnio pusė 30 min veikiama netoksiniu fluoresceino natrio druskos stipriai fluosescuojančiu dažikliu. Bandomąja chemine medžiaga sukeltas sandarių jungčių pažeidimas nustatomas pagal fluoresceino kiekį, kuris per tam tikrą laikotarpį prasiskverbia per ląstelių sluoksnį.

Fluoresceino natrio druskos dažiklio kiekis, kuris praeina per monosluoksnį ir įdėklo membraną į duobutėje esančio tirpalo nustatytą tūrį (į kurį skverbiasi fluoresceino natrio druskos dažiklis), nustatomas spektrofluorimetriniu metodu matuojant fluoresceino koncentraciją duobutėje. Fluoresceino nuotėkio (FL) vertė apskaičiuojama pagal dviejų kontrolinių ėminių fluoresencijos intensyvumo (FI) rodmenis: tuščiojo kontrolinio ėminio ir maksimalaus nuotėkio kontrolinį ėminį. Kiekvienai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertei gauta nuotėkio procentinė vertė, taigi ir sandarių jungčių pažeidimo dydis, yra išreiškiama šių kontrolinių ėminių atžvilgiu. Tada apskaičiuojama FL_{20} (t. y. koncentracijos, kuri sukelia 20 % FL palyginti su verte, gauta neapdorotam susiliejusiam monosluosniui ir įdėklams be ląstelių) vertė. FL_{20} (mg/ml) vertė yra naudojama akis ėsdinančioms ir stipriai dirginančioms cheminėms medžiagoms identifikuoti pagal prognozavimo modelį (žr. 35 pastraipą).

Regeneravimasis yra svarbi bandomosios cheminės medžiagos toksiškumo profilio dalis, kuri taip pat įvertinama atliekant akių dirginimo bandymą *in vivo*. Parengiamoji analizė parodė, kad regeneravimosi duomenys (iki 72 h po paveikimo chemine medžiaga) galėtų padidinti prognozavimo taikant INVITTOX 71 protokolą gebą, bet būtinas papildomas įvertinimas ir būtų naudingi papildomi duomenys, pageidautina, gauti atliekant papildomus bandymus (6). Šis bandymų metodas bus atnaujinamas, kai tik bus išnagrinėta nauja informacija ir duomenys.

PROCEDŪRA

Ląstelių monosluoksnio paruošimas

MDCK CB997 ląstelių monosluoksnis ruošiamas naudojant dar nesusiliejusias ląsteles, auginamas ląstelių kultūros kolbose su DMEM ir maistinių medžiagų mišiniu F12 (1× koncentratas su L-glutaminu, 15 mmol/l HEPES buferiniu tirpalu, kalciu (koncentracija – 1,0–1,8 mmol/l) ir 10 % šildant inaktyvuoto fetalinio veršiukų serumo (FCS) ar fetalinio jaučių serumo (FBS)). Svarbu, kad visą FL bandymą naudojamos terpės ar tirpalai turėtų kalcio jonų, kurių koncentracija būtų nuo 1,8 mmol/l (200 mg/l) iki 1,0 mmol/l (111 mg/l), kad būtų užtikrintas sandarių jungčių susidarymas ir vientisumas. Reikėtų kontroliuoti ląstelių sėjimų skaičiaus intervalą, kad būtų galima užtikrinti tolygų ir atkuriamą sandarių jungčių susidarymą. Pageidautina, kad atitirpintų ląstelių sėjimų skaičius būtų 3–30, nes tokio sėjimų skaičiaus ląstelės turi panašias funkcines savybes, todėl gaunamas geresnis bandymų rezultatų atkuriamumas.

Prieš atliekant bandymus pagal FL metodą, ląstelės paimamos iš kolbos apdorojant tripsinu, centrifuguojamos ir reikiamas jų skaičius sėjamas į įdėklus, įdėtus į 24 duobučių plokšteles (žr. 1 priedėlį). Ląsteles reikėtų sėti į 12 mm skersmens įdėklus su mišriųjų celiuliozės esterių membrana, kurios storis būtų 80–150 μm ir akučių dydis – 0,45 μm. Atliekant tinkamumo patvirtinimo tyrimą buvo naudojami Millicell-HA 12 mm įdėklai. Įdėklo ir membranos savybės yra svarbios, nes jos gali daryti įtaką ląstelių augimui ir cheminiam ryšiui. Gali atsirasti ryšys tarp tam tikrų tipų cheminių medžiagų ir Millicell-HA įdėklo membranos, kuris gali daryti įtką rezultatų aiškinimui. Reikėtų naudoti kvalifikaciniam bandymui skirtą cheminę medžiagą (žr. 3 priedėlį), kad būtų galima įrodyti lygiavertiškumą, jei naudojamos kito tipo membranos.

▼M7

Cheminis ryšys su įdėklo membrana daugiau būdingas katijoninėms cheminėms medžiagoms, pvz., benzalkonio chloridui, kurį traukia krūvį turinti membrana (7). Cheminis ryšys su įdėklo membrana gali padidinti cheminės medžiagos poveikio trukmę, todėl būtų gautas per didelis cheminės medžiagos toksinio poveikio įvertis, taip pat gali fiziškai sumažėti fluoresceino nuotėkis per įdėklą dėl dažiklio ryšio su katijonine chemine medžiaga, susijungusia su įdėklo membrana, todėl būtų gautas per mažas cheminės medžiagos toksinio poveikio įvertis. Tai galima lengvai kontroliuoti veikiant tik membraną didžiausios koncentracijos bandomąja chemine medžiaga, įpilant įprastinės koncentracijos fluoresceino natrio druskos dažiklio ir laikant nustatytą laiką (be ląstelių kontrolinio ėminio). Jei yra ryšys su fluoresceino natrio druskos dažikliu, įdėklo membrana, nuplovus bandomąją cheminę medžiagą, lieka nudažyta geltonai. Todėl svarbu žinoti bandomosios cheminės medžiagos rišamąsias savybes, kad būtų galima paaiškinti cheminės medžiagos poveikį ląstelėms.

Į įdėklą sėjamos ląstelės, prieš pradedant veikti chemine medžiaga, turėtų sudaryti susiliejusį monosluoksnį. Į kiekvieną įdėklą reikėtų įdėti $1{,}6 \times 10^5$ ląstelių (400 µl ląstelių suspensijos, kurios tankis 4×10^5 ląstelių/ml). Šiomis sąlygomis susiliejęs monosluoksnis gaunamas po 96 h auginimo kultūroje. Įdėklus reikėtų apžiūrėti prieš sėjimą, siekiant įsitikinti, kad visi pažeidimai, užregistruoti 30 pastraipoje aprašytos apžiūros metu, atsirado dėl apdorojimo veiksmų.

MDCK ląstelių kultūras reikėtų laikyti inkubatoriuose, drėgnoje atmosferoje, turinčioje 5 % ± 1 % CO_2, ir 37 ± 1 °C temperatūroje. Ląstelės neturėtų būti užkrėstos bakterijomis, virusais, mikoplazma ar grybeliais.

Bandomųjų ir kontrolinių cheminių medžiagų įterpimas

Kiekvienam bandymui reikėtų paruošti naują bandomosios cheminės medžiagos pradinį tirpalą ir jį panaudoti ne vėliau kaip per 30 min nuo paruošimo. Bandomąsias chemines medžiagas reikėtų ruošti kalcio jonų turinčiame (1,0–1,8 mmol/l koncentracijos) *Hankso* subalansuotame druskos tirpale (HBSS) be fenolio raudonojo, kad būtų išvengta serumo baltymų surišimo. Prieš bandymus reikėtų įvertinti, ar cheminės medžiagos tirpumas HBSS yra 250 mg/ml. Jei būdama tokios koncentracijos cheminė medžiaga sudaro stabilią suspensiją ar emulsiją (t. y. užtikrina vienalytiškumą ir neiškrenta į nuosėdas ar nesudaro daugiau kaip vienos fazės) ilgiau kaip 30 min, HBSS vis dar gali būti naudojamas kaip tirpiklis. Tačiau jei nustatoma, kad cheminė medžiaga neištirpsta HBSS tokiai koncentracijai gauti, reikėtų pagalvoti apie tai, ar nereikėtų taikyti kitus nei FL metodus. Į galimybę naudoti lengvąją mineralinę alyvą kaip tirpiklį, jei nustatoma, kad cheminė medžiaga netirpsta HBSS, reikėtų žiūrėti atsargiai, nes nėra pakankamai duomenų išvadai apie FL bandymo charakteristikas tokiomis sąlygomis padaryti.

Visos cheminės medžiagos, kurias reikia bandyti, ruošiamos pradinį tirpalą skiedžiant steriliu kalcio jonų turinčiu (1,0–1,8 mmol/l koncentracijos) HBSS be fenolio raudonojo, kad būtų gauti penki pastovių verčių masės tūrinės koncentracijos tirpalai: 1, 25, 100, 250 mg/ml, gryna medžiaga arba sotus tirpalas. Bandant kietąją cheminę medžiagą, reikėtų įtraukti labai didelę 750 mg/ml koncentraciją. Tokios koncentracijos cheminę medžiagą gali tekti lašinti ant ląstelių stūmokline pipete. Jei nustatoma, kad toksiškumas pasireiškia nuo 25 iki 100 mg/ml, šias papildomas koncentracijos vertes reikėtų bandyti du kartus: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. FL_{20} vertė turėtų būti gauta pagal šias koncentracijos vertes, jei yra įvykdyti priimtinumo kriterijai.

Prieš susiliejusius ląstelių monosluoksnius apdorojant bandomąja chemine medžiaga, pašalinama ląstelių kultūros terpė ir sluoksniai plaunami du kartus steriliu, šiltu (37 °C), kalcio jonų turinčiu (1,0–1,8 mmol/l koncentracijos) HBSS be fenolio raudonojo. Prieš tai filtrai vizualiai patikrinami, ar nėra pažeidimų, kurie galėtų būti klaidingai priskirti galimiems nesuderinamumams su

▼M7

bandomąja chemine medžiaga. Atliekant kiekvieną bandymą, reikėtų naudoti ne mažiau kaip tris kartotinius kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ir kontrolinius ėminius. Po 1 min veikimo kambario temperatūroje bandomoji cheminė medžiaga atsargiai pašalinama nusiurbiant, monosluoksnis plaunamas du kartus steriliu, šiltu (37 °C), kalcio jonų turinčiu (1,0–1,8 mmol/l koncentracijos) HBSS be fenolio raudonojo, ir nedelsiant matuojamas nuotėkis.

Atliekant kiekvieną bandymą, reikėtų naudoti vienalaikius neigiamus (NC) ir teigiamus (PC) kontrolinius ėminius, siekiant įrodyti, kad monosluoksnio vientisumas (NC) ir ląstelių jautris (PC) atitinka apibrėžtą istorinį priimtinumo intervalą. Siūloma PC cheminė medžiaga yra 100 mg/ml koncentracijos Brij 35 (CAS Nr. 9002-92-0). Esant šiai koncentracijai, turėtų būti gautas maždaug 30 % fluoresceino nuotėkis (priimtinas intervalas – 20–40 % fluoresceino nuotėkis, t. y. ląstelių sluoksnio pažeidimas). Siūloma NC cheminė medžiaga yra kalcio jonų turintis (1,0–1,8 mmol/l koncentracijos) HBSS be fenolio raudonojo (neapdorotas, tuščiasis kontrolinis ėminys). Taip pat į kiekvieną bandymą reikėtų įtraukti maksimalaus nuotėkio kontrolinį ėminį, kad būtų galima apskaičiuoti FL_{20} vertes. Maksimalus nuotėkis nustatomas naudojant kontrolinį įdėklą be ląstelių.

Fluoresceino pralaidumo nustatymas

Pašalinus bandomąją ir kontrolines chemines medžiagas, į įdėklus (pvz., Millicell-HA) iškart įpilama 400 µl 0,1 mg/ml fluoresceino natrio druskos tirpalo (0,01 % (m/V) kalcio jonų turinčiame (1,0–1,8 mmol/l koncentracijos) HBSS be fenolio raudonojo. Kultūros laikomos 30 min kambario temperatūroje. Pasibaigus inkubavimui su fluoresceinu, įdėklai atsargiai išimami iš kiekvienos duobutės. Kiekvienas filtras vizualiai patikrinamas ir registruojami visi pažeidimai, kurie galėjo atsirasti atliekant apdorojimo veiksmus.

Kiekybiškai įvertinamas per monosluoksnį ir įdėklą prasiskverbusio fluoresceino kiekis tirpale, kuris liko duobutėse iš jų išėmus įdėklus. Matuojama spektrofluorimetru esant 485 nm sužadinimo ir 530 nm emisijos bangų ilgiams. Turėtų būti nustatytas toks spektrofluorimetro jautris, kad būtų didžiausias skaitmeninis skirtumas tarp maksimalaus FL (įdėklo be ląstelių) ir minimalaus FL (įdėklo su susiliejusiu monosluoksniu, apdorotu NC). Dėl skirtumų tarp naudojamų spektrofluorimetrų patariama naudoti tokį jautrį, kad maksimalaus fluoresceino nuotėkio ėminiui fluorescencijos intensyvumas būtų > 4 000. Maksimali FL vertė neturėtų būti didesnė kaip 9 999. Maksimalaus fluoresceino nuotėkio ėminio fluorescencijos intensyvumas turėtų atitikti naudojamo spektrofluorimetro tiesinį intervalą.

Rezultatų aiškinimas ir prognozavimo modelis

FL kiekis yra proporcingas sandarių jungčių pažeidimui, kurį sukelia cheminė medžiaga. Cheminės medžiagos kiekvienos bandymo koncentracijos procentinė FL vertė apskaičiuojama pagal bandomajai cheminei medžiagai gautas FL vertes, palygintas su FL vertėmis, gautomis NC (rodmuo, gautas susiliejusio monosluoksnio ląstelėms, apdorotoms NC) ir maksimalaus nuotėkio kontroliniam ėminiui (rodmuo, gautas FL nuotėkiui per įdėklą be ląstelių).

Maksimalaus nuotėkio fluorescencijos intensyvumas = x,

0 % nuotėkio vidutinis fluorescencijos intensyvumas (NC) = y.

Vidutinis 100 % nuotėkis gaunamas atimant vidutinį 0 % nuotėkį iš vidutinio maksimalaus nuotėkio,

t. y. $x - y = z$.

Kiekvienos tam tikros dozės procentinė nuotėkio vertė gaunama 0 % nuotėkio vertę atimant iš trijų kartotinių fluorescencijos intensyvumo rodmenų vidurkio (m), ir šią vertę dalijant iš 100 % nuotėkio vertės, t. y. % FL = $[(m - y)/z] \times 100$ %, čia:

▼M7

M– naudotos koncentracijos trijų kartotinių matavimų vidutinis fluorescencijos intensyvumas;

% FL– fluoresceino kiekis, kuris prasiskverbia per ląstelių sluoksnį.

Cheminės medžiagos koncentraciją, kuriai esant sukeliamas 20 % FL, reikėtų apskaičiuoti pagal šią lygtį:

$FL_D = [(A–B) / (C–B)] \times (M_C – M_B) + M_B$,

čia:

D – slopinimas, %;

A – pažeidimas, % (20 % fluoresceino nuotėkis)

B – fluoresceino nuotėkis < A, %;

C – fluoresceino nuotėkis > A, %.

M_C – C koncentracija (mg/ml);

M_B – B koncentracija (mg/ml).

FL_{20} ribinė vertė prognozuojant akis ėsdinančias ar stipriai dirginančias chemines medžiagas pateikta toliau:

FL_{20} (mg/ml)	JT GHS C&L	ES CLP C&L	JAV AAA C&L
≤ 100	1 kategorija	1 kategorija	I kategorija

C&L – klasifikavimas ir ženklinimas.

FL bandymų metodas yra rekomenduojamas tik vandenyje tirpioms akis ėsdinančioms ir stipriai dirginančioms cheminėms medžiagoms identifikuoti (JT GHS 1 kategorijos, ES CLP 1 kategorijos, JAV AAA I kategorijos) (žr. 1 ir 10 pastraipas).

Vandenyje tirpioms bandomosioms cheminėms medžiagoms (medžiagoms ir mišiniams) reikėtų gauti FL_{20} vertę ≤ 100 mg/ml, kad jas būtų galima identifikuoti kaip „sukeliančias smarkius akių pažeidimus“ (JT GHS ar ES CLP 1 kategorijos) ar kaip „akis ėsdinančias ar stipriai dirginančias“ (JAV AAA I kategorijos) (3) (6) (7).

Rezultatų priimtinumas

Vidutinė maksimali fluoresceino nuotėkio vertė (x) turėtų būti didesnė kaip 4 000 (žr. 31 pastraipą), vidutinė 0 % nuotėkio vertė (y) turėtų būti lygi 300 arba mažesnė, o vidutinė 100 % nuotėkio vertė (z) turėtų būti nuo 3 700 iki 6 000.

Bandymas laikomas priimtinu, jei teigiamam kontroliniam ėminiui buvo gautas 20 %–40 % ląstelių sluoksnio pažeidimas (išmatuotas kaip fluoresceino nuotėkis, %).

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenys

Ataskaitoje lentelės forma reikėtų pateikti kiekvieno bandymo kiekvieno kartotinio ėminio duobutei gautus duomenis (pvz., kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos fluorescencijos intensyvumo vertes ir apskaičiuotas FL duomenų procentines vertes, įskaitant klasifikavimą). Be to, reikėtų pateikti kiekvieno bandymo atskirų kartotinių matavimų vidurkius ± standartinį nuokrypį.

▼M7

Bandymo ataskaita

Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomosios ir kontrolinės cheminės medžiagos:

— cheminės medžiagos pavadinimas (-ai), pvz., Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos (angl. *Chemical Abstracts Service*, CAS) naudojamas struktūrinis pavadinimas ir kiti pavadinimai, jei jie žinomi;

— cheminės medžiagos CAS numeris, jei žinomas;

— cheminės medžiagos arba mišinio grynumas ir sudėtis (masės procentinėmis dalimis), kiek tai žinoma remiantis turima informacija;

— fizikinės ir cheminės savybės, svarbios atliekamam tyrimui (pvz., agregatinė būsena, lakumas, pH, stabilumas, tirpumas vandenyje, cheminė klasė),

— bandomųjų ir (arba) kontrolinių cheminių medžiagų apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas);

— laikymo sąlygos.

Taikyto bandymų metodo ir protokolo pagrindimas

— Turėtų būti įtraukti aspektai, susiję su bandymų metodo taikymo sritimi ir apribojimais.

Bandymo sąlygos

— naudotos ląstelių sistemos aprašymas, įskaitant autentiškumo sertifikatą ir ląstelių linijos mikoplazmos būseną;

— išsamūs taikytos procedūros duomenys;

— naudota (-os) bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertė (ės);

— veikimo bandomąja chemine medžiaga trukmė;

— inkubavimo su fluoresceinu trukmė;

— visų bandymo procedūros pakeitimų aprašymas;

— taikytų vertinimo kriterijų aprašymas.

— nuoroda į modelio istorinius duomenis (pvz., neigiami ir teigiami kontroliniai ėminiai, palyginamosios cheminės medžiagos, jei tinka);

— informacija apie laboratorijos įrodytą techninę kvalifikaciją.

Rezultatai

— Lentelė, kurioje pateikti atskirų bandomųjų cheminių medžiagų ir kontrolinių ėminių kiekvieno bandymo ir kiekvieno kartotinio ėminio duomenys (įskaitant atskirus rezultatus, vidurkius ir standartinius nuokrypius);

— gautas klasifikavimas su nuoroda į prognozavimo modelį ir (arba) taikyti sprendimo priėmimo kriterijai;

— kitų pastebėtų reiškinių aprašymas.

▼M7

Rezultatų aptarimas

— Turėtų būti įtraukti aspektai, susiję su negalutiniu rezultatu (35 pastraipa: FL_{20} > 100 mg/ml) ir papildomais bandymais.

Išvados

LITERATŪRA

(1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

(2) U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(3) EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.

(4) Scott, L. *et al.* (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches, *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9

(5) Šio priedo B.5 skyrius. Ūmus toksiškumas. Akių dirginimas ar ėsdinimas

(6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Available at: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu

(7) EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.

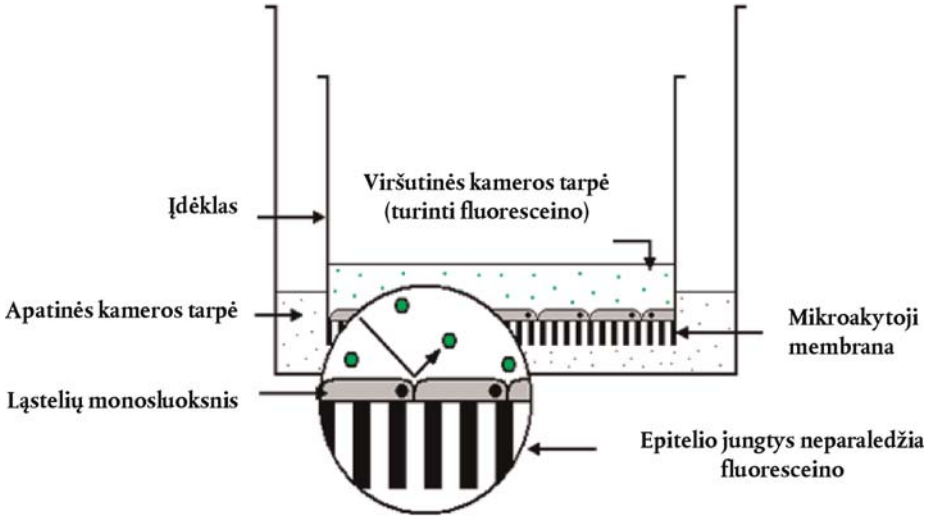
(8) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris.

▼M7

1 priedėlis

FL BANDYMŲ METODUI SKIRTŲ MDCK LĄSTELIŲ AUGINIMO ANT ĮDĖKLO MEMBRANOS SCHEMA

Susiliejantis MDCK ląstelių sluoksnis auginamas ant pusiau pralaidžios įdėklo membranos. Įdėklai dedami į 24 duobučių plokštelių duobutes.



Paveikslas paimtas iš: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.

▼M7

2 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo metodo taikymo charakteristikų matas ir vienas iš „tinkamumo“ aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „atitiktis“ tinkamų bandymo metodo rezultatų daliai išreikšti.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

AAA (angl. *Environmental Protection Agency*, EPA) I kategorijos – cheminės medžiagos, kurios sukelia ėsdinamąjį pažeidimą (negrįžtamą akies audinio suardymą) arba ragenos pažeidimą ar dirginimą, kuris trunka ilgiau kaip 21 parą (2).

ES CLP (Reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo) – įgyvendina JT GHS cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimo sistemą Europos Sąjungoje (ES).

Klaidingai neigiamų rezultatų dalis – visų teigiamų cheminių medžiagų, kurios taikant bandymų metodą klaidingai identifikuotos kaip neigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo metodo taikymo charakteristikų rodiklių.

Klaidingai teigiamų rezultatų dalis – visų neigiamų cheminių medžiagų, kurios taikant bandymų metodą klaidingai identifikuotos kaip teigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo metodo taikymo charakteristikų rodiklių.

FL_{20} – bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, kuriai esant sukeliamas 20 % fluoresceino nuotėkis per ląstelių sluoksnį, įvertis.

Fluoresceino nuotėkis – per ląstelių sluoksnį prasiskverbusio fluoresceino kiekis, išmatuotas spektrofluorimetriniu metodu.

GHS (Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema) – sistema, kurioje pateikiamas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimas pagal standartizuotus fizikinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir nagrinėjami atitinkami informaciniai elementai, pvz., piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojingumo frazės, atsargumo frazės ir saugos duomenų lapai, kad būtų galima informuoti apie medžiagų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbuotojus, darbininkus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likvidatorius) ir aplinką (1).

JT GHS 1 kategorija – akies audinio pažeidimo arba smarkaus fizinio regėjimo pablogėjimo, ant išorinio akies paviršiaus uždėjus bandomosios cheminės medžiagos, iki galo nepraeinančio per 21 dieną nuo uždėjimo, kategorija.

Pavojus – būdingoji agento savybė arba situacija, galinti sukelti neigiamų padarinių, kai organizmą, sistemą ar populiaciją (arba jos dalį) veikia tas agentas.

Mišinys – JT GHS kontekste tai yra iš dviejų arba daugiau medžiagų sudarytas mišinys arba tirpalas, kuriame jos nereaguoja.

Neigiamas kontrolinis ėminys – neapdorotas kartotinis ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus. Šis ėminys tiriamas kartu su bandomąja chemine medžiaga apdorotais ėminiais ir kitais kontroliniais ėminiais, siekiant nustatyti, ar vyksta tirpiklio sąveika su bandymo sistema.

▼M7

Neklasifikuojamos – cheminės medžiagos, kurios neklasifikuojamos kaip JT GHS 1, 2A ar 2B kategorijos; ES CLP 1 ar 2 kategorijos arba JAV AAA I, II ar III kategorijos akis dirginančios medžiagos.

Akis ėsdinanti cheminė medžiaga – a) cheminė medžiaga, kuri sukelia negrįžtamąjį akies audinio pažeidimą; b) cheminės medžiagos, kurios klasifikuojamos kaip JT GHS 1 kategorijos, ES CLP 1 kategorijos ar JAV AAA I kategorijos akis dirginančios medžiagos.

Akis dirginanti cheminė medžiaga – a) cheminė medžiaga, kuri sukelia grįžtamuosius akies pokyčius jos uždėjus ant priekinio akies paviršiaus; b) cheminės medžiagos, kurios klasifikuojamos kaip JT GHS 2A ar 2B kategorijos, ES CLP 2 kategorijos ar JAV AAA II ar III kategorijos akis dirginančios medžiagos.

Akis stipriai dirginančios medžiagos – a) cheminės medžiagos, kurios sukelia akies audinių pažeidimą, neišnykstantį per 21 parą nuo įterpimo, arba sukelia smarkų fizinį regėjimo pablogėjimą; b) cheminės medžiagos, kurios klasifikuojamos kaip JT GHS 1 kategorijos, ES CLP 1 kategorijos arba JAV AAA I kategorijos akis dirginančios medžiagos.

Teigiamas kontrolinis ėminys – kartotinis ėminys, turintis visus bandymo sistemos komponentus ir apdorotas chemine medžiaga, kuri yra žinoma kaip sukelianti teigiamą atsaką. Siekiant užtikrinti galimybę vertinti teigiamo kontrolinio ėminio atsako kintamumą per tam tikrą laiką, teigiamas atsakas neturėtų būti per stiprus.

Kvalifikacijai tikrinti skirtos cheminės medžiagos – cheminių medžiagų grupė, pasirinkta iš sąrašo etaloninių cheminių medžiagų, kurias patirties neturinti laboratorija, taikydama patvirtinto tinkamumo bandymų metodą, gali naudoti savo kvalifikacijai įrodyti.

Tinkamumas – santykio tarp bandymo ir tiriamo poveikio bei bandymo reikšmingumo bei naudingumo siekiant tam tikro tikslo apibūdinimas. Tai yra atliekant bandymą tiriamo biologinio poveikio matavimo ar prognozavimo tikslumo laipsnis. Tinkamumas aprėpia bandymų metodo tikslumo (atitikties) aspektą (8).

Patikimumas – pagal tą patį protokolą atliekamo bandymų metodo, tam tikrą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų, atkuriamumo laipsnio matas. Jis įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų ir pakartojamumą laboratorijoje.

Pakaitinis bandymas – bandymas, kuris skirtas pakeisti bandymą, įprastiniu būdu naudojamą ir pripažintą tinkamu pavojui identifikuoti ir (arba) rizikai įvertinti, ir kuris nustatytas kaip bandymas, užtikrinantis lygiavertę ar geresnę, palyginti su patvirtintu bandymu, žmonių ar gyvūnų sveikatos arba aplinkos apsaugą, jei tinka, esant visoms galimoms bandymo aplinkybėms ir bandomosioms cheminėms medžiagoms.

Jautris – visų teigiamų ar veikliųjų cheminių medžiagų, kurios buvo tiksliai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymų metodo, kuriuo gaunami kategorijos nustatymo rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymų metodo tinkamumą (8).

Smarkus akių pažeidimas – tai akies audinio pažeidimas arba smarkus fizinis regėjimo pablogėjimas, ant išorinio akies paviršiaus uždėjus bandomosios cheminės medžiagos, kurie nevisiškai išnyksta praėjus 21 parai nuo uždėjimo.

Tirpiklio ar nešiklio kontrolinis ėminys – visus bandymo sistemos komponentus, įskaitant tirpiklį ar nešiklį, turintis neapdorotas ėminys, kuris tiriamas kartu su bandomąja chemine medžiaga apdorotais ėminiais ir kitais kontroliniais ėminiais, siekiant nustatyti atskaitos vertę ėminiams, apdorotiems bandomąja

▼M7

chemine medžiaga, ištirpinta tame pačiame tirpiklyje ar nešiklyje. Kai bandomas kartu su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu, šis ėminys taip pat parodo, ar vyksta tirpiklio arba nešiklio sąveika su bandymo sistema.

Specifiškumas – visų neigiamų ar neveikliųjų cheminių medžiagų, kurios buvo tiksliai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymų metodo, kuriuo gaunami kategorijos nustatymo rezultatai, tikslumo matas ir svarbus aspektas vertinant bandymų metodo tinkamumą.

Medžiaga – gamtoje randami arba gamybos procese gaunami cheminiai elementai ir jų junginiai, naudojami JT GHS kontekste, įskaitant visus priedus, kurių reikia produkto stabilumui užtikrinti, ir visas priemaišas, patenkančias į produktą taikomo proceso metu, tačiau neįskaitant tirpiklio, kurį galima atskirti, nepaveikiant medžiagos stabilumo ar nekeičiant jos sudėties.

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Nuosekliųjų bandymų strategija – pakopomis atliekamų bandymų strategija, kai tam tikra eilės tvarka nagrinėjama visa turima informacija apie bandomąją cheminę medžiagą, kiekvienoje pakopoje taikant įrodomosios vertės analizės procesą, siekiant nustatyti, ar yra pakankamai duomenų sprendimui dėl pavojingumo kategorijos priimti, prieš pereinant prie kitos pakopos. Jei bandomajai cheminei medžiagai dirginamąją gebą galima priskirti atsižvelgiant į turimą informaciją, papildomų bandymų atlikti nereikia. Jei, atsižvelgiant į turimą informaciją, bandomajai cheminei medžiagai dirginamosios gebos priskirti neįmanoma, taikoma nuosekliųjų bandymų su gyvūnais procedūra tol, kol būtų galima gauti nedviprasmį klasifikavimą.

Patvirtinto tinkamumo bandymų metodas – bandymų metodas, kurio tinkamumo tam tikram tikslui pasiekti patvirtinimo tyrimai buvo atlikti, nustatant tinkamumą (įskaitant tikslumą) ir patikimumą. Svarbu pažymėti, kad patvirtinto tinkamumo bandymo metodo tikslumo ir patikimumo charakteristikos gali būti nepakankamos, kad jį būtų galima laikyti priimtinu siūlomam tikslui pasiekti (8).

Įrodomoji duomenų galia – įvairių informacijos dalių pranašumų ir trūkumų nagrinėjimo procesas priimant ir patvirtinant sprendimą dėl cheminės medžiagos pavojingumo.

▼M7

3 priedėlis

CHEMINĖS MEDŽIAGOS, SKIRTOS KVALIFIKACIJAI TIKRINTI TAIKANT FL BANDYMŲ METODĄ

Prieš pradėdamos įprastiniu būdu taikyti šį bandymų metodą, laboratorijos turėtų įrodyti savo techninę kvalifikaciją, tinkamai nustatydamos 1 lentelėje rekomenduojamų 8 cheminių medžiagų akių ėsdinimo klasifikavimą. Šios cheminės medžiagos buvo parinktos taip, kad atitiktų atsako į vietinį akių dirginimą ir (arba) ėsdinimą intervalą, atsižvelgiant į triušio akių bandymų *in vivo* (TG 405, TM B.5 (5)) rezultatus (t. y. 1, 2A, 2B kategorijos arba neklasifikuojamas pagal JT GHS ir ES CLP. Tačiau, atsižvelgiant į patvirtintą FL bandymo naudingumą (t. y. identifikuoti tik ėsdinančias ir stipriai dirginančias chemines medžiagas), yra tik du klasifikavimui tinkami bandymų rezultatai (ėsdinančios ir (arba) stipriai dirginančios arba neėsdinančios ir (arba) stipriai nedirginančios), kad būtų galima įrodyti kvalifikaciją. Kiti atrankos kriterijai buvo galimybė pirkti chemines medžiagas ir tai, ar galima gauti aukštos kokybės duomenis *in vivo* bei aukštos kokybės FL bandymų metodo duomenis. Dėl šios priežasties kvalifikacijai tikrinti skirtos cheminės medžiagos buvo parinktos iš *Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing* (8) dokumento, kuris buvo naudojamas FL bandymų metodo retrospektyviam tinkamumo patvirtinimui.

1 lentelė

Cheminės medžiagos, rekomenduojamos techninei kvalifikacijai tikrinti taikant FL

Cheminė medžiaga	CAS Nr.	Cheminė klasė (1)	Agregatinė būsena	Klasifikavimas *in vivo* (2)	Klasifikavimas *in vitro* (3)
Benzalkonio chloridas (5 %)	8001-54-5	Onio junginys	Skystis	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
Prometazino hidrochloridas	58-33-3	Aminas ar amidinas, heterociklinis junginys, organinis sieros junginys	Kietoji medžiaga	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
Natrio hidroksidas (10 %)	1310-73-2	Šarmas	Skystis	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
Natrio laurilulfatas (15 %)	151-21-3	Karboksirūgštis (druska)	Skystis	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
4-karboksibenz aldehidas	619-66-9	Karboksirūgštis, aldehidas	Kietoji medžiaga	2 (A) kategorija	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti
Amonio nitratas	6484-52-2	Neorganinė druska	Kietoji medžiaga	2 (A) kategorija	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti
Etil-2-metilaceto acetatas	609-14-3	Ketonas, esteris	Skystis	2 (B) kategorija	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti
Glicerolis	56-81-5	Alkoholis	Skystis	Be kategorijos	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti

Santrumpos: CAS Nr. – Cheminių medžiagų pavadinimų santrumpų tarnybos registracijos numeris.

(1) Kiekviena bandomoji cheminė medžiaga priskirta cheminių junginių klasei taikant standartinę klasifikavimo sistemą, pagrįstą Vaistų mediciniių dalykinių antraščių (MeSH) nacionalinės bibliotekos klasifikavimo sistema (available at http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Atsižvelgiant į rezultatus, gautus atlikus triušio akies *in vivo* bandymą (EBPO TG 405, TM B.5) ir taikant JT GHS bei ES CLP.

(3) Atsižvelgiant į rezultatus, gautus taikant FL (INVITTOX protokolas Nr. 71(6)).

▼M7

B.62. ŽINDUOLIŲ LĄSTELIŲ BANDYMAS IN VIVO KOMETŲ METODU ŠARMINĖMIS SĄLYGOMIS

ĮVADAS

Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) 489 (2016). Kometų bandymas *in vivo* šarminėmis sąlygomis (pavienių ląstelių gelio elektroforezė) (toliau tiesiog vadinamas kometų bandymu) naudojamas DNR gijų trūkiams aptikti ląstelėse ar branduoliuose, išskirtuose iš daugelio gyvūnų, dažniausiai graužikų, audinių, kurie buvo veikiami galimai genotoksine (-ėmis) medžiaga (-omis). Kometų bandymą peržiūrėjo ir rekomendacijas paskelbė įvairių ekspertų grupės (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Šis bandymų metodas yra genetinės toksikologijos metodų serijos dalis. Yra parengtas EBPO dokumentas, kuriame glaustai pateikiama informacijos apie genetinės toksikologijos bandymus ir naujausių šių gairių pakeitimų apžvalga (11).

Šio kometų bandymo tikslas – identifikuoti chemines medžiagas, kurios sukelia DNR pažaidas. Atliekant kometų bandymą šarminėmis sąlygomis (> pH 13), galima aptikti vienos ir dviejų gijų trūkius dėl, pvz., tiesioginės sąveikos su DNR, šarmams jautrių vietų arba pereinamuosius DNR trūkius, susijusius su DNR ekscizine reparacija. Šie gijų trūkiai gali būti pataisyti, bet poveikis būtų ne nuolatinis, todėl tai gali būti mirtina ląstelei arba likti kaip mutacija, kuri vyktų kaip nuolatinis gyvybingas kitimas. Dėl jų taip pat gali atsirasti chromosomų pažeidimas, kuris taip pat yra susijęs su daugeliu žmonių ligų, įskaitant vėžį.

Graužikų kometų bandymo *in vivo* oficialus tinkamumo patvirtinimo tyrimas buvo atliekamas 2006–2012 m., jį koordinavo Japonijos alternatyvių metodų patvirtinimo centras (angl. *Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods*, JaCVAM) kartu su Europos alternatyvių metodų patvirtinimo centru (angl. *European Centre for the Validation of Alternative Methods*, Alternatyvių metodų patvirtinimo tarpžinybinio koordinavimo komitetu (angl. *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, ICCVAM) ir Nacionalinės toksikologijos programos alternatyvių toksikologinių metodų patvirtinimo tarpžinybinio koordinavimo komitetu (angl. NTP *Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods* (NICEATM) (12). Į šį bandymų metodą įtrauktas kometų bandymo rekomenduojamas taikymas ir apribojimai, jis yra pagrįstas galutiniu protokolu (12), naudotu atliekant tinkamumo patvirtinimo tyrimą, ir susijusiais papildomais paskelbtais bei nepaskelbtais (laboratorijų nuosavybės teisėmis turimais) duomenimis.

Pagrindinių terminų apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje. Reikia pažymėti, kad šiam bandymui atlikti galima naudoti daug skirtingų sistemų (mikroskopo objektiniai stikleliai, gelio dėmės, 96 duobučių plokštelės ir kt.) Patogumo dėlei toliau šiame dokumente vartojamas terminas objektinis stiklelis, bet jis taip pat aprėpia visas kitas sistemas.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

Kometų bandymas yra eukariotinių ląstelių DNR gijų trūkių matavimo metodas. Atliekama ant objektinio stiklelio į agarozę įlietų pavienių ląstelių ar branduolių lizė plovikliu ir didelės koncentracijos druska. Šiame lizės etape suyra ląstelių ir branduolių membranos ir galima išskirti DNR spiralių kilpas, kurios paprastai vadinamos nukleotidais ir DNR fragmentais. Atliekant elektroforezę esant didelei pH vertei, susidaro į kometas panašios struktūros, kurias galima stebėti fluorescencinės mikroskopijos metodu naudojant atitinkamus fluorescencinius dažus; DNR fragmentai, priklausomai nuo jų dydžio, migruoja nuo „galvos“ link „uodegos“, o kometos uodegos fluorescencijos intensyvumas palyginti su suminiu intensyvumu (galvos ir uodegos) rodo DNR trūkio dydį (13) (14) (15).

Kometų bandymas *in vivo* šarminėmis sąlygomis ypač tinka įvertinant genotoksinį pavojų, kai bandymo atsakai priklauso nuo absorbcijos, pasiskirstymo, metabolizmo ir šalinimo (angl. *absorption, distribution, metabolism, excretion*, ADME) *in vivo*, taip pat nuo DNR reparacijos procesų. Šie dalykai gali skirtis tarp rūšių, tarp audinių ir tarp DNR pažaidų tipų.

▼M7

Siekiant atitikti gyvūnų gerovės reikalavimus, ypač dėl jų naudojimo mažinimo (laikantis 3R principo – pakeitimas, mažinimas, tobulinimas (angl. *Replacement, Reduction, Refinement*)), šį bandymą taip pat galima integruoti su kitais toksikologiniais tyrimais, pvz., kartotinės dozės toksiškumo tyrimais (10) (16) (17), arba vertinamąją baigtį galima derinti su kitomis genotoksiškumo vertinamosiomis baigtimis, pvz., žinduolių eritrocitų mikrobranduolių bandymo *in vivo* baigtimis (18) (19) (20). Kometų bandymas dažniausiai atliekamas su graužikais, tačiau jis buvo taikomas kitoms žinduolių ir ne žinduolių rūšims. Kitų nei graužikai rūšių naudojimas kiekvienu atskiru atveju turėtų būti pagrįstas moksliniu ir etiniu požiūriu; kometų bandymą su kitomis nei graužikai rūšimis primygtinai rekomenduojama atlikti tik kaip kito toksiškumo tyrimo dalį, o ne kaip atskirą bandymą.

Veikimo būdą ir tiriamą (-us) audinį (-ius) reikėtų pasirinkti atsižvelgiant į visas turimas ar esamas žinias apie bandomąją cheminę medžiagą, pvz., numatomą ar tikėtiną žmonių veikimo būdą, metabolizmą ir pasiskirstymą, poveikio sąlyčio vietoje galimybę, struktūrinius toksiškumo požymius, kitus genotoksiškumo ar toksiškumo duomenis ir tyrimo tikslą. Todėl tam tikrais atvejais bandomosios cheminės medžiagos genotoksinis potencialas gali būti tikrinamas tiriant kancerogeninį ir (arba) kitą toksinį poveikį tiksliniame (-iuose) audinyje (-iuose). Bandymas taip pat yra naudingas toliau tiriant genotoksiškumą, aptiktą *in vitro* sistema. Tiriamo audinio kometų bandymą *in vivo* reikia atlikti tada, kai galima pagrįstai tikėtis, kad tiriamas audinys bus veikiamas tinkamu būdu.

Bandymo tinkamumas buvo išsamiai patvirtintas atliekant tarplaboratorinius žiurkių patinų somatinių audinių tyrimus, pvz., JaCVAM (12) ir Rothfuss *et al*., 2010 (10) tyrimus. Atliekant JaCVAM tarptautinį tinkamumo patvirtinimo tyrimą buvo naudojamos kepenys ir skrandis. Kepenys buvo pasirinktos todėl, kad jos yra aktyviausias cheminių medžiagų metabolizme dalyvaujantis organas, taip pat dažnai yra kancerogeniškumo tikslinis audinys. Skrandis pasirinktas todėl, kad jis yra pirmoji sąlyčio su chemine medžiaga vieta, kai ji patenka per burną, nors į kitas virškinimo trakto zonas, pvz., dvylikapirštę žarną ir tuščiąją žarną, taip pat reikėtų žiūrėti kaip į sąlyčio vietos audinius ir jos gali būti laikomos svabesnėmis žmonėms nei graužikų liaukinis skrandis. Reikėtų imtis priemonių užtikrinti, kad tokie audiniai nebūtų veikiami ypač didelės koncentracijos bandomąja chemine medžiaga (21). Metodas iš esmės tinka visiems audiniams, iš kurių galima gauti analizei tinkamas pavienių ląstelių ar branduolių suspensijas. Kelių laboratorijų nuosavybės teise turimi duomenys rodo jo sėkmingą taikymą daugeliui skirtingų audinių ir yra daug leidinių, kuriuose pateikta įrodymų, kad metodas tinka kitiems nei kepenys ar skrandis organams ir audiniams, pvz., tuščiajai žarnai (22), inkstams (23) (24), odai (25) (26), šlapimo pūslei (27) (28), plaučių ir bronchų bei alveolių išplovų ląstelėms (tinka įkvėptų cheminių medžiagų tyrimams) (29) (30), be to, bandymai buvo atlikti du daugeliu kitų organų (31) (32).

Nors gali būti įdomu tirti genotoksinį poveikį embrioninėms ląstelėms, reikėtų pažymėti, kad šiame bandymų metode aprašytas standartinis kometų bandymas šarminėje terpėje nelaikomas tinkamu subrendusių embrioninių ląstelių DNR gijų trūkiams matuoti. Kadangi literatūros apžvalgoje dėl kometų bandymo naudojimo tiriant embrioninių ląstelių genotoksiškumą buvo pranešta apie didelius ir kintamus DNR pažaidų lygius (33), manoma, kad prieš įtraukiant subrendusių embrioninių ląstelių (pvz., spermos) kometų bandymą į bandymų metodą, būtina protokolą modifikuoti ir atlikti patobulintus standartizavimo ir tinkamumo patvirtinimo tyrimus. Be to, šiame bandymų metode aprašyta rekomenduojama veikimo schema nėra optimali ir galbūt būtų būtina ilgesnė veikimo ar ėminių ėmimo trukmė, kad būtų galima atlikti subrendusių spermatozoidų DNR gijų trūkių reikšmingą analizę. Literatūroje yra aprašytas genotoksinis poveikis, išmatuotas skirtingais diferenciacijos etapais atliekant sėklidžių ląstelių kometų bandymą (34) (35). Tačiau reikėtų pažymėti, kad lytinės liaukos turi somatinių ir embrioninių ląstelių mišinį. Dėl šios priežasties visai lytinei liaukai (sėklidei) gauti teigiami rezultatai nebūtinai rodo embrioninių ląstelių pažeidimą; visgi jie rodo, kad bandomoji (-osios) cheminė medžiaga (-os) ir (arba) jos ar jų metabolitai pasiekė lytinę liauką.

▼M7

Taikant kometų bandymo standartines Bandymo sąlygas, skersinių jungčių negalima patikimai aptikti. Tam tikromis pakeistomis Bandymo sąlygomis būtų galima aptikti DNR-DNR ir DNR-baltymo skersines jungtis ir kitas bazių modifikacijas, pvz., oksiduotas bazes (23) (36) (37) (38) (39). Vis dėlto reikėtų atlikti papildomus darbus, kad būtų galima tinkamai apibūdinti būtinus protokolo pakeitimus. Todėl skersines jungtis sudarančių agentų aptikimas nėra pagrindinis čia aprašyto bandymo tikslas. Bandymas netinka, netgi su pakeitimais, aneugenams aptikti.

Atsižvelgiant į šiuo metu turimas žinias, keli papildomi apribojimai (žr. 3 priedėlį) yra susiję su kometų bandymu *in vivo*. Tikimasi ateityje bandymų metodą peržiūrėti ir, atsižvelgiant į įgytą patirtį, prireikus pataisyti.

Prieš taikant bandymų metodą mišiniui, kad būtų gauti numatomo reglamentavimo tikslui skirti duomenys, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, tai dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį.

METODO PRINCIPAS

Gyvūnai veikiami bandomąja chemine medžiaga reikiamu būdu. Išsamus dozavimo ir ėminių ėmimo aprašymas pateiktas 36–40 pastraipose. Pasirinktu (-ais) ėminių ėmimo momentu (-ais) tiriami audiniai išpjaunami ir ruošiamos pavienių ląstelių ar branduolių suspensijos (galima atlikti perfuziją *in situ*, jei manoma, kad tai būtų naudinga, pvz., kepenų) ir įliejamos į minkštąjį agarą, kad jas būtų galima fiksuoti ant objektinių stiklelių. Ląstelės ar branduoliai apdorojamos lizės buferiniu tirpalu, kad būtų pašalintos ląstelių ir (arba) branduolių membranos, ir veikiama stipriais šarmais, pvz., pH $\geq$ 13, kad būtų galima išvyti DNR spiralę ir išlaisvinti išvytų DNR kilpas ir fragmentus. Tada atliekama branduolio DNR elektroforezė. Į fragmentus nesuskilusios normalios DNR molekulės lieka toje vietoje, kurioje agare buvo branduolio DNR, o visos fragmentuotos DNR ir išlaisvintos DNR kilpos migruotų anodo link. Po elektoforezės DNR vizualizuojama naudojant reikiamą fluorescencinį dažą. Preparatus reikėtų analizuoti naudojant mikroskopą ir visiškai ar pusiau automatizuotas vaizdo analizės sistemas. Elektroforezės metu migravusios DNR kiekis ir migracijos atstumas rodo DNR fragmentų kiekį ir dydį. Yra kelios kometų bandymo vertinamosios baigtys. DNR pažaidoms vertinti buvo rekomenduojamas DNR kiekis uodegoje (uodegos procentinė DNR dalis ar uodegos intensyvumo procentinė dalis) (12) (40) (41) (42). Atlikus pakankamo branduolių skaičiaus analizę, duomenys analizuojami tinkamais metodais, kad būtų galima spręsti apie bandymo rezultatus.

Reikėtų pažymėti, kad buvo tiriami įvairūs kintami metodikos aspektai, įskaitant ėminių paruošimą, elektroforezės sąlygas, vizualios analizės parametrus (pvz., dažo intensyvumą, mikroskopo lempos šviesos stiprį, mikroskopo filtrų naudojimą ir dinaminius filmavimo kameros parametrus) ir aplinkos sąlygas (pvz., foninį apšvietimą), ir jie gali daryti įtaką DNR migracijai (43) (44) (45) (46).

LABORATORIJOS KVALIFIKACIJOS TIKRINIMAS

Kiekviena laboratorija turėtų nustatyti savo kompetenciją atliekant kometų bandymą, įrodydama sugebėjimą gauti kiekvienos naudotos rūšies kiekvieno tikslinio audinio pakankamos kokybės pavienių ląstelių ar branduolių suspensijas. Preparatų kokybė bus įvertinta visų pirma pagal nešikliu apdorotiems gyvūnams gautą uodegos DNR procentinę dalį, kurios vertė patektų į atkuriamą mažų verčių intervalą. Šiuo metu turimi duomenys rodo, kad būtų gerai, jei žiurkių kepenims gautos uodegos DNR procentinės dalies grupės vidurkis (pagal medianų vidurkį, žr. 57 pastraipą, kurioje šie terminai išsamiai paaiškinti), būtų ne didesnis kaip 6 %, kuris sutaptų su vertėmis, gautomis atliekant JaCVAM tinkamumo patvirtinimo tyrimą (12) ir su kitais paskelbtais ir nuosavybės teise turimais duomenimis. Šiuo metu nėra pakankamai duomenų, kad būtų galima pateikti rekomendacijas

▼M7

apie kitiems audiniams gautus optimalius arba priimtinus intervalus. Tai netrukdo naudoti kitus audinius, jei būtų pagrįsta. Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta tinkama kometų bandymo naudojant šiuos audinius charakteristikų apžvalga, atsižvelgiant į mokslinėje literatūroje paskelbtus arba nuosavybės teise turimus duomenis. Pirma, pageidautina, kad kontroliniams ėminiams gautą uodegos DNR procentinė dalis būtų maža, nes tai užtikrintų pakankamą dinaminį intervalą teigiamam poveikiui aptikti. Antra, kiekviena laboratorija turėtų gebėti atkurti tikėtinus atsakus į tiesioginius mutagenus ir promutagenus, esant skirtingiems veikimo būdams, kurie pateikti 1 lentelėje (29 pastraipa).

Teigiamas medžiagas galima pasirinkti, pvz., iš naudotų atliekant JaCVAM tinkamumo patvirtinimo tyrimą (12) arba iš kitų paskelbtų duomenų (žr. 9 pastraipą), jei tinka, jas pagrįsti ir parodyti tiriamų audinių aiškius teigiamus atsakus. Reikėtų parodyti gebėjimą nustatyti silpną žinomų mutagenų poveikį, pvz., etilmetansulfonato (EMS) mažomis dozėmis, pvz., nustatant dozės ir atsako priklausomybes, esant reikiamam dozių skaičiui ir tarpams tarp jų. Iš pradžių reikėtų sutelkti dėmesį į kvalifikacijos nustatymą imant dažniausiai naudojamus audinius, pvz,. graužikų kepenis, nes laukiamus rezultatus galima palyginti su esamais duomenimis (12). Kitiems audiniams, pvz., skrandžiui, dvylikapirštei, tuščiajai žarnai ar kraujui gauti duomenys galėtų būti renkami tuo pačiu metu. Laboratorija turi įrodyti kvalifikaciją atlikdama bandymus su kiekvienu numatytu tirti kiekvienos rūšies atskiru audiniu, jai taip pat reikės įrodyti, kad su žinomu mutagenu (pvz., EMS) gali gauti priimtiną teigiamą to audinio atsaką.

Turėtų būti renkami nešiklio ar neigiamų kontrolinių ėminių duomenys, siekiant įrodyti neigiamų duomenų atsakų atkuriamumą ir užtikrinti tinkamą techninių bandymo aspektų kontrolę arba pasiūlyti, kad būtina iš naujo sukurti istorinių kontrolinių ėminių duomenų intervalus (žr. 22 pastraipą).

Reikėtų pažymėti, kad, nors atliekant skrodimą galima paimti daugelį audinių ir apdoroti juos kometų analizei atlikti, laboratorija turi turėti patirties daugelį šių audinių paimti iš vieno gyvūno ir taip užtikrinti, kad bus atsižvelgta į visas galimas DNR pažaidas ir kad kometų analizė nebus sugadinta. Laiko tarpas nuo numarinimo iki apdoroti skirtų audinių pašalinimo gali būti labai svarbus (žr. 44 pastraipą).

Tobulinant šio bandymo atlikimo kvalifikaciją, būtina atsižvelgti į gyvūnų gerovę, todėl galima naudoti kituose bandymuose naudotų gyvūnų audinius, kai reikia įgyti patirties įvairiais bandymo aspektais. Be to, vykdant naujo bandymų metodo įdiegimo laboratorijoje etapus, viso tyrimo atlikti nebūtina, tobulinant būtinus įgūdžius, galima naudoti mažiau gyvūnų ar bandymo koncentracijos verčių.

Istorinių kontrolinių ėminių duomenys

Atlikdama su kvalifikacijos tikrinimu susijusius tyrimus, laboratorija turėtų sukurti istorinių duomenų bazę, kad atitinkamiems audiniams ir rūšims būtų galima nustatyti teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių intervalus ir skirstinius. Rekomendacijas, kaip kurti ir naudoti istorinius duomenis (t. y. duomenų įtraukimo ir pašalinimo iš istorinių duomenų kriterijus ir tam tikro bandymo priimtinumo kriterijus) galima rasti literatūroje (47). Skirtingiems audiniams ir skirtingoms rūšims, taip pat skirtingiems nešikliams ir dozės davimo būdams gali būti gautos skirtingos neigiamų kontrolinių ėminių uodegos DNR procentinės dalies vertės. Todėl svarbu nustatyti neigiamų kontrolinių ėminių intervalus kiekvienam audiniui ir rūšiai. Laboratorijos turėtų taikyti kokybės kontrolės metodus,

▼M7

tokius kaip kontrolinės diagramos (pvz., C tipo ar X juostinės diagramos (48)), kad galėtų nustatyti savo duomenų kintamumą ir įrodyti metodikos „valdomumą“ savo laboratorijoje. Taip pat gali tekti optimizuoti reikiamų teigiamų kontrolinių cheminių medžiagų, dozių intervalų ir Bandymo sąlygų (pvz., elektroforezės sąlygų) pasirinkimą, kad būtų galima aptikti silpną poveikį (žr. 17pastraipą).

Į visus bandymų protokolo pakeitimus reikėtų žiūrėti atsižvelgiant į jų suderinamumą su esamomis laboratorijos istorinių kontrolinių ėminių duomenų bazėmis. Esant didesnėms neatitiktims turėtų būti kuriama nauja istorinių kontrolinių ėminių duomenų bazė.

METODO APRAŠYMAS

Parengiamieji darbai

Gyvūnų rūšies parinkimas

Paprastai naudojamos sveikų jaunų suaugusių graužikų laboratorinės veislės (6–10 savaičių amžiaus nuo apdorojimo pradžios, nors leidžiama naudoti šiek tiek vyresnius gyvūnus). Pasirenkant graužikų rūšį, reikėtų atsižvelgti į i) rūšis, naudotas atliekant toksiškumo tyrimus (kad būtų galima susieti duomenis ir atlikti integruotuosius tyrimus), ii) rūšis, kurioms susidarė augliai tiriant kancerogeniškumą (kancerogenezės mechanizmą) arba iii) rūšis, kurių metabolizmas daugiausiai panašus į žmonių, jei jis žinomas. Atliekant šį bandymą dažniausiai naudojamos žiurkės. Tačiau galima naudoti kitas rūšis, jei jų naudojimas būtų etiškai ir moksliškai pagrįstas.

Gyvūnų laikymo ir šėrimo sąlygos

Jei naudojami graužikai, temperatūra bandymo gyvūnų patalpoje turėtų būti 22 °C (± 3 °C). Nors geriausia būtų užtikrinti 50–60 % santykinę drėgmę, ji neturėtų būti mažesnė kaip 30 % ir būtų gerai, jei ji nebūtų didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos valymo laiką. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, taikant 12 h šviesos ir 12 h tamsos seką. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijose naudojamas pašaras, neribojant geriamojo vandens kiekio. Pašaro pasirinkimui gali turėti įtakos būtinybė užtikrinti tinkamą bandomosios cheminės medžiagos sumaišymą su pašaru, kai ji duodama tokiu būdu. Graužikai turėtų būti laikomi mažomis grupėmis (paprastai ne daugiau kaip po penkis) tos pačios lyties gyvūnus, jei nėra agresyvaus elgesio pavojaus. Tik moksliškai pagrįstais atvejais gyvūnus galima laikyti atskirai. Jei yra galimybė, reikėtų naudoti narvelius su kietomis grindimis, nes tinklinės grindys gali būti sunkių sužeidimų priežastimi (49). Turi būti užtikrinta reikiama pagerinta aplinka.

Gyvūnų paruošimas

Gyvūnai yra atsitiktinai suskirstomi į kontrolines ir apdorojimo grupes. Gyvūnai unikaliai paženklinami ir aklimatizuojami laboratorinėmis sąlygomis ne trumpiau kaip 5 paras iki apdorojimo pradžios. Gyvūnai turi būti paženklinami minimaliai invaziniu būdu. Tinkamiausi būdai būtų žiedavimas, etiketės kabinimas, mikrolusto naudojimas ir biometrinis identifikavimas. Pėdų ar ausų spaustukai nėra moksliškai pagrįsti atliekant šiuos bandymus. Narvelius reikėtų įrengti taip, kad jų išdėstymo poveikis būtų minimalus. Tyrimo pradžioje gyvūnų masės skirtumas turėtų būti minimalus ir neviršyti ± 20 %.

Dozių ruošimas

Kietąsias bandomąsias chemines medžiagas prieš duodant gyvūnams reikėtų ištirpinti atitinkamuose nešikliuose, paruošti jų suspensiją arba įmaišyti į pašarą ar geriamąjį vandenį. Skystąsias bandomąsias chemines medžiagas galima dozuoti tiesiogiai arba prieš tai praskiesti. Jei bandomoji cheminė medžiaga patenka per kvėpavimo takus, ją, atsižvelgiant į jos fizikines ir chemines savybes (50) (51), galima duoti dujų, garų arba kietojo ar skystojo aerozolio pavidalu.

Reikėtų naudoti tik iš naujo paruoštus bandomosios cheminės medžiagos preparatus, nebent stabilumo duomenys rodo, kad laikymas priimtinas ir šiuo atveju apibrėžiamos tinkamos laikymo sąlygos.

▼M7

Bandymo sąlygos

Nešiklis

Neturėtų būti nešiklio toksinio poveikio, esant naudojamai dozei, ir neturėtų kilti įtarimų, kad galėtų vykti jų cheminė reakcija su bandomosiomis cheminėmis medžiagomis. Jei naudojami kiti nei gerai žinomi tirpikliai ar nešikliai, juos galima įtraukti, pateikus etaloninius duomenis, kurie rodytų suderinamumą su bandymo gyvūnais, davimo būdu ir vertinamąja baigtimi. Rekomenduojama visuomet iš pradžių atsižvelgti į galimybę naudoti vandeninį tirpiklį arba nešiklį. Reikėtų pažymėti, kad kai kurie nešikliai (ypač klampūs nešikliai) gali sukelti uždegimą ir padidinti DNR gijų trūkių sąlyčio vietoje foninį lygį, ypač medžiagą duodant daug kartų.

Kontroliniai ėminiai

Teigiami kontroliniai ėminiai

Šiuo metu atliekant kiekvieną bandymą paprastai reikėtų imti gyvūnų grupę, kurią sudarytų ne mažiau kaip 3 vienos lyties ar kiekvienos lyties, jei naudojami abiejų lyčių gyvūnai (žr. 32 pastraipą), apdoroti teigiama kontroline chemine medžiaga. Ateityje galbūt laboratorija galės įrodyti, kad jos kvalifikacijos pakanka teigiamų kontrolinių ėminių skaičiui sumažinti. Jei ėminiai imami kelis kartus (pvz., pagal vieno dozės davimo protokolą), teigiamus kontrolinius ėminius būtina įtraukti tik į vieną ėminių ėmimą, bet reikėtų užtikrinti subalansuotą schemą (žr. 48 pastraipą). Vienalaikio teigiamo kontrolinio ėminio chemines medžiagas nebūtina duoti tokiu pačiu būdu, kaip bandomąją cheminę medžiagą, nors svarbu, kad būtų naudojamas vienodas būdas matuojant poveikį sąlyčio vietoje. Turėtų būti įrodyta, kad teigiamos kontrolinės medžiagos sukelia DNR gijų trūkius visuose audiniuose, kurie naudojami bandomajai cheminei medžiagai tirti, ir atrodo, kad kaip teigiamą kontrolinę medžiagą reikėtų pasirinkti EMS, nes jis sukelia visų tirtų audinių DNR gijų trūkius. Teigiamų kontrolinių cheminių medžiagų dozes reikėtų parinkti taip, kad būtų sukeltas vidutinis poveikis, pagal kurį galima kritiškai įvertinti bandymo charakteristikas ir jautrumą, o jas būtų galima pagrįsti dozės ir atsako kreivėmis, gautomis atliekant kvalifikacijos tikrinimą. Vienalaikių teigiamų kontrolinių ėminių gyvūnams gauta uodegos DNR procentinė dalis turėtų atitikti iš anksto tos rūšies audiniui nustatytą laboratorijos intervalą ir ėminių ėmimo laiką (žr. 16 pastraipą). Teigiamų kontrolinių cheminių medžiagų pavyzdžiai ir kai kurie jų tiksliniai audiniai (graužikų) yra įtraukti į 1 lentelę. Galima pasirinkti kitas chemines medžiagas, nei nurodytos 1 lentelėje, jei moksliškai būtų pagrįsta.

1 lentelė.

Teigiamų kontrolinių cheminių medžiagų pavyzdžiai ir kai kurie jų tiksliniai audiniai

Medžiagos ir CAS Nr.
Etilmetansulfonatas (CAS Nr. 62-50-0), visi audiniai
Etilnitrozokarbamidas (CAS Nr. 759-73-9), kepenys ir skrandis, dvylikapirštė ar tuščioji žarna
Metilmetansulfonatas (CAS Nr. 66-27-3) kepenys, skrandis, dvylikapirštė ar tuščioji žarna, plaučių ir bronchų bei alveolių išplovų (BAL) ląstelės, inkstai, šlapimo pūslė, plaučiai, sėklidės ir kaulų čiulpai ar kraujas
N-metil-*N*′-nitro-*N*-nitrozoguanidinas (CAS Nr.: 70-25-7) skrandis, dvylikapirštė ar tuščioji žarna
1,2-dimetilhidrazinas 2HCl (CAS Nr. 306-37-6), kepenys ir žarnynas
N-metil-*N*-nitrozokarbamidas (CAS Nr. 684-93-5), kepenys, kaulų čiulpai, kraujas, inkstai, skrandis, tuščioji žarna ir smegenys.

▼M7

Neigiami kontroliniai ėminiai

Neigiamos kontrolinės grupės gyvūnus, apdorotus vien tik nešikliu, reikėtų įtraukti į kiekvieną bandymą kiekvienam ėminių ėmimo laikui ir audiniui, ir su jais elgtis kaip su apdorotomis grupėmis. Neigiamų kontrolinių ėminių gyvūnams gauta uodegos DNR procentinė dalis turėtų atitikti iš anksto kiekvienam audiniui nustatytą laboratorijos foninį intervalą ir ėminių ėmimo laiką (žr. 16 pastraipą). Jei nėra istorinių arba paskelbtų kontrolinių duomenų, kurie rodo, kad pasirinktas nešiklis nesukelia jokio žalingo arba genotoksinio poveikio dėl davimų skaičiaus arba davimo būdo, prieš atliekant visą tyrimą reikėtų atlikti pradinį tyrimą nešiklio kontrolinio ėminio priimtinumui nustatyti.

PROCEDŪRA

Gyvūnų skaičius ir lytis

Nors patelėms gautų duomenų yra per mažai, kad atliekant kometų bandymą būtų galima palyginti lytis, kiti patinams ir patelėms gauti genotoksiškumo *in vivo* atsakai iš esmės yra panašūs, todėl daugumą tyrimų galima atlikti su bet kurios lyties gyvūnais. Jei duomenys rodytų esminius skirtumus tarp patinų ir patelių (pvz., sisteminio toksiškumo, metabolizmo, biologinio įsisavinamumo ir kt. skirtumus, įskaitant, pvz., intervalo nustatymo tyrimą), tai paskatintų naudoti abiejų lyčių gyvūnus. Šiuo atveju galbūt reikėtų atlikti tyrimą su abiejų lyčių gyvūnais, pvz., kaip kartotinės dozės toksiškumo tyrimo dalį. Jei naudojamos abi lytys, galbūt tiktų taikyti faktorinės analizės schemą. Išsami informacija, kaip analizuoti duomenis taikant šią schemą, pateikta 2 priedėlyje.

Tyrimo pradžioje ir nustatant kvalifikaciją reikėtų nustatyti grupių dydį turint tikslą vienai grupei gauti ne mažiau kaip 5 analizei tinkamus vienos lyties gyvūnus arba kiekvienos lyties gyvūnus, jei naudojami abiejų lyčių gyvūnai (vienalaikių teigiamų kontrolinių ėminių grupei reikia mažiau gyvūnų, žr. 29 pastraipą). Jei cheminių medžiagų poveikis žmonėms gali priklausyti nuo lyties, pvz., kai kurių vaistų atveju, bandymas turėtų būti atliekamas su atitinkamos lyties gyvūnais. Atliekant tyrimą pagal 33 pastraipoje nustatytus parametrus, kai yra trys dozių grupės ir vienalaikio neigiamo ir teigiamo kontrolinių ėminių grupės (kiekvieną grupę sudaro penki vienos lyties gyvūnai), rekomenduojamas tipinis maksimalus gyvūnų poreikis būtų nuo 25 iki 35 gyvūnų.

APDOROJIMO PLANAS

Gyvūnai turėtų būti apdorojami kasdien 2 paras ar ilgiau (t. y. apdorojama du kartus ar daugiau maždaug kas 24 h), ir ėminiai surenkami vieną kartą, nuo paskutinio apdorojimo praėjus 2–6 h (arba T_{max}) (12). Priimtini išplėstinių dozių davimo schemų (pvz., 28 parų kasdienio dozavimo) ėminiai. Buvo parodyta, kad galima sėkmingai derinti kometų ir eritrocitų mikrobranduolių bandymus (10) (19). Tačiau reikėtų kruopščiai ištirti kometų analizei paimtų ėminių tiekimo klausimus, atsižvelgiant į reikalavimus, susijusius su kitiems toksikologinių įvertinimų tipams skirtų audinių ėminių ėmimu. Surinkimas praėjus 24 h nuo paskutinės dozės davimo, kuris yra tipinis laikas atliekant bendrojo toksiškumo tyrimą, daugumoje atveju netinka (žr. 40 pastraipą apie ėminių ėmimo laiką). Kitokių apdorojimo ir ėminių ėmimo tvarkaraščių naudojimą reikėtų pagrįsti (žr. 3 priedėlį). Pvz., būtų galima imti daugkartinius ėminius po vienkartinio apdorojimo, tačiau reikėtų pažymėti, kad tyrimui su vienkartiniu davimu atlikti prireiks daugiau gyvūnų, nes ėminius reikės imti daug kartų, bet kartais tai gali tikti labiau, pvz., kai bandomoji cheminė medžiaga sukelia per didelį toksiškumą po pakartotinio dozių davimo.

▼M7

Nepriklausomai nuo bandymo atlikimo būdo, jis yra priimtinas, jei bandomajai cheminei medžiagai gaunamas teigiamas atsakas arba, kai atsakas yra neigiamas, ar yra tikslinio (-ų) audinio (-ų) paveikimą patvirtinančių tiesioginių ar netiesioginių įrodymų ir ar pasiekta ribinė dozė (žr. 36 pastraipą).

Bandomąsias chemines medžiagas galima duoti kaip padalytą dozę, t. y. siekiant palengvinti didelių tūrių davimą, per vieną dieną apdorojama du kartus arba daugiau, tarp apdorojimų esant ne ilgesniam kaip 2–3 h tarpui. Šiomis aplinkybėmis ėminių ėmimo tvarkaraštį reikėtų sudaryti atsižvelgiant į paskutinės dozės davimo laiką (žr. 40 pastraipą).

Dozių dydžiai

Jei atliekamas parengiamasis intervalo nustatymo tyrimas, nes nėra kitų susijusių tyrimų tinkamų duomenų, kurie padėtų pasirinkti dozę, jį reikėtų atlikti toje pačioje laboratorijoje, naudojant pagrindiniam tyrimui naudoti numatytą rūšį, veislę, lytį ir apdorojimo schemą pagal dabartinius intervalo nustatymo tyrimų atlikimo metodus. Tyrimo tikslas – nustatyti didžiausią toleruojamą dozę (MTD), apibrėžiamą kaip dozė, kuri sukeltų nestiprų toksinį poveikį, susijusį su tyrimo laikotarpio trukme (pvz., būtų aiškūs klinikiniai požymiai, pvz., nenormalus elgesys ar reakcija, nedidelis kūno masės sumažėjimas arba tikslinio audinio citotoksiškumas), bet ne žūtį ar skausmo, kančių ar išsekimo požymius, dėl kurių gyvūną reikėtų numarinti. Jei bandomoji cheminė medžiaga nėra toksiška, 14 parų ar ilgesnio laikotarpio didžiausia (ribinė) davimo dozė turėtų būti 1 000 mg/kg kūno masės per parą. Jei davimo laikotarpis yra trumpesnis kaip 14 parų, maksimali (ribinė) dozė yra 2 000 mg/kg kūno masės per parą. Tam tikrų tipų bandomųjų cheminių medžiagų (pvz., vaistų žmonėms), kurioms taikomi specifiniai reglamentai, šios ribos gali skirtis.

Cheminės medžiagos, kurios rodo toksikokinetinių savybių prisotinimą arba po ilgalaikio davimo sukelia detoksifikavimo procesus, galinčius mažinti poveikį, gali būti dozės nustatymo kriterijų išimtys ir turėtų būti įvertinamos kiekvienu atveju atskirai.

Atliekant ūmaus ir poūmio poveikio kometų bandymą, be didžiausios dozės (MTD, didžiausios leidžiamos dozės, didžiausios poveikio ar ribinės dozės) kiekvienam ėminio ėmimo laikui reikėtų pasirinkti ne mažiau kaip dvi papildomas mažėjančios sekos ir reikiamo skirtumo (pageidautina, kad skirtumas būtų mažesnis kaip 10 kartų) dozes, kad būtų įrodyti su doze susiję atsakai. Tačiau būtų gerai, jei naudojami dozių dydžiai aprėptų intervalą nuo didžiausios dozės iki mažo toksiškumo arba visiškai jo nesukeliančios dozės. Kai toksiškumas tiksliniam audiniui stebimas visiems bandomiems dozės dydžiams, patartina toliau tirti netoksines dozes (žr. 54–55 pastraipas). Tyrimams, kurių tikslas būtų išsamiau ištirti dozės ir atsako priklausomybės kreivės formą, gali prireikti papildomos (-ų) dozių grupės (-ių).

Dozių davimas

Rengiant bandymo schemą, reikėtų atsižvelgti į numatomą poveikio žmogui būdą. Todėl galima pasirinkti pagrįstus veikimo būdus, pvz., duoti su pašaru, geriamuoju vandeniu, dėti ant odos, atlikti vietinę poodinę arba intraveninę injekciją, duoti per burną (per zondą), kvėpavimo takus, intubacinį vamzdelį ar implantuoti. Visais atvejais turėtų būti pasirinktas būdas, kuris užtikrintų reikiamą tikslinio (-ių) audinio (-ių) veikimą. Injekcija į pilvo ertmę paprastai nerekomenduojama, nes tai nėra numatytas poveikio žmogui būdas ir jį reikėtų naudoti, tik, jei jis būtų specialiai moksliškai pagrįstas (pvz., kai kurios teigiamos kontrolinės cheminės medžiagos, tyrimo tikslai ar kai kurie vaistai, kurie duodami darant

▼M7

injekciją į pilvo ertmę). Skysčio, kurį galima duoti per zondą arba įšvirkšti per vieną kartą, maksimalus tūris priklauso nuo bandymo gyvūno dydžio. Tūris neturėtų būti didesnis kaip 1 ml/100 g kūno masės, išskyrus vandeninius tirpalus, kurių galima duoti po 2 ml/100g kūno masės. Didesnio nei šis tūrio naudojimą (jei leidžiama pagal gyvūnų gerovės teisės aktus) reikėtų pagrįsti. Visais įmanomais atvejais skirtingo dydžio dozes reikėtų gauti atitinkamai reguliuojant dozuojamo preparato koncentraciją, kad būtų užtikrintas visų dydžių dozių tūrio pastovumas kūno masės atžvilgiu.

Ėminių ėmimo laikas

Ėminių ėmimo laikas yra kritinis kintamasis, nes jį lemia laikotarpis, per kurį bandomosios cheminės medžiagos pasieka maksimalią koncentraciją tiksliniame audinyje ir yra gauti DNR gijų trūkiai, bet jie dar nėra pašalinti ir pataisyti ar dar nežuvo ląstelės. Kai kurių pažaidų, kurios sukeltų kometų bandymu aptinkamus DNR gijų trūkius, buvimo trukmė gali būti labai trumpa, bent kai kurioms *in vitro* bandomoms cheminėms medžiagoms (52) (53). Todėl įtariant tokias laikinas DNR pažaidas, reikėtų imtis priemonių jų praradimui sumažinti, užtikrinant pakankamai ankstyvą audinių ėminių ėmimą, galbūt imant anksčiau nei toliau nurodytos numatomosios vertės. Optimalus (-ūs) ėminių ėmimo laikas (-ai) gali būti susijęs (-ę) su chemine medžiaga ar davimo būdu, dėl kurio, pvz., audinys būtų paveikiamas būtų greita, suleidus į veną ar įkvėpus. Todėl, jei įmanoma, ėminių ėmimo laikus reikėtų nustatyti pagal kinetinius duomenis (pvz., pagal laiką (T_{max}), kuriuo pasiekiama didžiausia koncentracija (C_{max}) plazmoje ar audinyje, arba pasiekus nuostoviąją būseną, taikant daugkartinį dozės davimą). Neturint kinetinių duomenų, tinkamas genotoksiškumo matavimo kompromisas būtų ėminių ėmimas, praėjus 2–6 h nuo paskutinio apdorojimo, jei apdorojama du kartus ar daugiau, arba praėjus 2–6 ir 16–26 h po vienkartinio davimo, bet reikėtų imtis priemonių atlikti vienalaikį visų gyvūnų skrodimą po paskutinės (ar vienintelės) dozės. Informacija apie tikslinių audinių toksinio poveikio vaizdą (jei yra) taip pat gali būti naudojama reikiamiems ėminių ėmimo laikams pasirinkti.

Stebėjimai

Bandymo gyvūnų sveikatos bendruosius klinikinius stebėjimus reikėtų atlikti ir registruoti bent kartą per dieną, ir pageidautina tai daryti kartą ar kelis kartus kasdien tuo pačiu laiku, atsižvelgiant į didžiausio numatomo poveikio laiką po dozės davimo (54). Mažiausiai du kartus per dieną, siekiant nustatyti liguistumo ir gaištamumo požymius, visus gyvūnus reikėtų apžiūrėti. Jei tyrimų trukmė ilgesnė, visus gyvūnus reikėtų sverti bent kartą per savaitę ir pasibaigus bandymo laikotarpiui. Pašaro suvartojimą reikėtų matuoti jį keičiant ir bent kas savaitę. Jei bandomoji cheminė medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu, suvartoto vandens kiekį reikėtų išmatuoti kaskart, kai vanduo keičiamas, ir bent kartą per savaitę. Gyvūnus, kuriems pasireiškia nemirtini per didelio toksiškumo požymiai, reikėtų humaniškai numarinti iki bandymo laikotarpio pabaigos, ir jie paprastai nenaudojami kometų analizei.

Audinių surinkimas

Kadangi iš esmės įmanoma tirti kiekvieno audinio DNR gijų trūkių indukciją (kometas), renkamo audinio (-ų) pasirinkimo principą reikėtų aiškiai apibrėžti ir pagrįsti atsižvelgiant į tyrimo atlikimo priežastį ir į turimus tiriamų bandomųjų cheminių medžiagų ADME, genotoksiškumo, kancerogeniškumo ar kitus toksiškumo duomenis. Svarbūs nagrinėjami veiksniai turėtų aprėpti davimo būdą (pagrįstą galimu (-ais) poveikio žmonėms būdu (-ais)), prognozuojamą pasiskirstymą ir absorbciją audiniuose, metabolizmo vaidmenį ir galimą bandomųjų cheminių medžiagų veikimo mechanizmą. Dažniausiai tiriamas audinys yra kepenys, apie kurias sukaupta daugiausiai duomenų. Todėl, jei nėra bendrosios informacijos ir neidentifikuoti specifiniai audiniai, kuriuos reikėtų tirti, pagrįstai

▼M7

būtų galima imti kepenų ėminius, nes jos yra pagrindinė ksenobiotinio metabolizmo vieta, dažnai labai veikiama pačios -ų) pradinės (-ių) medžiagos (-ų) ir metabolito (-ų). Kartais labiausiai tiktų tirti tiesioginio sąlyčio vietą (pvz., liaukinį skrandį arba dvylikapirštę ar tuščiąją žarną, chemines medžiagas duodant per burną, arba plaučius, jei tiriamos įkvepiamos cheminės medžiagos). Atsižvelgiant į specifines bandymo atlikimo priežastis, reikėtų pasirinkti papildomus ar alternatyvius audinius, tačiau būtų naudinga ištirti kelis tų pačių gyvūnų audinius, jei laboratorija įrodė turinti kvalifikaciją visus tuos audinius ištirti ir geba juos apdoroti vienu metu.

Bandinių paruošimas

Kalbant apie procesus, aprašytus kitose pastraipose (44–49), yra svarbu tai, kad visi tirpalai ar stabilios suspensijos būtų panaudotos iki galiojimo pabaigos datos, arba prireikus būtų paruoštos iš naujo. Be to, toliau pateiktose pastraipose kritiniais kintamaisiais laikomas i) kiekvieno audinio pašalinimo po skrodimo, ii) kiekvieno audinio apdorojimo gaunant ląstelių ar branduolių suspensiją ir iii) suspensijos apdorojimo ir objektinių stiklelių paruošimo laikas (žr. 1 priedėlį *Apibrėžtys*), o priimtina kiekvieno šių etapų trukmė turėjo būti nustatyta kuriant metodą ir atliekant kvalifikacijos įrodymą.

Laikantis galiojančių gyvūnų gerovės teisės aktų ir trijų R principų ir praėjus reikiamam (-iems) laikui (-ams) po paskutinio apdorojimo bandomąja chemine medžiaga, gyvūnai numarinami. Pasirinktas (-i) audinys (-ai) yra pašalinamas (-i), preparuojamas (-i), ir jo ar jų dalis yra surenkama kometų bandymui atlikti, o kartu reikėtų paimti tos pačios audinio dalies išpjovą ir ją įdėti į formaldehido tirpalą ar reikiamą fiksavimo priemonę galimai histopatologinei analizei (žr. 55 pastraipą) pagal standartinius metodus (12) atlikti. Kometų bandymo audinys dedamas į malimo buferinį tirpalą, gerai išplaunamas šaltu malimo buferiniu tirpalu liekamajam kraujui pašalinti ir laikomas lediniame malimo buferiniame tirpale iki apdorojimo pradžios. Taip pat galima atlikti perfuziją *in situ*, pvz., kepenų, inkstų.

Yra daug paskelbtų metodų ląstelėms ar branduoliams atskirti. Juos sudaro audinių, pvz., kepenų ir inkstų, malimas, virškinimo trakto gleivėtų paviršių grandymas, homogenizavimas ir fermentinis skaidymas. Atliekant JaCVAM tinkamumo patvirtinimo tyrimą, buvo tiriamos tik atskiros ląstelės, todėl, kad būtų galima kurti metodą ir naudoti JaCVAM tyrimų duomenis kvalifikacijai įrodyti, pageidautina naudoti atskiras ląsteles. Tačiau buvo įrodyta, kad skirtumas tarp bandymo rezultatų nelabai priklausė nuo to, ar buvo naudojamos atskiros ląstelės, ar branduoliai (8). Palyginami rezultatai taip pat gaunami, taikant skirtingus metodus ląstelėms ar branduoliams atskirti (pvz., homogenizavimą, malimą, fermentinį skaidymą ir filtravimą per tinklelį (55). Todėl galima naudoti atskiras ląsteles arba atskirus branduolius. Laboratorija turėtų kruopščiai įvertinti audiniams būdingus atskirų ląstelių ar branduolių gavimo metodus ir patvirtinti jų tinkamumą. Kaip aptarta 40 pastraipoje, kai kurios pažaidos, pagal kurias kometų metodu aptinkami DNR gijų trūkiai, gali būti labai trumpą laiką (52) (53). Todėl, neatsižvelgiant į metodą, taikomą atskirų ląstelių ar branduolių suspensijoms gauti, yra svarbu, kad numarinus gyvūnus audiniai būtų apdoroti kuo greičiau ir būtų laikomi sąlygomis, kurios mažintų pažaidų išnykimą (pvz., audinius laikyti žemoje temperatūroje). Ląstelių suspensijas iki naudojimo pradžios reikėtų laikyti ledo temperatūroje taip, kad galima būtų įrodyti minimalius pokyčius tarp ėminių ir reikiamus teigiamų bei neigiamų kontrolinių ėminių atsakus.

▼M7

OBJEKTINIŲ STIKLELIŲ PARUOŠIMAS

Objektiniai stikleliai turėtų būti ruošiami kuo greičiau (geriausia per vieną valandą) po atskirų ląstelių ar branduolių paruošimo, bet temperatūra ir laiko tarpas tarp gyvūnų numarinimo ir objektinių stiklelių paruošimo turėtų būti griežtai kontroliuojami ir patvirtinti laboratorijos sąlygomis. Ląstelių suspensijos tūris, įdėtas į žemos lydymosi temperatūros agarozę (paprastai 0,5–1,0 %) objektiniams stikleliams paruošti, neturėtų sumažinti žemos lydymosi temperatūros agarozės procentinės dalies iki mažesnės kaip 0,45 %. Optimalus ląstelių tankis bus nustatytas vaizdo analizės sistema, naudojama kometoms skaičiuoti.

Lizė

Lizės sąlygos taip pat yra kritinis kintamasis ir gali trukdyti gijų trūkiams, gautiems specifinių DNR modifikacijų tipams (tam tikroms alkilintoms DNR ir baziniams aduktams). Todėl rekomenduojama užtikrinti kiek įmanoma pastovesnes lizės sąlygas visiems vieno bandymo objektiniams stikleliams. Paruoštus objektinius stiklelius reikėtų panardinti į atšaldytą iki maždaug 2–8 °C lizės tirpalą ne trumpiau kaip vienai valandai (arba per naktį) prislopinto apšvietimo, pvz., geltonos šviesos (arba šviesos nepatekimo) sąlygomis, kad būtų išvengta UV komponentų galinčio turėti baltos šviesos poveikio. Pasibaigus inkubavimo laikotarpiui ir prieš pradedant išvijimo šarminėje terpėje etapą, objektinius stiklelius reikėtų nuplauti, kad būtų pašalintas ploviklis ir druskos. Tai galima daryti naudojant dejonizuotą vandenį, neutralizavimo buferinį tirpalą ar fosfatinį buferinį tirpalą. Taip pat galima naudoti elektroforezės buferinį tirpalą. Taip būtų užtikrintos šarminės sąlygos elektroforezės kameroje.

Gijų išvijimas ir elektroforezė

Objektiniai stikleliai turėtų būti atsitiktinai sudėti ant panardinamo tipo elektroforezės bloko, turinčio pakankamai elektroforezės tirpalo objektinių stiklelių paviršiams visiškai padengti, platformos (padengimo gylis taip pat turėtų būti vienodas tarp atskirų bandymų). Naudojant kito tipo kometų bandymo elektroforezės blokus, t. y. aktyviojo aušinimo su aušalo cirkuliacija ir su didelės galios maitinimo šaltiniu, bus gauta didesnė elektros srovė esant storesniam tirpalo sluoksniui, bet įtampa bus pastovi. Reikėtų naudoti subalansuotą objektinių stiklelių dėjimo į elektroforezės indą schemą, kad būtų sušvelnintas visų nukrypimų poveikis ar kraštinis efektas indo viduje ir sumažintas kintamumas tarp partijų, t. y. atliekant kiekvieną elektroforezės bandymą, turėtų būti tas pats kiekvieno tyrime naudoto gyvūno objektinių stiklelių skaičius ir būtų įtraukti skirtingo dozavimo grupių ėminiai, neigiami ir teigiami kontroliniai ėminiai. Objektiniai stikleliai paliekami bent 20 min, kad DNR galėtų išsivyti, ir atliekama elektroforezė kontroliuojamomis sąlygomis, kurios kiek įmanoma padidintų bandymo jautrį ir dinaminį diapazoną (t. y. būtų gauta priimtina neigiamų ir teigiamų kontrolinių ėminių uodegos DNR procentinė dalis, kuri užtikrintų didžiausią jautrį). Yra tiesinė priklausomybė tarp DNR migracijos atstumo ir elektroforezės trukmės bei jos potencialo (V/cm). Atsižvelgiant į JaCVAM tyrimą, potencialas turėtų būti 0,7 V/cm, o trukmė – bent 20 min. Elektroforezės trukmė yra laikoma

▼M7

kritiniu kintamuoju ir ji turėtų būti nustatoma dinaminiam diapazonui optimizuoti. Dėl ilgesnės elektroforezės trukmės (pvz., 30 ar 40 min, didžiausiam jautriui gauti) paprastai gaunamas stipresnis žinomų mutagenų teigiamas atsakas. Tačiau dėl ilgesnės elektroforezės trukmės gali būti gauta per didelė kontroliniams ėminiams migracija. Kiekvieno bandymo metu reikėtų užtikrinti pastovią įtampą, o kitų parametrų kintamumas turėtų atitikti siauras ir nustatytas ribas, pvz., atliekant JaCVAM tyrimą 0,7 V/cm įtampai buvo gauta 300 mA pradinė srovė. Buferinio tirpalo gylį reikėtų reguliuoti, kad reikiamos sąlygos būtų pasiektos ir užtikrintos per visą bandymą. Srovė turėtų būti registruojama elektroforezės laikotarpio pradžioje ir pabaigoje. Todėl kiekvieno tirto audinio optimalios sąlygos turėtų būti nustatytos laboratorijoje atliekant pradinį kvalifikacijos įrodymą. Elektroforezės tirpalo temperatūra išvijimo ir elektroforezės laikotarpiu turėtų būti žema, paprastai 2–10 °C (10). Reikėtų registruoti elektroforezės tirpalo temperatūrą išvijimo pradžioje, elektroforezės pradžioje ir elektroforezės pabaigoje.

Baigus elektroforezę, objektinius stiklelius reikėtų įmerkti į neutralizavimo buferinį tirpalą ar juo plauti ne trumpiau kaip 5 min. Galima dažyti tik ką gautus gelius ir vertinti (pvz., po 1–2 dienų) ar juos galima dehidratuoti, kad būtų galima vertinti vėliau (pvz., po 1–2 savaičių nuo dažymo) (56). Tačiau sąlygos turėtų būti patvirtintos atliekant kvalifikacijos įrodymo bandymus, o istoriniai duomenys turėtų būti gauti ir saugomi atskirai kiekvienai iš šių sąlygų. Tuo atveju, kai vertinama vėliau, objektinius stiklelius reikėtų dehidratuoti, panardinant į absoliutųjį etanolį ne trumpiau kaip 5 min, palikti džiūti ir laikyti kambario temperatūroje arba sudėti į talpyklą ir laikyti šaldytuve iki vertinimo pradžios.

Matavimo metodai

Kometas reikėtų vertinti kiekybiškai, naudojant automatizuotą ar pusiau automatizuotą vaizdo analizės sistemą. Objektiniai stikleliai dažomi tinkamu fluorescenciniu dažu, pvz., SYBR Gold, Green I, propidiumo jodidu ar etidiumo bromidu ir stebimi esant tinkamam didinimui (pvz., 200×) per epifluorescencinį mikroskopą, turintį reikiamus detektorius ar skaitmeninį (pvz., CCD) fotoaparatą.

Ląsteles galima suskirstyti į tris kategorijas, kaip aprašyta kometų vaizdų atlase (57), t. y. skaičiuojamas, neskaičiuojamas ir „ląsteles vaiduoklius“ (aptarimas pateiktas 56 pastraipoje). Siekiant išvengti artefaktų, vertinamos tik skaičiuojamos ląstelės (su aiškiai apibrėžta galva bei uodega ir be kaimyninių ląstelių trukdžių) uodegos DNR procentinei daliai nustatyti. Ataskaitoje nebūtina nurodyti neskaičiuojamų ląstelių dažnumą. Ląstelių vaiduoklių dažnumas turėtų būti nustatytas pagal vizualų 150 ląstelių vienam ėminiui vertinimą (nes aiškiai apibrėžtos galvos nebuvimas reikštų, kad jas būtų nelengva aptikti vaizdo analizės metodu) (aptarimas pateiktas 56 pastraipoje) ir dokumentuotas atskirai.

Visi objektiniai stikleliai, įskaitant teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių, turėtų būti atskirai koduojami ir vertinami „aklai“, kad skaičiuotojas nežinotų apdorojimo sąlygų. Reikėtų analizuoti ne mažiau kaip kiekvieno ėminio (vienam audiniui ir vienam gyvūnui) 150 ląstelių (išskyrus ląsteles vaiduoklius, žr. 56 pastraipa). Vertinant ne mažiau kaip 5 gyvūnus (vienalaikio teigiamo kontrolinio ėminio gyvūnų yra mažiau, žr. 29 pastraipą) vienai dozei ir 150 ląstelių vienam gyvūnui, gaunama pakankama statistinė galia pagal Smith *et al*., 2008 analizę (5). Jei naudojami objektiniai stikleliai, vienam ėminiui galėtų būti vertinami 2–3 stikleliai, kai kiekvieną grupę sudaro penki gyvūnai. Reikėtų apžiūrėti kelias objektinio stiklelio zonas, kuriose yra toks tankis, kuris užtikrina, kad nebūtų uodegų sanklotos. Reikėtų vengti ląsteles vertinti objektinių stiklelių kraštuose.

Atliekant kometų bandymą, DNR gijų trūkius galima matuoti pagal nepriklausomas vertinamąsias baigtis, pvz., uodegos DNR procentinę dalį, uodegos ilgį ir uodegos momentą. Galima matuoti visus tris parametrus, jei naudojama tinkama vaizdo analizės sistemos programinė įranga. Tačiau rekomenduojama naudoti uodegos DNR procentinę dalį (taip pat vadinamą uodegos intensyvumo %) rezultatams įvertinti ir aiškinti (12) (40) (41) (42), ir ji nustatoma pagal DNR fragmento intensyvumą uodegoje, išreikštą kaip viso ląstelės intensyvumo procentinė dalis (13).

▼M7

Audinių pažeidimas ir citotoksiškumas

Teigiami kometų bandymo rezultatai gali būti gauti ne vien tik dėl genotoksiškumo, nes DNR migracija gali padidėti ir dėl toksiškumo tiksliniam audiniui (12) (41). Ir atvirkščiai, žinomoms genotoksinėms medžiagoms dažnai stebimas mažas arba vidutinis citotoksiškumas (12), ir tai rodo, kad vien tik pagal kometų bandymą neįmanoma atskirti genotoksiškumo ir citotoksiškumo sukeltos DNR migracijos. Tačiau jei stebimas DNR migracijos padidėjimas, rekomenduojama ištirti vieną ar kelis citotoksiškumo rodiklius, nes tai palengvintų aiškinti rezultatus. DNR migracijos padidėjimą esant aiškiems citotoksiškumo požymiams reikėtų aiškinti atsargiai.

Pasiūlyta daug citotoksiškumo matavimo kriterijų ir iš jų, kaip tinkamas citotoksiškumo audiniams kriterijus, buvo pasiūlyti histopatologiniai pokyčiai. Stebėjimų rezultatai, pvz., uždegimas, ląstelių infiltracija, apoptoziniai ar nekroziniai pokyčiai, buvo susiję su padidėjusia DNR migracija, tačiau, kaip matyti iš JaCVAM tinkamumo patvirtinimo tyrimo (12), negalima pateikti galutinio histopatologinių pokyčių, kurie yra visada susiję su padidėjusia DNR migracija, sąrašo. Naudingos informacijos apie audinių pažeidimą galima gauti iš klinikinės biochemijos tyrimų (pvz., AST, ALT), ir galima taip pat atsižvelgti į papildomus rodiklius, pvz., kaspazių aktyvinimą, apoptozės aptikimą TUNEL metodu, Annexin V dažymu ir kt. Tačiau yra paskelbta mažai duomenų apie tai, kad pastarieji metodai buvo taikomi atliekant tyrimus *in vivo*, o kai kurie gali būti mažiau patikimi nei kiti.

Ląstelės vaiduokliai (arba debesys) yra ląstelės, kurių mikroskopinį vaizdą sudaro maža galva ar jos apskritai nėra ir didelės pasklidosios uodegos, ir kurios laikomos stipriai pažeistomis ląstelėmis, nors ląstelių vaiduoklių etiologija nėra aiški (žr. 3 priedėlį). Uodegos DNR procentinės dalies matavimai vaizdo analizės metodu yra nepatikimi dėl ląstelių vaiduoklių išvaizdos, todėl ląstelės vaiduokliai turėtų būti įvertintos atskirai. Ląstelių vaiduoklių buvimas turėtų būti pažymėtas ir pateiktas ataskaitoje, o kiekvienas reikšmingas jų kiekio padidėjimas, kurį būtų galima susieti su bandomąja chemine medžiaga, turėtų būti ištirtas ir išsamiai paaiškintas. Žinios apie bandomųjų cheminių medžiagų galimą veikimo būdą gali padėti tiriant šiuos aspektus.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

Gyvūnas yra bandymo vienetas, todėl atskirų gyvūnų duomenys ir apibendrinti rezultatai turėtų būti pateikti lentelių pavidalu. Dėl hierarchinės duomenų prigimties rekomenduojama, kad kiekvienam objektiniam stikleliui būtų nustatyta uodegos DNR procentinės dalies mediana ir kiekvienam gyvūnui būtų apskaičiuotas medianinių verčių vidurkis (12). Nustatomi atskiriems gyvūnams gauti vidurkiai, kad būtų gautas grupės vidurkis. Visos šios vertės turėtų būti įtrauktos į ataskaitą. Galima taikyti alternatyvius metodus (žr. 53 pastraipą), jei jie būtų pagrįsti moksliniu ir statistiniu požiūriu. Statistinę analizę galima atlikti taikant įvairius metodus (58) (59) (60) (61). Kaip aptarta pirmiau pateiktose nuorodose, renkantis taikomus statistinius metodus, reikėtų atsižvelgti į duomenų transformacijos poreikį (pvz., logaritminės arba kvadratinės šaknies) ir (arba) į poreikį pridėti mažą skaičių (pvz., 0,001) prie visų (net ne nulio) verčių, kad būtų sušvelnintas ląstelių nulinių verčių poveikis. Išsami informacija apie apdorojimo ir lyčių sąveiką, kai naudojami abiejų lyčių gyvūnai, ir apie vėliau atliekamą duomenų analizę, nustačius skirtumus ar jų nenustačius, pateikta 2 priedėlyje. Ataskaitoje taip pat reikėtų pateikti toksiškumo ir klinikinių požymių duomenis.

Priimtinumo kriterijai

Bandymo priimtinumas pagrįstas šiais kriterijais:

a. vienalaikis neigiamas kontrolinis ėminys laikomas tinkamu įtraukti į laboratorijos istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazę, kaip aprašyta 16 pastraipoje;

▼M7

b. vienalaikiai teigiami kontroliniai ėminiai (žr. 29 pastraipą) turėtų sukelti atsakus, kurie yra suderinami su rastais istorinių teigiamų kontrolinių ėminių duomenų bazėje, ir duoti statistiškai reikšmingą padidėjimą palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu;

c. analizuojamas pakankamas ląstelių ir dozių verčių skaičius (52 ir 36–38 pastraipos).

d. didžiausios dozės pasirinkimo kriterijai atitinka aprašytus 36 pastraipoje.

Rezultatų įvertinimas ir aiškinimas

Kai įvykdyti visi priimtinumo kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai teigiama, jei:

a. bent vienai bandymo dozei gaunamas statistiškai reikšmingas padidėjimas palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu;

b. padidėjimas yra susijęs su doze, kai įvertinama pagal atitinkamą tendencijos kriterijų;

c. kuris nors iš rezultatų yra už tam tikrai rūšiai, nešikliui, davimo būdui, audiniui ir davimų skaičiui gautų istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų skirstinio ribų;

Atitinkant visus šiuos kriterijus, laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga gali sukelti šioje bandymų sistemoje tirtų audinių DNR gijų trūkius. Jei yra tik vieno ar dviejų kriterijų atitiktis, žr. 62 pastraipą.

Kai įvykdyti visi priimtinumo kriterijai, bandomoji cheminė medžiaga laikoma aiškiai neigiama, jei:

a. jokiai bandymo koncentracijai negaunamas statistiškai reikšmingas padidėjimas palyginti su vienalaikiu neigiamu kontroliniu ėminiu,

b. nėra su koncentracija susijusio padidėjimo, kai įvertinama pagal atitinkamą tendencijos kriterijų,

c. visi rezultatai patenka tarp tam tikrai rūšiai, nešikliui, davimo būdui, audiniui ir davimų skaičiui gautų istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenų skirstinio ribų;

d. pateikti tikslinio (-ų) audinio (-ų) paveikimą patvirtinantys tiesioginiai ar netiesioginiai įrodymai.

Laikoma, kad ši bandomoji cheminė medžiaga negali sukelti šioje bandymų sistemoje tirtų audinių DNR gijų trūkių.

Nėra reikalavimo patikrinti aiškų teigiamą ar neigiamą atsaką.

Jei atsakas nėra aiškiai neigiamas ar aiškiai teigiamas (t. y. atitinka ne visus 59 ar 60 pastraipoje išvardytus kriterijus), ir siekiant padėti nustatyti rezultato biologinę svarbą, duomenys turėtų būti įvertinti pateikiant ekspertų nuomonę ir (arba) atliekant papildomus tyrimus, jei jie būtų moksliškai pagrįsti. Galėtų būti naudingas papildomų ląstelių skaičiavimas (jei tinka) arba kartotinis bandymas galbūt optimizuotomis bandymo sąlygomis (pvz., kiti tarpai tarp dozės verčių, kiti davimo būdai, kitas ėminių ėmimo laikas arba kiti audiniai).

Retais atvejais, netgi atlikus papildomus tyrimus, gautų duomenų rinkinio nepakaks padaryti išvadą, ar rezultatai teigiami ar neigiami, todėl bus priimtas sprendimas, kad atsakas yra dviprasmis.

▼M7

Siekiant įvertinti teigiamo ar dviprasmio rezultato biologinę svarbą, reikia turėti informacijos apie citotoksiškumą tiksliniam audiniui (žr. 54–55 pastraipas). Jei teigiami ar dviprasmiai rezultatai stebimi tik esant aiškiems citotoksiškumo įrodymams, būtų daroma išvada, kad tyrimas dviprasmis dėl genotoksiškumo, nebent būtų informacijos, kurios pakaktų galutinei išvadai patvirtinti. Jei neigiamas tyrimo rezultatas gautas tokiomis aplinkybėmis, kai visoms bandytoms dozėms yra toksiškumo požymių, gal būtų naudinga atlikti papildomą tyrimą esant netoksinėms dozėms.

Bandymo ataskaita

Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— kilmė, partijos numeris, jei yra;

— bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, galiojimo pabaigos data arba pakartotinės analizės data, jei žinoma.

Vienkomponentė medžiaga:

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;

— cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

— kuo išsamesnis sudedamųjų dalių cheminis pavadinimas (žr. pirmiau), kiekybinis paplitimas ir būdingos fizikinės ir cheminės savybės.

Tirpiklis ar nešiklis:

— tirpiklio ir (arba) nešiklio pasirinkimo pagrindimas,

— bandomosios cheminės medžiagos tirpumas tirpiklyje ar nešiklyje ir stabilumas, jei yra žinomas;

— dozių receptūros ruošimas;

— preparatų analizinis nustatymas (pvz., stabilumo, vienalytiškumo, nominalių koncentracijos verčių).

Bandymo gyvūnai:

— rūšis ir (arba) veislė, jų pasirinkimo mokslinis ir etinis pagrindimas;

▼M7

— gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,

— šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras, pagerintos aplinkos sąlygos ir kt.,

— kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje ir pabaigoje, įskaitant kūno masės intervalą, vidurkį ir standartinį nuokrypį.

Bandymo sąlygos:

— teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių (tirpiklio ir (arba) nešiklio) duomenys;

— intervalo nustatymo tyrimo, jei atliekamas, rezultatai;

— dozės dydžio pasirinkimo pagrindimas;

— išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos paruošimą;

— išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos davimo būdą,

— pagrindinė priežastis, nulėmusi davimo būdo pasirinkimą;

— injekcijos vieta (atliekant poodinio ar intraveninio davimo tyrimus);

— ėminių paruošimo metodai, jei yra, histopatologinė analizė, ypač jei cheminei medžiagai gautas teigiamas kometų bandymo atsakas;

— audinio pasirinkimo pagrindimas,

— metodai, kuriais patikrinama, ar bandomoji cheminė medžiaga pateko į tikslinį audinį arba į kraujotakos sistemą, jei gauti neigiami rezultatai;

— faktinė dozė (mg/kg kūno masės per parą), apskaičiuota pagal bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją pašaruose ir (arba) geriamajame vandenyje (ppm) ir suvartojimą, jei tinka;

— išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę.

— išsamus apdorojimo ir ėminių ėmimo tvarkaraščio aprašymas, pasirinkimo pagrindimas (pvz., toksikokinetiniai duomenys, jei yra);

— nuskausminimo metodas;

— numarinimo metodas;

— audinių atskyrimo ir konservavimo procedūros;

— pavienių ląstelių ar branduolių suspensijų paruošimo metodai;

— visų reagentų šaltinis ir partijų numeriai (jei įmanoma);

— citotoksiškumo įvertinimo metodai;

— elektroforezės sąlygos;

— taikyti dažymo metodai ir

— kometų skaičiavimo ir matavimo metodai.

Rezultatai:

— Bendrieji kiekvieno gyvūno klinikiniai stebėjimai, jei buvo atliekami, prieš bandymą ir visą bandymo laikotarpį;

— citotoksiškumo duomenys, jei yra;

▼M7

— atliekant ilgesnius nei savaitės trukmės bandymus: kiekvieno gyvūno masė bandymo eigoje, įskaitant kiekvienos grupės kūno masės intervalą, vidurkį ir standartinį nuokrypį, pašaro suvartojimas;

— dozės ir atsako priklausomybė, jei ji yra akivaizdi;

— kiekvienam audiniui ir (arba) gyvūnui gauta uodegos DNR procentinės dalis (arba kiti matai, jei būtų pasirinkti), vieno objektinio stiklelio medianinės vertės, vidutinės vertės gyvūnui ir vidutinės vertės grupei;

— kiekvieno įvertinto audinio vienalaikių ir istorinių neigiamų kontrolinių ėminių duomenys, nurodant intervalus, vidurkius ir (arba) medianas ir standartinius nuokrypius;

— vienalaikių ir istorinių teigiamų kontrolinių ėminių duomenys;

— audinių, išskyrus kepenis, dozės ir atsako priklausomybės kreivė, gauta teigiamam kontroliniam ėminiui. Ji gali būti gauta pagal duomenis, surinktus atliekant kvalifikacijos įrodymo bandymus (žr. 16–17 pastraipas), kurie, taikant nuorodą į dabartinius literatūros šaltinius, pagrįstų tam audiniui gautų atsakų dydį ir sklaidą kontrolinių ėminių atžvilgiu;

— statistinės analizės duomenys ir taikyti metodai; atsako vertinimo kaip teigiamo, neigiamo ar dviprasmio kriterijai;

— ląstelių vaiduoklių dažnumas kiekvienoje grupėje ir kiekvienam gyvūnui.

Rezultatų aptarimas

Išvada

Nuorodos

LITERATŪRA

(1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, pp. 114-32.

(2) Brendler-Schwaab, S. *et al*. (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, pp. 245-54.

(3) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31-5.

(4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 143-63.

(5) Smith, C.C. *et al*. (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 233-40.

(6) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, pp. 45-51.

(7) McKelvey-Martin, V.J. *et al*. (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, pp. 47-63.

(8) Tice, R.R. *et al*. (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 206-21.

▼M7

(9) Singh, N.P. *et al*. (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, pp. 184-91.

(10) Rothfuss, A. *et al*. (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, pp. 40-69.

(11) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(12) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

(13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the „Comet“ assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, pp. 86-94.

(14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, pp. 207-14.

(15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, pp. 249-61.

(16) Rothfuss, A. *et al*. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-20.

(17) Kushwaha, S. *et al*. (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, pp. 145–54.

(18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 187-99.

(19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, pp. 7-19.

(20) Recio, L. *et al*. (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, pp. 149-62.

(21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 621-3.

(22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations,** *Mutagenesis*, Vol. 19/1, pp. 51-9.

(23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, pp. 28-41.

(24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*,Vol. 393/1-2, pp. 175-8.

▼M7

(25) Toyoizumi, T. *et al*. (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, pp. 175-80.

(26) Struwe, M. *et al*. (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, pp. 240-9.

(27) Wada, K. *et al*. (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, pp. 26-30.

(28) Wang, A. *et al*. (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, pp. 51-9.

(29) Burlinson, B. *et al*. (2007), *In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 31-5.

(30) Jackson, P. *et al*. (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, pp. 486-500.

(31) Sasaki, Y.F. *et al*. (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, pp. 629-799.

(32) Sekihashi, K. *et al*. (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 53-74.

(33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity,** *Mutation Research*, Vol. 681/1, pp. 3-12.

(34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, pp. 275-282.

(35) Cordelli, E. *et al*. (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, pp. 443-451.

(36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, pp. 167-72.

(37) Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 196-201.

(38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 165-81.

(39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay,** *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, pp. 267-282.

▼M7

(40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605(1-2), pp. 7-16.

(41) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, pp. 31-5.

(42) Kumaravel, T.S. *et al*. (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, pp. 53-64.

(43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, pp. 689-95.

(44) Møller, P. *et al*. (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 109-11.

(45) Forchhammer, L. *et al*. (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 113-23.

(46) Azqueta, A. *et al*. (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, pp. 41-45.

(47) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* John Wiley and Sons, New York 2nd ed.

(49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123)

(50) Šio priedo B.8 skyrius. *Poūmis toksiškumas įkvėpus. 28 dienų tyrimas*.

(51) Šio priedo B.29 skyrius. *Pusiau lėtinis toksiškumas įkvėpus. 90 dienų tyrimas*.

(52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, pp. 141-45.

(53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, pp. 35-41.

(54) OECD (2002), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, pp. 50-4.

(56) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, pp.45–51.

(57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.

(58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, pp. 109-19.

▼**M7**

(59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 167-75.

(60) Bright, J. *et al*. (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, pp. 485-93.

(61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 171-82.

▼M7

1 priedėlis

TERMINŲ APIBRĖŽTYS

Pavienių ląstelių gelio elektroforezė šarminėmis sąlygomis – jautrus metodas pirminėms DNR pažaidoms aptikti atskirų ląstelių ar branduolių lygiu.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Kometa – forma, kurią įgauna elektroforezės lauko veikiamas nukleotidas, pavadinta dėl savo panašumo į kometas: galva yra branduolys, o uodegą sudaro DNR, migruojanti iš branduolio elektriniame lauke.

Kritinis kintamasis ar parametras – protokolo kintamasis, kurio mažas pokytis gali daryti didelę įtaką bandymo išvadai. Kritiniai kintamieji gali būti audiniui būdingi kintamieji. Kritinių kintamųjų nereikėtų keisti, ypač vieno bandymo metu, neatsižvelgus į tai, kaip pakeitimas paveiks bandymo atsaką, pvz., kaip rodo teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių atsako dydis ir kintamumas. Bandymo ataskaitoje turėtų būti išvardyti kritinių kintamųjų pakeitimai, padaryti bandymo metu, arba palyginti su standartiniu laboratorijos protokolu, ir pateiktas kiekvieno pakeitimo pagrindimas.

Uodegos intensyvumas arba uodegos procentinė DNR dalis – atitinka kometos uodegos fluorescencijos intensyvumą palyginti su suminiu intensyvumu (galvos ir uodegos). Šis parametras rodo DNR trūkių mastą, išreikštą procentais.

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

▼M7

2 priedėlis

FAKTORINĖS ANALIZĖS SCHEMA LYČIŲ SKIRTUMAMS NUSTATYTI ATLIEKANT KOMETŲ BANDYMĄ *IN VIVO*

Faktorinės analizės schema ir jos taikymas

Pagal šią schemą kiekvienai koncentracijos vertei bandomi ne mažiau kaip 5 patinai ir 5 patelės, iš viso pagal schemą naudojant ne mažiau kaip 40 gyvūnų (20 patinų ir 20 patelių ir dar atitinkami teigiami kontroliniai ėminiai).

Schema, kuri yra viena iš paprastesnių faktorinės analizės schemų, atitinka dvifaktorinės dispersinės analizės schemą, kurios pagrindiniai veiksniai yra lytis ir koncentracijos vertė. Duomenis galima analizuoti naudojant daug standartinių statistinės programinės įrangos rinkinių, pvz., SPSS, SAS, STATA, Genstat taip pat naudojant programavimo kalbą R.

Atliekant analizę, duomenų rinkinio kintamumas perdalijamas į kintamumą tarp lyčių, tarp koncentracijos verčių ir į kintamumą, susijusį su sąveika tarp lyčių ir koncentracijos verčių. Kiekvienas iš narių tikrinamas tos pačios lyties kartotinių gyvūnų kintamumo grupių viduje įverčio atžvilgiu, esant vienodai koncentracijai. Išsami informacija apie bazinę metodiką pateikta daugelyje standartinių statistinių vadovėlių (žr. nuorodas) ir su statistiniais rinkiniais pateikiamose pagalbinėse priemonėse.

Analizė tęsiama tikrinant ANOVA lentelės *x* lyties ir koncentracijos sąveikos narį ([1]). Nesant reikšmingo sąveikos nario, lytims ar koncentracijos vertėms gautos jungtinės vertės duoda patikimus statistinius kriterijus tarp koncentracijos verčių, pagrįstus grupės jungtiniu ANOVA kintamumo nariu.

Atliekant analizę toliau, kintamumo tarp koncentracijos verčių įvertis dalijamas į kontrastus, taip gaunamas atsakų pagal koncentracijos vertes tiesinių ir kvadratinių kontrastų kriterijus. Kai yra reikšminga *x* lyties ir koncentracijos sąveika, šį narį taip pat galima padalyti į tiesinius *x* lyties ir kvadratinius x lyties sąveikos kontrastus. Šie nariai pateikia kriterijus, ar abiejų lyčių atsakas į koncentraciją yra lygiagretus, ar abiejų lyčių atsakas yra skirtuminis.

Grupės jungtinio kintamumo įvertis gali būti naudojamas skirtumų tarp vidurkių poriniams kriterijams gauti. Galima lyginti abiejų lyčių vidurkius ir skirtingoms koncentracijos vertėms gautus vidurkius, pvz., palyginimui su neigiamų kontrolinių ėminių vidurkiais. Jei sąveika yra reikšminga, galima lyginti vienos lyties skirtingoms koncentracijos vertėms gautus vidurkius ir vienos koncentracijos lytims gautus vidurkius.

Nuorodos

Yra daug statistikos vadovėlių, kuriuose aptariama faktorinės analizės schemų, nuo paprasčiausios dvifaktorinės analizės iki bandymų planavimo metodikoje naudojamų sudėtingesnių formų, teorija, projektavimas, metodika, analizė ir aiškinimas. Toliau pateikiamas sąrašas nėra išsamus. Kai kuriose knygose pateikiami palyginamųjų schemų pavyzdžiai su skaičiavimais, kartais su kompiuterine programa analizei atlikti naudojant įvairius programinės įrangos rinkinius.

([1]) Statistikai, kurie taiko modeliavimo metodą, pvz., apibendrintuosius tiesinius modelius (GLM), gali atlikti analizę skirtingu, bet palyginamuoju būdu ir nebūtinai sudaryti tradicinę ANOVA lentelę, bet modeliai grąžina atgal prie algoritminių statistinių duomenų skaičiavimo metodų, sukurtų tada, kai nebuvo kompiuterių.

▼M7

(1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

(2) Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

(3) Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

(4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

(5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

(6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

(7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

3 priedėlis

DABARTINIAI BANDYMO APRIBOJIMAI

Atsižvelgiant į šiuo metu turimas žinias, keli apribojimai yra susiję su kometų bandymu *in vivo*. Tikimasi, kad šie apribojimai bus sumažinti arba tiksliau apibrėžti, kai bus daugiau bandymo taikymo patirties, kad būtų išspręstos su reglamentavimu susijusios saugos problemos.

1. Kai kurių tipų DNR pažaidos gali būti trumpalaikės, t. y. gali būti pataisytos per greitai, kad jas būtų galima stebėti 24 h po paskutinės dozės arba vėliau. Nėra nustatyto trumpalaikių pažaidų tipų ar cheminių medžiagų, kurios gali sukelti šio tipo pažaidas, sąrašo, ir nėra žinoma, kiek būna laiko šio tipo pažaidoms aptikti. Optimalus ėminių ėmimo laikas (-ai) taip pat gali būti susijęs (-ę) su chemine medžiaga ar davimo būdu, ir ėminių ėmimo laikai turėtų būti nustatyti pagal kinetinius duomenis (pvz., pagal laiką T_{max}, kuriuo pasiekiama didžiausia koncentracija plazmoje ar audinyje), kai tokių duomenų yra. Daugumoje tinkamumo patvirtinimo tyrimų šiam bandymų metodui pagrįsti nurodoma, kad skrodimą reikia atlikti praėjus 2–3 h po paskutinės dozės davimo. Daugumoje literatūroje paskelbtų tyrimų nurodoma, kad nuo paskutinės dozės davimo iki numarinimo turėtų praeiti nuo 2 iki 6 h. Todėl, atsižvelgiant į šią patirtį, buvo pateikta bandymo metodo rekomendacija, kad paskutinė dozė turėtų būti duota tam tikru momentu 2–6 h laikotarpiu iki skrodimo, jei nėra tam prieštaraujančių duomenų.

2. Nėra nustatytų tyrimų duomenų, kurie tirtų bandymo jautrį trumpalaikėms DNR pažaidoms aptikti po davimo su pašaru ar geriamuoju vandeniu palyginti su davimu per zondą. DNR pažaidos buvo aptiktos, davus su pašaru ir geriamuoju vandeniu, tačiau tokių pranešimų yra mažai, palyginti su daug didesne patirtimi duodant per zondą ar darant injekciją į pilvo ertmę. Taigi bandymo jautris gali būti mažesnis tiriant trumpalaikes pažaidas sukeliančias chemines medžiagas, kurios duodamos su pašaru ar geriamuoju vandeniu.

3. Buvo atlikti tik kepenų ir skrandžio audinių tarplaboratoriniai tyrimai, todėl nėra parengta jokia rekomendacija, kaip kitiems nei kepenys audiniams gauti jautrų ir atkuriamą atsaką, kuris atitiktų tikėtinus teigiamų ir neigiamų kontrolinių ėminių intervalus. Negalėjo būti pasiektas susitarimas dėl kepenims naudojamo neigiamo kontrolinio ėminio vertės apatinės ribos nustatymo.

4. Nors yra keletas leidinių, kuriuose parodoma, kad citotoksiškumas *in vitro* yra trukdantis veiksnys, yra paskelbta labai mažai duomenų *in vivo*, todėl negalima rekomenduoti jokio citotoksiškumo mato. Histopatologiniai pokyčiai, pvz., uždegimas, ląstelių infiltracija, apoptoziniai ar nekroziniai pokyčiai, susiję su padidėjusia DNR migracija, tačiau, kaip matyti iš JaCVAM tinkamumo patvirtinimo tyrimo (EBPO, 2014 m.), šiems pokyčiams ne visada gaunami teigiami kometų bandymo rezultatai, todėl negalima pateikti galutinio histopatologinių pokyčių, kurie yra visada susiję su padidėjusia DNR migracija, sąrašo. Ląstelės vaiduokliai (arba debesys) anksčiau buvo siūlomos kaip citotoksiškumo rodiklis, tačiau jų etiologija neaiški. Yra duomenų, kurie rodytų, kad jos gali atsirasti dėl su chemine medžiaga susijusio citotoksiškumo, mechaninės ar fermento sukeltos pažaidos, pradėtos ruošiant ėminį (Guerard *et al*., 2014), ir (arba) dėl bandomosios cheminės medžiagos genotoksiškumo stipresnio poveikio. Kiti duomenys rodo, kad jos yra susijusios su labai didele, bet galbūt pataisoma DNR pažaida (Lorenzo *et al*., 2013).

▼M7

5. Audiniai arba ląstelių branduoliai buvo sėkmingai užšaldyti, kad analizė galėtų būti atlikta vėliau. Dėl to paprastai gaunamas išmatuojamas poveikis nešiklio ir teigiamo kontrolinio ėminio atsakui (Recio *et al.,* 2010; Recio *et al*., 2012; Jackson *et al*., 2013). Jei prireiktų taikyti užšaldymo metodikas, laboratorija turėtų įrodyti kompetenciją tai daryti, patvirtinti nešikliu apdorotų gyvūnų tikslinių audinių priimtinus uodegos DNR procentinės dalies mažus intervalus ir galimybę vis dar aptikti teigiamus atsakus. Literatūroje yra aprašytas audinių užšaldymas taikant skirtingus metodus. Tačiau šiuo metu nėra susitarta dėl geriausio audinių užšaldymo ir atšildymo būdo ir dėl to, kaip įvertinti, ar galbūt pakitęs atsakas gali turėti įtakos bandymo jautriui.

6. Naujausi darbai rodo, kad kritinių kintamųjų sąrašas turėtų toliau trumpėti, o kritinių kintamųjų parametrai turėtų būti apibrėžti tiksliau (Guerard *et al*., 2014).

Nuorodos

(1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114-21.

(2) Jackson, P. *et al*. (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699-707.

(3) Lorenzo,Y. *et al*. (2013), The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427-32.

(4) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

(5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.

(6) Recio, L. *et al*. (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101-13.

▼C1

C DALIS. EKOTOKSIŠKUMO NUSTATYMO METODAI

TURINYS

C.1. ŪMUS TOKSIŠKUMAS ŽUVIMS

C.2. *DAPHNIA* SP. ŪMAUS JUDRUMO SLOPINIMO (IMOBILIZAVIMO) BANDYMAS

C.3. GĖLAVANDENIŲ DUMBLIŲ IR MELSVABAKTERIŲ AUGIMO SLOPINIMO BANDYMAS

C.4. LENGVO BIOLOGINIO SKAIDUMO NUSTATYMAS

I DALIS. BENDRIEJI KLAUSIMAI

II DALIS. DOC IŠNYKIMO BANDYMAS (C.4 – A METODAS)

III DALIS. MODIFIKUOTAS OECD ATRANKOS BANDYMAS (C.4 – B METODAS)

IV DALIS. CO_2 IŠSISKYRIMO BANDYMAS (C.4 – C METODAS)

V DALIS. MANOMETRINIS RESPIROMETRINIS BANDYMAS (C.4 – D METODAS)

VI DALIS. UŽDAROSIOS KOLBOS BANDYMAS (C.4 – E METODAS)

VII DALIS. M.I.T.I. BANDYMAS (C.4 -F METODAS)

C.5. SKAIDYMAS. BIOCHEMINIS DEGUONIES SUVARTOJIMAS

C.6. SKAIDYMAS. CHEMINIS DEGUONIES SUVARTOJIMAS

C.7. SKAIDYMAS. ABIOTINIS SKAIDYMAS. HIDROLIZĖ KAIP pH FUNKCIJA

C.8. TOKSIŠKUMAS SLIEKAMS

C.9. BIOLOGINIS SKAIDYMAS – ZAHN-WELLENS BANDYMAS

C.10. AEROBINIO NUOTEKŲ TVARKYMO MODELIAVIMO BANDYMAS: C.10-A: VEIKLIOJO DUMBLO AERATORIAI. C.10-B: BIOLOGINĖS PLĖVELĖS

C.11. AKTYVIOJO DUMBLO KVĖPAVIMO SLOPINIMO BANDYMAS (ANGLIES IR AMONIO OKSIDACIJA)

C.12. BIOLOGINIS SKAIDYMAS. MODIFIKUOTAS SCAS BANDYMAS

C.13. BIOLOGINIS KAUPIMASIS ŽUVYSE. VEIKIMO PER VANDENINĘ TERPĘ METODAS IR MITYBOS BANDYMAS

C.14. ŽUVŲ MAILIAUS AUGIMO BANDYMAS

C.15. TRUMPALAIKIO TOKSIŠKUMO ŽUVIMS BANDYMAS EMBRIONO IR TRYNIO MAIŠELIO STADIJOSE

C.16. NAMINĖS BITĖS. ŪMUS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ

C.17. NAMINĖS BITĖS. ŪMAUS KONTAKTINIO TOKSIŠKUMO BANDYMAS

C.18. ADSORBCIJA/DESORBCIJA TAIKANT STATINĖS PUSIAUSVYROS METODĄ

▼C1

C.19. ADSORBCIJOS KOEFICIENTO (K_{oc}) NUSTATYMAS DIRVOŽEMYJE IR NUOTEKŲ DUMBLE AUKŠTOS SKYRIMO GALIOS SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJA (HPLC)

C.20. DAPHNIA MAGNA REPRODUKCIJOS BANDYMAS

C.21. DIRVOŽEMIO MIKROORGANIZMAI. AZOTO TRANSFORMAVIMO BANDYMAS

C.22. DIRVOŽEMIO MIKROORGANIZMAI. ANGLIES TRANSFORMAVIMO BANDYMAS

C.23. AEROBINIS IR ANAEROBINIS TRANSFORMAVIMAS DIRVOŽEMYJE

C.24. AEROBINIS IR ANAEROBINIS TRANSFORMAVIMAS VANDENS TELKINIŲ DUGNO NUOSĖDŲ SISTEMOSE

C.25. AEROBINĖ MINERALIZACIJA PAVIRŠINIAME VANDENYJE. BIOLOGINIO SKAIDYMO BANDYMO MODELIAVIMAS

C.26. *LEMNA* RŪŠIŲ AUGALŲ AUGIMO SLOPINIMO BANDYMAS

C.27. TOKSIŠKUMO BANDYMAS SU CHIRONOMIDAIS NUOSĖDOSE IR VANDENYJE, NAUDOJANT NUOSĖDAS SU ĮTERPTA BANDOMĄJA CHEMINE MEDŽIAGA

C.28. TOKSIŠKUMO BANDYMAS SU CHIRONOMIDAIS NUOSĖDOSE IR VANDENYJE, NAUDOJANT VANDENĮ SU ĮTERPTA BANDOMĄJA CHEMINE MEDŽIAGA

C.29. LENGVAS BIOLOGINIS SKAIDUMAS. CO_2 SANDARIUOSE INDUOSE (VIRŠUTINĖS ERDVĖS TYRIMAS)

C.30. BIOLOGINIS KAUPIMASIS DUGNO MAŽAŠERĖSE KIRMĖLĖSE

C.31. BANDYMAS SU SAUSUMOS AUGALAIS. DAIGŲ PASIRODYMO IR DAIGŲ AUGIMO BANDYMAS

C.32. ENCHITRĖJŲ REPRODUKCIJOS BANDYMAS

C.33. SLIEKŲ (*EISENIA FETIDA / EISENIA ANDREI*) REPRODUKCIJOS BANDYMAS

C.34. ANAEROBINIŲ BAKTERIJŲ AKTYVUMO SLOPINIMO NUSTATYMAS. ANAEROBIŠKAI (NUOTEKAS) SKAIDANČIO DUMBLO DUJŲ IŠSKYRIMO SUMAŽĖJIMAS

C.35. TOKSIŠKUMO *LUMBRICULUS* DUGNINIŲ NUOSĖDŲ IR VANDENS SISTEMOJE BANDYMAS NAUDOJANT DUGNINES NUOSĖDAS SU ĮTERPTA BANDOMĄJA MEDŽIAGA

C.36. PLĖŠRIŲJŲ ERKIŲ (*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*) REPRODUKCIJOS DIRVOŽEMYJE BANDYMAS

C.37. 21 DIENOS TRUKMĖS ŽUVŲ TYRIMAS. TRUMPALAIKIS ESTROGENINIO BEI ANDROGENINIO VEIKIMO IR AROMATAZĖS SLOPINIMO ATRANKOS TYRIMAS

C.38. VARLIAGYVIŲ METAMORFOZĖS TYRIMAS

▼C1

C.39.	KOLEMBOLŲ REPRODUKCIJOS DIRVOŽEMYJE BANDYMAS
C.40.	CHIRONOMIDŲ GYVAVIMO CIKLO TRUKMĖS TOKSIŠKUMO BANDYMAS NUOSĖDŲ IR VANDENS SISTEMOJE, NAUDOJANT SODRINTĄ VANDENĮ ARBA SODRINTAS NUOSĖDAS
C.41.	ŽUVŲ LYTINIO VYSTYMOSI BANDYMAS
C.42.	BIOLOGINIS SKAIDUMAS JŪROS VANDENYJE
C.43.	ORGANINIŲ JUNGINIŲ ANAEROBINIS BIOLOGINIS SKAIDUMAS SUSKAIDYTAME DUMBLE. DUJŲ SUSIDARYMO MATAVIMO METODAS
C.44.	IŠPLOVIMAS IŠ DIRVOŽEMIO KOLONĖLIŲ
C.45.	IŠMETALŲ PATEKIMO Į APLINKĄ IŠ KONSERVANTAIS APDOROTOS MEDIENOS ĮVERTINIMAS. LABORATORINIS METODAS, TAIKOMAS NEAPDENGTIEMS MEDIENOS GAMINIAMS, KURIE LIEČIASI SU GĖLU IR JŪROS VANDENIU
C.46.	BIOLOGINIS KAUPIMASIS NUOSĖDOSE GYVENANČIOSE DUGNO MAŽAŠERĖSE ŽIEDUOTOSIOSIOSE KIRMĖLĖSE
C.47.	TOKSIŠKUMO ANKSTYVŲJŲ GYVENIMO STADIJŲ ŽUVIMS BANDYMAS
C.48.	TRUMPALAIKIS ŽUVŲ REPRODUKCIJOS TYRIMAS
C.49.	ŪMAUS TOKSIŠKUMO ŽUVŲ EMBRIONAMS (FET) BANDYMAS
C.50.	TOKSIŠKUMO MYRIOPHYLLUM SPICATUM BANDYMAS SISTEMOJE BE NUOSĖDŲ
C.51.	TOKSIŠKUMO MYRIOPHYLLUM SPICATUM BANDYMAS VANDENS IR NUOSĖDŲ SISTEMOJE

▼C1

C.1. ŪMUS TOKSIŠKUMAS ŽUVIMS

1. METODAS

1.1. ĮVADAS

Šio metodo tikslas – nustatyti medžiagos ūmų mirtiną toksiškumą žuvims gėlame vandenyje. Kad būtų galima pasirinkti tinkamiausią bandymo metodą (stacionarų, pusiau stacionarų arba dinaminį), kuriuo visą bandymo laiką būtų užtikrinta pakankamai pastovi bandomosios medžiagos koncentracija, pageidautina turėti kiek galima daugiau informacijos apie medžiagos tirpumą vandenyje, garų slėgį, cheminį patvarumą, disociacijos konstantas ir biologinį skaidumą.

Planuojant bandymą ir aiškinant jo rezultatus, turėtų būti atsižvelgta į papildomą informaciją (pvz., struktūrinė formulė, grynumo laipsnis, reikšmingų priemaišų prigimtis ir procentinis kiekis, priedų buvimas ir jų kiekis, pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolis/vanduo)).

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Ūmus toksiškumas – stebimas neigiamas poveikis, sukeltas organizme per trumpą medžiagos veikimo laiką (paros). Šiame bandyme ūmus toksiškumas išreiškiamas vidutine mirtina koncentracija (LC_{50}) – medžiagos koncentracija vandenyje, nuo kurios per nepertraukiamo veikimo laikotarpį, kurį reikia nurodyti, žūsta 50 % bandomosios partijos žuvų.

Kiekviena bandomosios medžiagos koncentracija nurodoma mase tūrio vienetui (mg/l). Ją dar galima išreikšti mase masės vienetui (mg/kg).

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Kaip priemonė parodyti, kad laboratorinėmis bandymo sąlygomis bandomųjų rūšių gyvūnų reakcija labai nepakito, gali būti atliekamas bandymas su etalonine medžiaga.

Šiam bandymui etaloninės medžiagos nėra apibrėžtos.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Galima atlikti ribinį bandymą su 100 mg/l koncentracija, norint įrodyti, kad LC_{50} yra didesnė nei ši koncentracija.

Žuvys 96 valandas veikiamos bandomąja medžiaga, dedama į vandenį esant tam tikram koncentracijos verčių intervalui. Gaištamumo duomenys užrašomi bent kas 24 valandas, ir, jei įmanoma, per kiekvieną stebėjimo laiko atkarpą apskaičiuojama koncentracija, nuo kurios žūsta 50 % žuvų (LC_{50}).

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Kokybės kriterijai taikomi ir ribinio bandymo metodui, ir viso bandymo metodui.

Gaištamumas kontroliniuose bandymuose bandymo pabaigoje neturi būti didesnis kaip 10 % (arba viena žuvis, jei naudojama mažiau kaip dešimt žuvų).

Ištirpusio deguonies koncentracija visą laiką turi būti didesnė kaip 60 % oro prisotinimo vertės.

▼C1

Bandomosios medžiagos koncentracija visą bandymo laiką laikoma 80 % pradinės koncentracijos vertės ribose.

Medžiagų, kurios lengvai tirpsta bandomojoje terpėje ir kurių tirpalai patvarūs, t. y. kuriuose ištirpinta medžiaga žymiai negaruoja, nesuyra, nesihidrolizuoja arba neadsorbuojama, pradine koncentracija galima laikyti vardinę medžiagos koncentraciją. Turi būti pateikti įrodymai, kad koncentracijos buvo išlaikytos per visą bandymą ir kad kokybės kriterijai buvo įvykdyti.

Medžiagų, kurios:

i) mažai tirpsta bandomojoje terpėje arba

ii) gali sudaryti patvarias emulsijas arba dispersijas; arba

iii) yra nepatvarios vandeniniuose tirpaluose;

pradine koncentracija laikoma koncentracija, nustatyta tirpale (ar, jei techniškai tai neįmanoma, išmatuota vandens tūryje) bandymo pradžioje. Koncentracija nustatoma po to, kai nusistovi pusiausvyra, tačiau prieš įdedant bandomąsias žuvis.

Visais šiais atvejais siekiant patvirtinti faktines veikimo koncentracijas arba kokybės kriterijų vykdymą, bandymo metu turi būti daromi tolesni matavimai.

pH vertė neturi keistis daugiau kaip 1 pH vienetu.

1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Galima naudoti trijų tipų metodiką:

Bandymas stacionariomis sąlygomis

Toksiškumo bandymas, kai bandomasis tirpalas neteka. (Tirpalai visą bandymą nekeičiami).

Bandymas pusiau stacionariomis sąlygomis

Bandymas, kai bandomasis tirpalas neteka, tačiau per ilgesnį laiko tarpą (pvz., kas 24 valandas) daromas reguliarus dozuojamasis bandomojo tirpalo atnaujinimas.

Dinaminis bandymas

Toksiškumo bandymas, kai vanduo bandymo kamerose atnaujinamas visą laiką, bandomąją medžiagą tiekiant su vandeniu, naudojamu bandomajai terpei atnaujinti.

1.6.1. **Reagentai**

1.6.1.1. *Bandomųjų medžiagų tirpalai*

Pradiniai reikiamos koncentracijos tirpalai ruošiami ištirpinant medžiagą dejonizuotame vandenyje arba vandenyje pagal 1.6.1.2.

Pasirinktos bandymo koncentracijos tirpalai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Jei bandomos didelės koncentracijos, medžiaga gali būti tiesiogiai ištirpinta skiedimo vandenyje.

▼C1

Paprastai medžiagos turi būti bandomos tik iki tirpumo ribos. Norint užtikrinti, kad kai kurios medžiagos (pvz., vandenyje mažai tirpios medžiagos, medžiagos, kurių didelis P_{ow}, arba medžiagos, kurios sudaro patvarią dispersiją, o ne tikrąjį tirpalą vandenyje) pasiektų didžiausią tirpią/pastovią koncentraciją, galima atlikti bandymą naudojant koncentraciją, didesnę už medžiagos tirpumo ribą. Tačiau svarbu, kad tokia koncentracija kitais atžvilgiais nesutrikdytų bandymo sistemos (pvz., vandens paviršiuje nesusidarytų bandomosios medžiagos plėvelė, kuri neleistų į vandenį patekti deguoniui, ir t. t.).

Ruošiant vandenyje mažai tirpių medžiagų pradinius tirpalus arba norint pagerinti šių medžiagų dispergavimą bandomojoje terpėje, kaip pagalbinę priemonę galima naudoti dispergavimą ultragarsu, organinius tirpiklius, emulsiklius arba dispergentus. Kai naudojamos tokios pagalbinės medžiagos, visuose bandomųjų koncentracijų tirpaluose turi būti toks pat pagalbinės medžiagos kiekis, ir papildoma kontrolinė žuvis turi būti veikiama pagalbine medžiaga, kurios koncentracija tokia pat, kaip ir bandymų serijoje. Tokių pagalbinių medžiagų koncentracija turi būti kiek įmanoma mažesnė ir jokiu būdu neturi būti didesnė kaip 100 mg/l bandomojoje terpėje.

Bandymas turi būti atliekamas nereguliuojant pH vertės. Jei yra įrodymų apie žymų pH vertės kitimą, patartina bandymą kartoti reguliuojant pH vertę, ir bandymo rezultatus pateikti ataskaitoje. Tokiu atveju pradinio tirpalo pH vertė turi būti pakoreguota iki skiedimo vandens pH vertės, jei nėra ypatingos priežasties to nedaryti. Šiam tikslui geriausia naudoti HC1 ir NaOH. Šis pH reguliavimas turi būti daromas taip, kad bandomosios medžiagos koncentracija pradiniame tirpale žymiai nepasikeistų. Jei reguliuojant pH įvyksta kokia nors cheminė reakcija arba bandomoji medžiaga fiziškai iškrenta į nuosėdas, tai turi būti nurodyta ataskaitoje.

1.6.1.2. *Laikymo ir skiedimo vanduo*

Galima naudoti geriamąjį vandentiekio vandenį (neužterštą potencialiai kenksmingos koncentracijos chloru, sunkiaisiais metalais arba kitomis medžiagomis), geros kokybės gamtinį vandenį arba atkurtąjį vandenį (žr. 1 priedėlį). Geriausiai tinka vanduo, kurio bendrasis kietumas yra nuo 10 iki 250 mg/litre (skaičiuojant $CaCO_3$) ir kurio pH yra nuo 6,0 iki 8,5.

1.6.2. **Aparatūra**

Visa aparatūra turi būti pagaminta iš chemiškai inertiškų medžiagų:

— automatinė skiedimo sistema (dinaminiam bandymui),

— deguonies matuoklis,

— įranga vandens kietumui nustatyti,

— atitinkama termostatavimo aparatūra,

— pH-metras.

1.6.3. **Bandomosios žuvys**

Žuvys turi būti sveikos ir neturėti jokių matomų nenormalumo požymių.

▼C1

Žuvų rūšį reikia rinktis remiantis praktiniais kriterijais, pvz., galimybė žuvis gauti ištisus metus ir priežiūros paprastumas, patogumas bandyti, santykinis jautrumas cheminėms medžiagoms bei kitais reikšmingais ekonominiais, biologiniais arba ekologiniais faktoriais. Be to, renkantis žuvų rūšis, reikia atkreipti dėmesį į gautų duomenų palyginamumo poreikį ir esamą tarptautinį derinimą (1 nuoroda).

Žuvų, kurias rekomenduojama naudoti šiame bandyme, sąrašas pateiktas 2 priedėlyje; tinkamiausios rūšys yra zebrinė danija ir vaivorykštinis upėtakis.

1.6.3.1. *Laikymas*

Pageidautina, kad bandomosios žuvys būtų iš vienos partijos ir panašaus ilgio bei amžiaus. Žuvys turi būti laikomos bent 12 parų tokiomis sąlygomis:

įkrova:

atitinkanti sistemą (su recirkuliavimu arba su pratekėjimu) ir žuvų rūšį,

vanduo:

žr. 1.6.1.2,

šviesa:

kasdienis apšvietimas nuo 12 iki 16 valandų,

ištirpusio deguonies koncentracija:

bent 80 % oro prisotinimo vertės,

maitinimas:

tris kartus per savaitę arba kas dieną, nutraukiant maitinimą prieš 24 valandas iki bandymo pradžios.

1.6.3.2. *Gaištamumas*

Po 48 valandų prisitaikymo laikotarpio užrašomi gaištamumo duomenys ir taikomi tokie kriterijai:

— populiacijos gaištamumas per septynias paras didesnis kaip 10 %:

visa partija atmetama,

— populiacijos gaištamumas 5–10 %:

laikoma dar septynias paras.

Jei gaištamumas nedidėja, partija priimama, priešingu atveju turi būti atmesta,

— populiacijos gaištamumas mažesnis kaip 5 %:

partija priimama.

1.6.4. **Adaptavimas**

Prieš naudojant visos žuvys bent septynias paras turi būti laikomos vandenyje, kurio kokybė ir temperatūra atitinka bandymo sąlygas.

▼C1

1.6.5. **Bandymo procedūra**

Norint gauti informacijos apie koncentracijų, kurias reikia naudoti pagrindiniame bandyme intervalą, prieš galutinį bandymą gali būti atliekamas intervalo nustatymo bandymas.

Atliekamas vienas kontrolinis bandymas be bandomosios medžiagos ir, jei tinka, bandymų serija papildoma dar vienu kontroliniu bandymu, kuriame naudojama pagalbinė medžiaga.

Pagal tai, kokios yra bandomosios medžiagos fizikinės ir cheminės savybės, turi būti pasirinktas bandymas stacionariomis, pusiau stacionariomis sąlygomis arba dinaminis bandymas, kad būtų tenkinami kokybės kriterijai.

Žuvys veikiamos medžiaga, kaip aprašyta toliau:

— trukmė – 96 valandos,

— gyvūnų skaičius – bent 7 vienai koncentracijai,

— rezervuarai – tinkamo tūrio, atsižvelgiant į rekomenduojamą įkrovą,

— įkrova – didžiausia rekomenduojama bandymo stacionariomis ir pusiau stacionariomis sąlygomis įkrova – 1 g/l; sistemoms su pratekėjimu galima naudoti didesnę įkrovą,

— bandomoji koncentracija – bent penkios koncentracijos, kurios skiriasi pastoviu faktoriumi, ne didesniu kaip 2,2, bei kiek įmanoma apima gaištamumo intervalą nuo 0 iki 100 %,

— vanduo – žr. 1.6.1.2,

— šviesa – kasdienis apšvietimas, kurio trukmė nuo 12 iki 16 valandų,

— temperatūra – tinkama rūšiai (2 priedėlis), tačiau konkrečiame bandyme palaikoma ± 1 °C tikslumu,

— ištirpusio deguonies koncentracija – ne mažesnė kaip 60 % oro prisotinimo vertės, pasirinktos temperatūros sąlygomis,

— maitinimas – jokio.

Žuvys tikrinamos po pirmųjų 2–4 valandų ir bent kas 24 valandas. Žuvis laikoma nugaišusia, jei liečiant uodegos stiebelį (*caudal peduncle*) nėra jokios reakcijos ir jei nesimato jokių kvėpavimo judesių. Po apžiūros nugaišusios žuvys pašalinamos ir užrašomas nugaišusių žuvų skaičius. Užrašomi pastebimi nenormalumai (pvz., pusiausvyros netekimas, plaukimo manieros, kvėpavimo funkcijos, pigmentacijos pokyčiai ir t. t.).

pH, ištirpęs deguonis ir temperatūra turi būti matuojami kas dieną.

Ribinis bandymas

Taikant šiame bandymo metode aprašytas metodikas, galima atlikti ribinį bandymą su koncentracija 100 mg/litre, kai norima įrodyti, kad LC_{50} yra didesnė nei ši koncentracija.

Jei medžiagos prigimtis yra tokia, kad 100 mg/litre koncentracijos bandymo vandenyje pasiekti negalima, ribinis bandymas turi būti atliekamas su koncentracija, lygia medžiagos tirpumui (arba su didžiausia koncentracija, kurioje susidaro patvari dispersija) naudojamoje terpėje (dar žr. 1.6.1.1 punktą).

▼C1

Ribinis bandymas turi būti atliekamas su 7–10 žuvų, toks pat žuvų skaičius turi būti naudojamas kontroliniame (-iuose) bandyme (-uose). (Pagal binominio skirstinio teoriją, jei bandyme su 10 žuvų gaištamumas yra nulinis, pasikliovimo tikimybė, kad LC_{50} yra didesnė nei ribiniame bandyme naudota koncentracija, yra 99,9 %. Gaištamumo nebuvimas naudojant 7, 8 arba 9 žuvis rodo bent 99 % pasikliovimo tikimybę, kad LC_{50} yra didesnė nei naudota koncentracija).

Jei gaištamumo atvejų pasitaiko, turi būti atliekamas visas tyrimas. Jei stebimi subletalūs padariniai, tai turi būti užrašyta ataskaitoje.

2. **DUOMENYS IR VERTINIMAS**

Kiekvienam laikotarpiui, kurio rezultatai buvo užrašyti (24, 48, 72 ir 96 valandos), logaritminiame tikimybiniame popieriuje braižykite gaištamumo, nustatyto kiekvienu rekomenduojamu veikimo laikotarpiu, procentinės vertės priklausomybės nuo koncentracijos kreivę.

Kai įmanoma, kiekvienu matavimo laikotarpiu reikia įvertinti LC_{50} ir pasikliovimo ribas ($p = 0,05$), tam taikant standartines metodikas; šios vertės turi būti apvalinamos iki vieno ar, daugiausia, iki dviejų reikšminių skaitmenų (apvalinimo iki dviejų skaitmenų pavyzdys: 170 vietoj 173,5; 0,13 vietoj 0,127; 1,2 vietoj 1,21).

Tais atvejais, kai atsako procentinės vertės ir koncentracijos priklausomybės kreivės polinkis yra per status, kad būtų galima skaičiuoti LC_{50}, pakanka grafinio šios vertės įverčio.

Kai dviem gretimoms koncentracijoms, kurių santykis 2,2, gaunamos 0 ir 100 % gaištamumo vertės, šių dviejų verčių pakanka pažymėti intervalui, į kurį patenka LC_{50}.

Jei pastebima, kad bandomosios medžiagos patvarumo arba homogeniškumo užtikrinti neįmanoma, tai turi būti nurodyta ataskaitoje, o aiškinti rezultatus reikia atsargiai.

3. **ATASKAITA**

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta, jei įmanoma, tokia informacija:

— informacija apie bandomąsias žuvis (mokslinis pavadinimas, veislė, tiekėjas, bet koks išankstinis apdorojimas, dydis ir kiekvienai bandomajai koncentracijai naudotų žuvų skaičius),

— skiedimo vandens šaltinis ir pagrindinės cheminės savybės (pH, kietumas, temperatūra),

— mažai vandenyje tirpios medžiagos atveju, pradinio tirpalo ir bandomųjų tirpalų ruošimo metodas;

— kiekvienos pagalbinės medžiagos koncentracija,

— naudotų koncentracijų sąrašas ir visa turima informacija apie bandomosios medžiagos patvarumą naudotos koncentracijos bandomajame tirpale,

— jei atliekama cheminė analizė, taikyti metodai ir gauti rezultatai,

— ribinio bandymo, jei jis buvo atliekamas, rezultatai,

— taikytos bandymo metodikos pasirinkimo priežastys ir detalės (pvz., stacionariomis sąlygomis, pusiau stacionariomis sąlygomis, dozavimo srautas, pratekėjimo srautas, ar buvo naudojamas aeravimas, žuvų įkrovą ir t. t.),

▼C1

— bandymo įrangos aprašymas,

— apšvietimo režimas,

— ištirpusio deguonies koncentracija bandomuosiuose tirpaluose, jų pH vertė ir temperatūra kas 24 valandas,

— įrodymas, kad kokybės kriterijai įvykdyti,

— lentelė, kurioje pateiktas kiekvieno rekomenduojamo matavimo laikotarpio bendras gaištamumas kiekvienos koncentracijos atveju ir kontroliniame bandyme (ir kontroliniame bandyme su pagalbine medžiaga, jei reikia),

— atsako procentinės vertės priklausomybės nuo koncentracijos kreivės grafikas bandymo pabaigoje,

— jei įmanoma, kiekvieno rekomenduojamo matavimo laikotarpio LC_{50} vertės (su 95 % pasikliovimo ribomis),

— statistinės metodikos, taikytos LC_{50} vertėms nustatyti,

— jei naudota etaloninė medžiaga, gauti rezultatai,

— didžiausia bandomoji koncentracija, kurią naudojant gaištamumas bandymo laikotarpiu yra nulinis,

— mažiausia bandomoji koncentracija, bandymo laikotarpiu sukelianti 100 % gaištamumą.

4. **NUORODOS**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

2) AFNOR-Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* – Static and Flow Through methods – NFT 90–303 June 1985.

3) AFNOR- Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* – Static and Flow – Through methods – NFT 90–305 June 1985.

4) ISO 7346/1, /*2* and/3 – Water Quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan – Teleostei, Cyprinidae). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

5) Eidgenossisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden – Part II 1974.

6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (11) und 1 (15).

7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

8) NEN 6506 – Water – Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.

9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660–75–009, 1975.

10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4–78–012, January 1978.

▼C1

11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

12) Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWW A-WPCF, 1975.

13) Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicityof a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen fur die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

15) Litchfield, J. T.and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, tExp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793–821.

18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3–32.

19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65–84.

20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

▼C1

1 priedėlis

Atkurtasis vanduo

Skiedimui tinkamo vandens pavyzdys

Visos cheminės medžiagos turi būti analiziškai grynos.

Vanduo turi būti geros kokybės distiliuotas vanduo arba dejonizuotas vanduo, kurio savitasis laidumas būtų mažesnis kaip $5\mu Scm^{-1}$.

Vandens distiliavimo aparate neturi būti jokių varinių detalių.

Pradiniai tirpalai

$CaCl_2 \times 2H_2O$ (kalcio chloridas, dihidratas): 11,76 g
Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.

$MgSO_4 \times 7H_20$ (magnio sulfatas, heptahidratas): 4,93 g
Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.

$NaHCO_3$ (natrio hidrokarbonatas): 2,59 g
Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.

KCl (kalio chloridas): 0,23 g
Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.

Atkurtasis skiedimo vanduo

Sumaišykite 25 ml kiekvieno iš šių keturių tirpalų ir praskieskite vandeniu iki 1 litro.

Aeruokite tol, kol ištirpusio deguonies koncentracija pasiekia oro prisotinimo vertę.

pH turi būti 7,8 ± 0,2.

Prireikus reguliuokite pH NaOH (natrio hidroksidu) arba HC1 (druskos rūgštimi).

Taip paruoštą skiedimo vandenį padėkite į šalį 12 valandų, jo nereikia daugiau aeruoti.

Ca ir Mg jonų koncentracijų suma šiame tirpale yra lygi 2,5 mmol/litre. Ca ir Mg jonų santykis lygus 4:1, o Na ir K jonų santykis lygus 10:1. Bendrasis šio tirpalo šarmingumas lygus 0,8 mmol/litre.

Joks nukrypimas nuo skiedimo vandens ruošimo būdo neturi keisti vandens sudėties arba savybių.

▼C1

2 priedėlis

Žuvų rūšys, rekomenduojamos naudoti bandymuose

Rekomenduojamos rūšys	Rekomenduojamas bandymo temperatūros intervalas (°C)	Rekomenduojamas bandomojo gyvūno bendras ilgis (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) Hamilton-Buchanan) Zebrinė danija	nuo 20 iki 24	3,0 ± 0,5
Pimephalespromelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Juodoji drūtgalvė rainė	nuo 20 iki 24	5,0 ± 2,5
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Paprastasis karpis	nuo 20 iki 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlege 1850) Japoninė medaka	nuo 20 iki 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Paprastasis gupis	nuo 20 iki 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758) Melsvažiaunis saulešeris	nuo 20 iki 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Vaivorykštinis upėtakis	nuo 12 iki 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Paprastoji meknė	nuo 20 iki 24	6,0 ± 2,0

Rinkimas

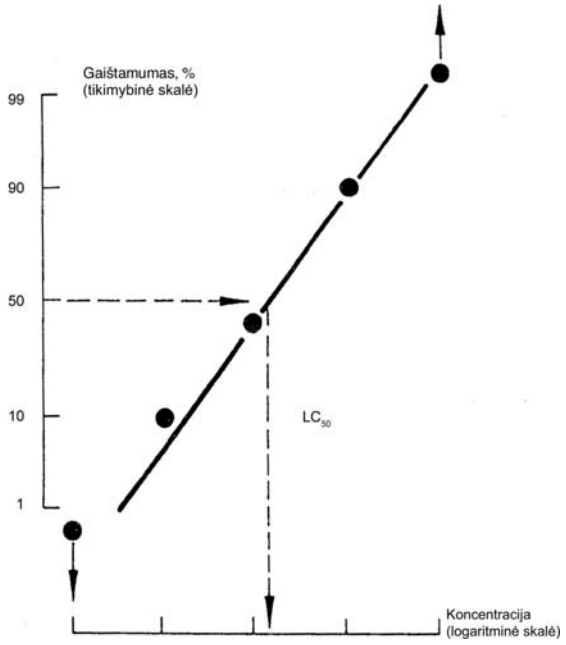
Lentelėje nurodytas žuvis lengva auginti ir (arba) jų galima gauti ištisus metus. Žuvis galima auginti ir veisti žuvų fermose arba laboratorijoje, ligų ir parazitų kontrolės sąlygomis, kad bandomieji gyvūnai būtų sveiki ir būtų žinoma jų kilmė. Šių žuvų yra daugelyje pasaulio kraštų.

▼C1

3 priedėlis

Koncentracijos pavyzdys. Gaištamumo dalis procentais

LC_{50} nustatymo naudojant logaritminį tikimybinį popierių pavyzdys



▼C1

C.2. **DAPHNIA SP. ŪMAUS JUDRUMO SLOPINIMO (IMOBILIZAVIMO) BANDYMAS**

1. METODAS

Šis ūmaus judrumo slopinimo bandymas atitinka OECD TG 202 (2004).

1.1. ĮVADAS

Šiame bandymo metode aprašomas ūmaus toksiškumo bandymas, skirtas įvertinti cheminių medžiagų poveikį dafnijoms. Kiek įmanoma buvo naudojami esami bandymo metodai (1)(2)(3).

1.2. SĄVOKOS

Šiame bandymo metode taikomos šios sąvokos:

EC_{50} – apskaičiuotoji koncentracija, kuriai esant 50 % dafnijų nustoja judėti per nustatytą veikimo laikotarpį. Jei vartojama kita apibrėžtis, ji ir jos nuoroda turi būti pateiktos ataskaitoje.

Judrumo slopinimas (imobilizavimas) – imobilizuotais laikomi tie gyvūnai, kurie negali plaukti praėjus 15 s nuo švelnaus bandymo indo purtymo (net jei jie vis dar gali judinti čiulptukus).

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Jaunos dafnijos, kurių amžius bandymo pradžioje mažesnis kaip 24 h, 48 h veikiamos įvairios koncentracijos bandomąja medžiaga. Judrumo slopinimo duomenys užrašomi po 24 h bei 48 h ir lyginami su kontrolinėmis vertėmis. Rezultatai analizuojami po 48 h siekiant apskaičiuoti EC_{50} (apibrėžtys pateiktos 1.2 skirsnyje). Papildomai galima nustatyti EC_{50} po 24 h.

1.4. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

Turėtų būti žinomas bandomosios medžiagos tirpumas vandenyje ir garų slėgis, be to, reikėtų turėti patikimą analizės metodą medžiagos kiekiui bandomuosiuose tirpaluose nustatyti, kurio regeneravimo laipsnis ir ribinė nustatymo vertė būtų žinomi. Naudinga žinoti medžiagos struktūrinę formulę, grynumą, patvarumą vandenyje arba veikiant šviesai, P_{ow} ir lengvo biologinio skaidumo bandymo rezultatus (žr. C.4 metodą).

Pastaba. Nurodymai, kaip bandyti medžiagas, kurių fizikinės ir cheminės savybės apsunkina jų bandymą, pateikti (4).

1.5. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Siekiant įsitikinti, kad bandymo sąlygos yra patikimos, galima atlikti bandymus etaloninės medžiagos EC_{50} nustatyti. Šiam tikslui rekomenduojama naudoti tarplaboratoriniuose bandymuose naudotas toksines medžiagas (1)(5) ([1]). Bandymą (-us) su etalonine medžiaga būtų gerai kartoti kas mėnesį, bet ne rečiau kaip du kartus per metus.

([1]) Pagal šiuos tarplaboratorinių bandymų rezultatus ir ISO 6341 techninę pataisą kalio dichromato ($K_2Cr_2O_7$) EC_{50} vertė po 24 h yra nuo 0,6 mg/l iki 1,7 mg/l.

▼C1

1.6. KOKYBĖS KRITERIJAI

Bandymas yra tinkamas, jei laikomasi šių kriterijų:

— kontroliniuose ėminiuose, įskaitant ėminius, turinčius tirpinimo priemonę, imobilizuota ne daugiau kaip 10 % dafnijų,

— pasibaigus bandymui, ištirpusio deguonies koncentracija kontroliniuose ir bandymo induose turėtų būti ≥ 3 mg/l.

Pastaba. Kalbant apie pirmą kriterijų, judrumo slopinimas arba kiti ligos arba įtampos požymiai, pvz., spalvos kitimas, neįprastas elgesys, pvz., iškilimas į vandens paviršių, turėtų pasireikšti ne daugiau kaip 10 % kontrolinių dafnijų.

1.7. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.7.1. **Aparatūra**

Bandymo indai ir kiti prietaisai, kurie liečiasi su bandomaisiais tirpalais, turi būti pagaminti vien tik iš stiklo arba kitos chemiškai inertiškos medžiagos. Bandymui paprastai naudojami stikliniai mėgintuvėliai arba cheminės stiklinės; prieš kiekvieną naudojimą jos turėtų būti plaunamos taikant įprastas laboratorijos procedūras. Bandymo indai nesandariai uždaromi, kad būtų sumažinti vandens nuostoliai dėl garavimo ir dulkės nepatektų į tirpalus. Lakiosios medžiagos turėtų būti bandomos visiškai užpildytuose uždarytuose induose, kurie būtų pakankamai dideli, kad deguonies koncentracija nepasiektų ribinių arba per mažų verčių (žr. 1.6 skirsnį ir 1.8.3 skirsnio pirmą pastraipą).

Be to, naudojama kai kuri arba visa toliau išvardyta įranga: deguonies matuoklis (su mikroelektrodu arba kitokiu įtaisu, tinkamu ištirpusiam deguoniui mažo tūrio ėminiuose matuoti); pH-metras; tinkamas įtaisas temperatūrai reguliuoti; įranga bendrajai organinei angliai (TOC) nustatyti; įranga cheminiam deguonies suvartojimui (COD) nustatyti; įranga vandens kietumui nustatyti ir t. t.

1.7.2. **Bandomasis organizmas**

Daphnia magna Straus yra labiausiai bandymui tinkama rūšis, nors leidžiama naudoti ir kitas tinkamas *Daphnia* rūšis (pvz., *Daphnia pulex*). Pradedant bandymą, gyvūnai turi būti jaunesni kaip 24 h amžiaus ir, siekiant sumažinti kintamumą, labai rekomenduojama nenaudoti pirmosios dafnijų palikuonių vados. Jos turėtų būti gautos iš sveikos pradinės kultūros (t. y. nerodančios įtampos požymių, pvz., didelio gaištamumo, vyriškos lyties atstovų ir kiaušinėlių (*ephippia*) buvimo, pirmosios vados vėlavimo, gyvūnų spalvos pasikeitimo ir t. t.). Visų konkrečiam bandymui naudojamų organizmų kultūra turėtų būti gauta iš tos pačios pradinės dafnijų kultūros. Pradinės kultūros gyvūnus reikėtų laikyti tokiomis sąlygomis (šviesa, temperatūra, terpė), kurios būtų panašios į bandymo sąlygas. Jei bandymui reikalinga terpė skiriasi nuo įprastos dafnijų kultūros terpės, būtų gerai numatyti dafnijų aklimatizavimo laikotarpį. Todėl veislei naudojamos dafnijos bent 48 h iki bandymo pradžios laikomos skiedimo vandenyje esant bandymo temperatūrai.

▼C1

1.7.3. **Laikymo ir skiedimo vanduo**

Laikymo ir skiedimo vanduo gali būti gamtinis vanduo (paviršinis arba gruntinis vanduo), atkurtasis arba vandentiekio vanduo, iš kurio pašalinamas chloras, jei dafnijos jame išgyvena kultūros veisimo, aklimatizavimo ir bandymo laikotarpiu, nerodydamos įtampos požymių. Bet koks vanduo, kuris atitinka 1 priedėlyje išvardytas priimtino skiedimo vandens chemines charakteristikas, tinka bandymui. Jo kokybė turėtų būti stabili visą bandymo laiką. Atkurtasis vanduo gali būti gaminamas į dejonizuotą arba distiliuotą vandenį dedant tam tikrus pripažinto analizinio grynumo reagentų kiekius. Atkurtojo vandens pavyzdžiai pateikti (1) (6) ir 2 priedėlyje. Būtina atkreipti dėmesį, kad tiriant metalų turinčias medžiagas, reikia vengti naudoti terpes, turinčias žinomus chelantus, tokias kaip 2 priedėlyje nurodytas M4 ir M7 terpes. pH vertė turi būti nuo 6 iki 9. *Daphnia magna* rekomenduojamas vandens kietumas – nuo 140 iki 250 mg/l (skaičiuojant $CaCO_3$), o kitoms *Daphnia* rūšims gali tikti mažesnis kietumas. Prieš naudojant bandymui, skiedimo vandenį galima aeruoti, kad ištirpusio deguonies koncentracija pasiektų sotį.

Jei naudojamas gamtinis vanduo, kokybės parametrus reikėtų matuoti bent du kartus per metus arba kilus įtarimui, kad šios charakteristikos galėjo labai pasikeisti (žr. pirmesnę pastraipą ir 1 priedėlį). Be to, reikėtų nustatyti sunkiųjų metalų (pvz., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni) kiekį. Jei naudojamas vandentiekio vanduo, iš kurio pašalintas chloras, pageidautina kasdien atlikti chloro analizę. Jei skiedimo vandens šaltinis yra paviršinis arba gruntinis vanduo, reikėtų matuoti savitąjį laidį ir bendrąją organinę anglį (TOC) arba cheminį deguonies suvartojimą (COD).

1.7.4. **Bandomieji tirpalai**

Pasirinktos koncentracijos bandomieji tirpalai paprastai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Pradinius tirpalus geriau ruošti tirpinant bandomąją medžiagą skiedimo vandenyje. Kiek įmanoma reikia vengti naudoti tirpiklius, emulsiklius arba dispergentus. Tačiau kartais tokių junginių gali prireikti tinkamos koncentracijos pradiniam tirpalui ruošti. Nurodymai dėl tinkamų tirpiklių, emulsiklių ir dispergentų pateikti (4). Bet kuriuo atveju bandomosios medžiagos koncentracija bandomuosiuose tirpaluose neturi būti didesnė kaip tirpumo skiedimo vandenyje ribinė vertė.

Bandymas turėtų būti atliekamas nereguliuojant pH. Jei pH vertė yra ne 6–9 intervale, gali būti atliekamas antras bandymas, pradinio tirpalo pH nustatant pagal skiedimo vandens pH vertę, buvusią iki bandomosios medžiagos pridėjimo. pH reguliuojamas taip, kad pradinio tirpalo koncentracija labai nesikeistų ir nepradėtų vykti kokia nors cheminė reakcija arba nesusidarytų bandomosios medžiagos nuosėdos. Labiausiai tinka HC1 ir NaOH.

▼C1

1.8. PROCEDŪRA

1.8.1. **Veikimo sąlygos**

1.8.1.1. *Bandomosios ir kontrolinės grupės*

Į bandymo indus įpilami reikalingi skiedimo vandens ir bandomosios medžiagos tūriai. Oro/vandens tūrio santykis inde turi būti vienodas bandomosioms ir kontrolinėms grupėms. Tuomet į bandymo indus dedamos dafnijos. Kiekvienai bandomajai koncentracijai ir kiekvienam kontroliniam ėminiui reikia naudoti bent 20 gyvūnų, kuriuos geriau būtų padalyti į keturias grupes po penkis gyvūnus. Kiekvienam gyvūnui turėtų tekti bent 2 ml bandomojo tirpalo (t. y. 10 ml tūris penkioms dafnijoms bandymo inde). Bandymą galima atlikti taikant pusiau statinį atnaujinimą arba pratekėjimo sistemą, kai bandomosios medžiagos koncentracija nėra pastovi.

Be tirpalų grupės su bandomąja medžiaga bandymų turi būti atliekamas vienos kontrolinės skiedimo vandens ėminių grupės bandymas ir prireikus vienos kontrolinės ėminių grupės su tirpinimo medžiaga bandymas.

1.8.1.2. *Bandomosios koncentracijos vertės*

Jei nėra informacijos apie bandomosios medžiagos toksiškumą, galima atlikti intervalo nustatymo bandymą galutinio bandomosios koncentracijos intervalo vertėms nustatyti. Šiuo tikslu dafnijos veikiamos bandomosios medžiagos tirpalais, kurių koncentracijos vertės labai skiriasi. Penkios dafnijos veikiamos kiekvienos koncentracijos tirpalu 48 h arba mažiau, kartotiniai ėminiai nebūtini. Veikimo laikotarpį galima sutrumpinti (pvz., 24 h arba mažiau), jei intervalo nustatymo bandymui tinkamus duomenis galima gauti per trumpesnį laiką.

Turėtų būti naudojamos bent penkios koncentracijos vertės. Jos turi sudaryti geometrinę progresiją, kurios vardiklis geriausiu atveju neturėtų būti didesnis kaip 2,2. Jei naudojama mažiau koncentracijos verčių, tai būtina pagrįsti. Pageidautina, kad didžiausia bandomoji koncentracija slopintų judrumą 100 %, o mažiausia bandomoji koncentracija nedarytų pastebimo poveikio.

1.8.1.3. *Inkubavimo sąlygos*

Temperatūra turi būti 18 °C–22 °C ir atliekant kiekvieną atskirą bandymą ji neturi nukrypti daugiau kaip ± 1 °C. Rekomenduojamas 16 h šviesos ir 8 h tamsos ciklas. Be to, priimtina visiška tamsa, ypač jei bandomosios medžiagos yra nestabilios veikiant šviesai.

Atliekant bandymą indų turinys neaeruojamas. pH vertė nereguliuojama visą bandymą. Atliekant bandymą dafnijos pašaro negauna.

1.8.1.4. *Trukmė*

Bandymo trukmė 48 h.

1.8.2. **Stebėjimai**

Kiekvienas bandymo indas turi būti tikrinamas po 24 h ir 48 h nuo bandymo pradžios, siekiant nustatyti, ar yra nejudančių dafnijų (apibrėžtys pateiktos 1.2 skirsnyje). Be judrumo slopinimo duomenų ataskaitoje turi būti pateikti duomenys apie bet kokį neįprastą elgesį arba išvaizdą.

▼C1

1.8.3. **Analiziniai matavimai**

Bandymo pradžioje ir pabaigoje matuojama ištirpusio deguonies koncentracija ir pH vertė kontrolinio (-ių) ėminio (-ių) ir didžiausios bandomosios medžiagos koncentracijos induose. Kontrolinių ėminių ištirpusio deguonies koncentracija turi atitikti bandymo tinkamumo kriterijų (žr. 1.6 skirsnį). pH vertė bet kuriame iš bandymo indų paprastai neturėtų keistis daugiau kaip 1,5 vieneto. Paprastai temperatūra matuojama kontrolinių ėminių induose arba aplinkos oro temperatūra ir būtų gerai, jei ji būtų užrašoma nepertraukiamai visą bandymą arba bent bandymo pradžioje ir pabaigoje.

Bandomosios medžiagos koncentracija turėtų būti matuojama bandymo pradžioje ir pabaigoje bent tuose induose, kuriuose bandomoji koncentracija yra mažiausia ir didžiausia (4). Rekomenduojama rezultatus pagrįsti matuojamomis koncentracijos vertėmis. Tačiau jei yra duomenų, kurie leistų įrodyti, kad visą bandymą bandomosios medžiagos koncentracija nenukrypo daugiau kaip ± 20 % nuo vardinės arba išmatuotos pradinės koncentracijos vertės, rezultatai gali būti grindžiami vardinėmis arba išmatuotomis pradinėmis vertėmis.

1.9. RIBINIS BANDYMAS

Taikant šiame bandymo metode aprašytas procedūras, galima atlikti ribinį bandymą su bandomosios medžiagos koncentracija 100 mg/l arba koncentracija iki ribinio tirpumo vertės (iš šių dviejų pasirenkant mažesnę), jei norima įrodyti, kad EC_{50} yra didesnė už šią koncentraciją. Ribinis bandymas turi būti atliekamas su 20 dafnijų (geriausia, kad jos būtų suskirstytos į keturias grupes po penkias dafnijas), tas pats dafnijų skaičius turi būti naudojamas kontroliniam (-iams) bandymui (-ams). Jei vyksta koks nors judrumo slopinimas, turi būti atliekamas visas tyrimas. Turi būti užrašytas kiekvienas neįprasto elgesio atvejis.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turi būti apibendrinti lentelėse, nurodant kiekvienai apdorotai ir kontrolinei grupei naudotų dafnijų skaičių, judrumo slopinimą kiekvieno stebėjimo metu. Braižomas po 24 h ir 48 h nejudančių dafnijų procentinės dalies kaip bandomosios koncentracijos funkcijos grafikas. Duomenys analizuojami taikant atitinkamus statistinius metodus (pvz., probitų analizę ir t. t.) kreivių krypties koeficientams ir EC_{50} vertėms apskaičiuoti, esant 95 % pasikliovimo riboms ($p = 0,05$) (7) (8).

Jei gautiems duomenims standartiniai EC_{50} apskaičiavimo metodai netinka, turi būti naudojama didžiausia koncentracija, kuri dar nesukelia judrumo slopinimo, ir mažiausia koncentracija, sukelianti 100 % judrumo slopinimą, apytikrei EC_{50} vertei gauti (ja laikomas šių dviejų koncentracijos verčių geometrinis vidurkis).

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

— fizikinė būsena ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės,

▼C1

— cheminės medžiagos identifikavimo duomenys, įskaitant grynumą.

Bandomieji gyvūnai:

— *Daphnia* šaltinis ir rūšis, tiekėjas (jei žinomas) ir naudotos kultūros auginimo sąlygos (įskaitant pašaro šaltinį, rūšį ir kiekį, šėrimo dažnumą).

Bandymo sąlygos:

— bandymo indų aprašymas: indų tipas, tirpalo tūris, dafnijų skaičius viename bandymo inde, bandymo indų (kartotinių) skaičius vienai koncentracijai,

— pradinio ir bandomojo tirpalų ruošimo metodai, įskaitant kokio nors tirpiklio arba dispergento naudojimą, naudotos koncentracijos vertės,

— duomenys apie skiedimo vandenį: šaltinis ir vandens kokybės charakteristikos (pH, kietumas, Ca/Mg santykis, Na/K santykis, šarmingumas, savitasis laidis ir t. t.); atkurtojo vandens sudėtis, jei naudojamas,

— inkubavimo sąlygos: temperatūra, šviesos intensyvumas ir periodiškumas, ištirpusio deguonies kiekis, pH ir t. t.

Rezultatai:

— kiekvieno stebėjimo metu imobilizuotų dafnijų arba dafnijų, kurioms pasireiškė kitoks neigiamas poveikis (įskaitant neįprastą elgesį), skaičius ir procentinė dalis kontroliniuose ėminiuose ir kiekvienoje apdorotoje grupėje, taip pat stebimo poveikio tipo aprašymas,

— bandymo su etalonine medžiaga rezultatai ir data, jei yra,

— vardinės bandomosios koncentracijos vertės ir visų analizių bandomosios medžiagos koncentracijai bandymo induose nustatyti rezultatai; be to, ataskaitoje turi būti pateiktas metodo regeneravimo laipsnis ir ribinė nustatymo vertė,

— visi bandymo metu atlikti fizikiniai ir cheminiai temperatūros, pH ir ištirpusio deguonies matavimai,

— judrumo slopinimo EC_{50} po 48 h, nurodant pasikliovimo intervalus ir jiems apskaičiuoti naudotus regresijos modelių grafikus, dozės ir atsako kreivių krypties koeficientai ir jų standartinis nuokrypis; statistinės procedūros, taikytos EC_{50} nustatyti; (be to, ataskaitoje turi būti nurodyti judrumo slopinimo duomenys, gauti po 24 h, jei jie buvo matuojami),

— visų nukrypimų nuo bandymo metodo paaiškinimas ir nurodymas, ar nukrypimas turėjo įtakos bandymo rezultatams.

4. **NUORODOS**

1) ISO 6341. (1996). Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Third edition,

2) EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines – Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼C1

3) Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

4) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and SAFEty Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.

5) Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia*.

6) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

7) Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 – American Society for Testing and Materials. p. 65–84

8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼C1

1 priedėlis

KAI KURIOS TINKAMO SKIEDIMO VANDENS CHEMINĖS CHARAKTERISTIKOS

Medžiaga	Koncentracija
Kietosios dalelės	< 20 mg/l
Bendroji organinė anglis	< 2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	< 1 µg/l
Liekamasis chloras	< 10 µg/l
Bendras organinių fosforo pesticidų kiekis	< 50 ng/l
Bendras organinių fosforo pesticidų ir polichlorintų bifenilų kiekis	< 50 ng/1
Bendras organinio chloro kiekis	< 25 ng/1

▼C1

2 priedėlis

TINKAMO ATKURTOJO BANDYMO VANDENS PAVYZDŽIAI

ISO bandymo vanduo (1)

Pradiniai tirpalai (atskiros medžiagos)		Atkurtajam vandeniui paruošti į 1 l vandens įpilamas šis pradinių tirpalų tūris (*)
Medžiaga	Kiekis, įdedamas į 1 l vandens (*)	
Kalcio chloridas $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Magnio sulfatas $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Natrio hidrokarbonatas $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Kalio chloridas KCl	0,23 g	25 ml

(*) Tinkamo grynumo vanduo, pvz., dejonizuotas, distiliuotas arba atvirkštinio osmoso būdu gautas vanduo, kurio savitasis laidis būtų ne didesnis kaip 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Elendt M7 ir M4 terpė

Aklimatizavimas Elendt M7 ir M4 terpėje

Kai kurios laboratorijos turėjo sunkumų, norėdamos dafnijas perkelti tiesiai į M4 ir M7 terpes. Labiau pasisekė jas aklimatizuojant laipsniškai, t. y. perkeliant dafnijas iš jų terpės į 30 % *Elendt*, paskui į 60 % *Elendt* ir pagaliau į 100 % *Elendt*. Gali reikėti aklimatizuoti visą mėnesį.

Ruošimas

Mikroelementai

Atskirų mikroelementų pradiniai tirpalai (I) iš pradžių ruošiami naudojant tinkamo grynumo vandenį, pvz., dejonizuotą, distiliuotą arba atvirkštinio osmoso būdu gautą vandenį. Iš šių skirtingų tirpalų (I) ruošiamas antras pradinis tirpalas (II), turintis visus mikroelementus (sudėtinis tirpalas), t. y.:

I pradinis (-iai) tirpalas (-ai) (atskira medžiaga)	Į vandenį įdėtas kiekis (mg/l)	Koncentracija (palyginti su M4 terpe) (kartų)	II pradiniam sudėtiniam tirpalui paruošti į vandenį įpilamas šis I pradinio tirpalo tūris (ml/l)	
			M4	M7
H_3 BO_3	57 190	20 000	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25

▼C1

I pradinis (-iai) tirpalas (-ai) (atskira medžiaga)	Į vandenį įdėtas kiekis (mg/l)	Koncentracija (palyginti su M4 terpe) (kartų)	II pradiniam sudėtiniam tirpalui paruošti į vandenį įpilamas šis I pradinio tirpalo tūris (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
$Na_2\ MoO_4.2H_2O$	1 230	20 000	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20 000	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_2O$	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
$Na_2\ SeO_3$	43,8	20 000	1,0	1,0
$NH_4\ VO_3$	11,5	20 000	1,0	1,0
Na_2 EDTA.$2H_2O$	5 000	2 000	—	—
$FeSO_4.7H_2O$	1 991	2 000	—	—

Na2EDTA ir $FeSO_4$ tirpalai ruošiami atskirai, supilami kartu ir iškart apdorojami autoklave.

Taip gaunama:

2 1 Fe-EDTA tirpalas		1 000	20,0	5,0

M4 ir M7 terpės

M4 ir M7 terpės, naudojant II pradinį tirpalą, makroelementus ir vitaminus, yra ruošiamos taip:

	Į vandenį įdėtas kiekis (mg/l)	Koncentracija (palyginti su M4 terpe) (kartų)	Terpei ruošti įpilto II pradinio tirpalo tūris (ml/l)	
			M4	M7
II pradinis tirpalas (mikroelementų mišinys)		20	50	50
Pradiniai mitybinių makroelementų tirpalai (atskira medžiaga)				
$CaCl_2 \cdot 2H_20$	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000	1,0	1,0
$Na_2\ SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000	0,1	0,1
$KH_2\ PO_4$	1 430	10 000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000	0,1	0,1

▼C1

	Į vandenį įdėtas kiekis (mg/l)	Koncentracija (palyginti su M4 terpe) (kartų)	Terpei ruošti įpilto II pradinio tirpalo tūris (ml/1)	
			M4	M7
Vitaminų mišinio pradinis tirpalas	—	10 000	0,1	0,1
Vitaminų mišinio pradinis tirpalas ruošiamas į 1 litrą vandens įdedant tokį 3 vitaminų kiekį:				
Tiamino hidrochloridas	750	10 000		
Cianokobalaminas (B_{12})	10	10 000		
Biotinas	7,5	10 000		

Vitaminų mišinio pradinis tirpalas laikomas užšaldytas mažomis alikvotinėmis dalimis. Į terpę vitaminai dedami prieš pat naudojimą.

Pastaba.: Jei ruošiant galutinę terpę norima išvengti druskų nuosėdų susidarymo, alikvotinės pradinio tirpalo dalys pilamos į maždaug 500–800 ml dejonizuoto vandens ir skiedžiama iki 1 litro.

Pastaba.: Pirmąją publikaciją apie M4 terpę galima rasti *Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in* Daphnia magna *Straus*. Protoplasma, 154, p. 25–33.

▼M6

C.3. GĖLAVANDENIŲ DUMBLIŲ IR MELSVABAKTERIŲ AUGIMO SLOPINIMO BANDYMAS

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 201 (2006 m., priedas pataisytas 2011 m.). Nustatyta, kad šį bandymo metodą reikėtų taikyti tam tikroms papildomoms rūšims ir atnaujinti, kad jis atitiktų cheminių medžiagų pavojingumo vertinimo ir klasifikacijos reikalavimus. Šis pakeitimas atliktas remiantis gausia sukaupta praktine patirtimi, cheminių medžiagų toksiškumo dumbliams tyrimų srities mokslo pažanga ir tuo, kad iš pradžių patvirtinus šį metodą, jis pradėtas plačiai taikyti reglamentavimo reikmėms.

2. Vartojamos sąvokos apibrėžtos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

3. Šio bandymo paskirtis – nustatyti cheminės medžiagos poveikį gėlavandenių mikrodumblių ir (arba) melsvabakterių augimui. Eksponentiškai augantys bandomieji organizmai atskiromis partijomis paruoštose kultūrose yra paprastai 72 valandas veikiami bandomosios cheminės medžiagos. Nors bandymo trukmė gana trumpa, per jį galima įvertinti poveikį kelioms organizmų kartoms.

4. Sisteminis atsakas į poveikį yra dumblių kultūrų (bandymo vienetų) serijos, veikiamos įvairių koncentracijų bandomosios cheminės medžiagos, augimo sulėtėjimas. Šis atsakas vertinamas kaip bandomosios medžiagos koncentracijos funkcija tos medžiagos poveikio nepatyrusių kontrolinių kultūrų vidutinio augimo kartotiniuose bandiniuose atžvilgiu. Siekiant, kad visapusiškai pasireikštų sisteminis atsakas į toksinį poveikį (optimalusis jautris), organizmų kultūros turėtų pakankamai ilgą laiko tarpą nevaržomai eksponentiškai augti nestokodamos mitybinių medžiagų ir nuolatinio apšvietimo sąlygomis, po to išmatuojant savitojo augimo greičio sumažėjimą.

5. Augimas ir augimo slopinimas kiekybiškai nustatomi matuojant dumblių biomasės pokyčius laike. Dumblių biomasė išreiškiama sausosios medžiagos mase tūrio vienetui, pvz., kiek miligramų dumblių yra viename bandymo tirpalo litre. Kadangi sausosios medžiagos masę matuoti sunku, vietoj jos naudojami pakaitiniai parametrai. Iš jų dažniausiai pasirenkamas ląstelių skaičius; kiti pakaitiniai parametrai yra ląstelių tūris, fluorescencija, optinis tankis ir t. t. Turėtų būti žinomas išmatuoto pakaitinio parametro perskaičiavimo į biomasę koeficientas.

6. Bandymo vertinamoji baigtis yra augimo slopinimas, išreiškiamas kaip biomasės didėjimo bandomosios medžiagos veikimo laikotarpiu logaritminis dydis (vidutinis savitasis augimo greitis). Pagal vidutinius savituosius augimo greičius, išmatuotus naudojant bandymo tirpalų seriją, nustatoma konkretų procentinį augimo greičio sumažėjimą x % (pvz., 50 %) sukelianti bandomosios medžiagos koncentracija, kuri išreiškiama E_rC_x (pvz., E_rC_{50}).

7. Taikant šį bandymo metodą naudojamas papildomas atsako kintamasis – išeiga, kurią gali reikėti nustatyti pagal kai kurių valstybių konkrečius norminius reikalavimus. Išeiga apibrėžiama kaip biomasės skirtumas, atsiradęs nuo bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžios iki pabaigos. Pagal išeigą, nustatytą naudojant bandymo tirpalų seriją, apskaičiuojama konkretų procentinį išeigos sumažėjimą x % (pvz., 50 %) sukelianti koncentracija, kuri išreiškiama E_yC_x (pvz., E_yC_{50}).

8. Taip pat galima statistiškai nustatyti mažiausią pastebėto poveikio koncentraciją (LOEC) ir nepastebėto poveikio koncentraciją (NOEC).

▼M6

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

9. Nustatant bandymo sąlygas gali būti naudinga žinoti šią informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą: jos struktūrinę formulę, grynumą, patvarumą veikiant šviesai, patvarumą bandymo sąlygomis, šviesos sugerties savybes, pKa ir virsmo tyrimų rezultatus, įskaitant biologinį skaidumą vandenyje.

10. Reikėtų žinoti bandomosios medžiagos tirpumą vandenyje, oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientą (P_{ow}) ir garų slėgį; turėtų būti taikomas patvirtintas metodas tos medžiagos kiekiui bandymo tirpaluose nustatyti, žinant jos regeneravimo našumą ir aptikimo ribą.

BANDYMO TINKAMUMAS

11. Tinkamas bandymas turėtų atitikti šiuos veiksmingumo kriterijus:

— per 72 val. bandymo laikotarpį kontrolinių kultūrų biomasė turėtų eksponentiškai padidėti bent 16 kartų; tai atitinka savitąjį augimo greitį 0,92 para^{-1}. Bandymams dažniausiai naudojamų rūšių organizmai paprastai auga kur kas greičiau (žr. 2 priedėlį). Bandymas gali neatitikti šio kriterijaus, kai pasirinktos rūšies organizmai auga lėčiau negu 2 priedėlyje išvardytų rūšių organizmai. Tokiu atveju bandymo laikotarpį reikėtų pratęsti iki tol, kol kontrolinės kultūros padidės bent 16 kartų; augimas turi būti eksponentinis per visą bandymo laikotarpį. Jeigu reikiamas padidėjimo koeficientas – 16 kartų – pasiekiamas greičiau, bandymo laikotarpį galima sutrumpinti (minimali trukmė yra 48 val.), palaikant neribotą, eksponentinį augimą per visą bandymą;

— kontrolinių kultūrų savitųjų augimo greičių atskirais laiko tarpais (0–1, 1–2 ir 2–3 paros per 72 val. trukmės bandymą) vidutinis variacijos koeficientas (žr. variacijos koeficiento apibrėžtį 1 priedėlyje) neturi viršyti 35 %. Kaip apskaičiuoti savitąjį augimo greitį atskirais laiko tarpais per bandymą, nurodyta 49 skirsnyje. Šis kriterijus taikomas vidutinei variacijos koeficientų, apskaičiuotų naudojant kontrolines kultūras kartotiniuose bandiniuose, vertei;

— bandymams naudojant *Pseudokirchneriella subcapitata* ir *Desmodesmus subspicatus*, kartotinių bandinių kontrolinių kultūrų vidutinių savitųjų augimo greičių visu bandymo laikotarpiu variacijos koeficientas neturi viršyti 7 %; bandymui naudojant kitas, mažiau įprastas rūšis, ši vertė neturėtų viršyti 10 %.

ETALONINĖ CHEMINĖ MEDŽIAGA

12. Bandymo procedūrai patikrinti galima atlikti bandymą su etalonine chemine medžiaga arba medžiagomis, pvz., 3,5-dichlorfenoliu, kuris naudotas per tarptautinį tarplaboratorinį bandymą (1). Atliekant bandymus su žaliadumbliais, kaip etaloninę cheminę medžiagą taip pat galima naudoti kalio dichromatą. Etaloninės cheminės medžiagos bandymus patartina atlikti bent dukart per metus.

BANDYMO TAIKOMUMAS

13. Šį bandymo metodą lengviausia taikyti vandenyje tirpioms cheminėms medžiagoms, kurios bandymo sąlygomis paprastai lieka vandenyje. Bandymams naudojant lakias, lengvai įsigeriančias (adsorbuojamas), spalvingas, vandenyje mažai tirpias chemines medžiagas arba medžiagas, kurios gali

▼M6

paveikti mitybinių arba mineralinių medžiagų įsisavinimą iš bandymo terpės, gali reikėti atitinkamai pakeisti aprašytą bandymo procedūrą (pvz., bandymą atlikti uždaroje sistemoje, kondicionuoti bandymo indus). Rekomendacijų dėl kai kurių tinkamų pakeitimų pateikta literatūroje (2), (3), (4).

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

14. Bandymo indai ir kita aparatūra, su kuria liečiasi bandymo tirpalai, turėtų būti pagaminti tik iš stiklo ar kitos chemiškai inertinės medžiagos. Bandymo reikmenys turėtų būti kruopščiai plaunami, taip užtikrinant, kad dumblių augimo ar bandymo tirpalų sudėties nepaveiktų jokie organiniai ar neorganiniai teršalai.

15. Įprasti bandymo indai yra stiklinės kolbos – tokių matmenų, kad pakaktų bandomųjų organizmų kultūros tūriui išmatuoti per bandymą ir į jas patektų pakankama anglies dioksido masė iš aplinkos oro (žr. 30 skirsnį). Atminkite, kad skysčio tūris turi būti pakankamas analiziniams nustatymams (žr. 37 skirsnį).

16. Be to, per bandymą gali reikėti kai kurių arba visų toliau išvardytų įrenginių.

— Kultūros auginimo aparatūra. Rekomenduojama naudoti spintą arba kamerą, kurioje būtų galima ± 2 °C tikslumu palaikyti pasirinktą inkubacijos temperatūrą.

— Apšvietimo matavimo prietaisai. Svarbu pažymėti, kad matuojamos vertės gali priklausyti nuo šviesos stiprio matavimo metodo ir ypač jutiklio (kolektoriaus) tipo. Matavimus patartina atlikti naudojant sferinį (4 π) jutiklį (reaguojantį į tiesioginę ir atspindėtą šviesą, krintančią visais kampais virš ir žemiau matavimo plokštumos) arba 2 π jutiklį (reaguojantį į šviesą, krintančią visais kampais virš matavimo plokštumos).

— Aparatūra dumblių biomasei matuoti. Įprasčiausias dumblių biomasės pakaitinis parametras – ląstelių skaičius – gali būti nustatomas elektroniniu dalelių skaitikliu, mikroskopu su skaičiavimo kamera arba tėkmės citometru. Kiti pakaitiniai parametrai vietoj biomasės gali būti matuojami tėkmės citometru, fluorimetru, spektrofotometru arba kolorimetru. Pravartu nustatyti perskaičiavimo koeficientą, pagal kurį iš ląstelių skaičiaus nustatoma sausosios medžiagos masė. Siekiant atlikti naudingus matavimus spektrofotometru esant mažoms biomasės koncentracijoms, gali reikėti naudoti kiuvetes, kurių šviesos kelio ilgis būtų bent 4 cm.

Bandomieji organizmai

17. Bandymui galima naudoti kelių rūšių nepritvirtintus mikrodumblius ir melsvabakteres. Pagal nustatytą šio bandymo metodo procedūrą tinka naudoti 2 priedėlyje išvardytas patvirtintas padermes.

18. Jeigu naudojami kitų rūšių dumbliai, bandymo ataskaitoje turėtų būti nurodyta jų padermė ir arba (kilmė). Įsitikinkite, kad bandymui pasirinktų dumblių eksponentinį augimą pagrindinėmis bandymo sąlygomis bus galima užtikrinti per visą bandymo laikotarpį.

Auginimo terpė

19. Rekomenduojama rinktis vieną iš dviejų auginimo terpių – EBPO siūlomą terpę arba JAV aplinkos apsaugos agentūros AAP (angl. *algal assay procedure*) terpę; šių terpių sudėtis parodyta 3 priedėlyje. Įsidėmėtina, kad skiriasi abiejų terpių pradinė pH vertė ir buferinė talpa (pH didėjimui reguliuoti). Todėl bandymų rezultatai gali skirtis dėl naudojamos terpės, ypač atliekant jonizuojamų cheminių medžiagų bandymus.

▼M6

20. Auginimo terpes tam tikrais atvejais gali reikėti modifikuoti, pvz., atliekant metalų ir kompleksonų (chelantų) bandymus arba bandymus esant skirtingoms pH vertėms. Modifikuotos terpės naudojimas turėtų būti išsamiai aprašytas ir pagrįstas (3), (4).

Pradinė biomasės koncentracija

21. Visų bandomųjų kultūrų biomasės pradinis kiekis turi būti vienodas ir pakankamai mažas, kad būtų įmanomas eksponentinis augimas per visą inkubacinį periodą nerizikuojant, kad pritrūks mitybinių medžiagų. Pradinis biomasės kiekis (sausosios medžiagos masė) neturėtų viršyti 0,5 mg/l. Rekomenduojama pradinė ląstelių koncentracija:

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

Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos

22. Tikėtiną poveikį sukeliančių cheminės medžiagos koncentracijų intervalą galima nustatyti remiantis intervalo nustatymo bandymų rezultatais. Atliekant galutinį nustatomąjį bandymą reikėtų pasirinkti bent penkias koncentracijos vertes, išdėstytas geometrine progresija, kurios daugiklis neviršytų 3,2. Jeigu bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ir atsako kreivė yra gulsčia, gali būti pagrįsta rinktis didesnį daugiklį. Patartina, kad pasirinktų koncentracijos verčių eilutė apimtų intervalą, kuriam esant dumblių augimo greitis slopinamas 5–75 %.

Kartotiniai ir kontroliniai bandiniai

23. Bandymo plane turėtų būti numatyta paruošti po tris kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotinius bandinius. Jeigu nereikia nustatyti NOEC, bandymo planą galima keisti – padidinti koncentracijų skaičių ir sumažinti kiekvienos koncentracijos kartotinių bandinių skaičių. Kontrolinių kartotinių bandinių turi būti ne mažiau kaip trys. Geriausia, kad jų būtų dukart daugiau negu kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotinių bandinių.

24. Galima paruošti atskirą bandymo tirpalų rinkinį bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų analiziniams nustatymams (žr. 36 ir 38 skirsnius).

25. Kai bandomajai cheminei medžiagai soliubilizuoti naudojamas tirpiklis, į bandymo planą būtina įtraukti papildomus kontrolinius bandinius su tuo tirpikliu, kurio koncentracija būtų tokia pati, kaip ir bandomųjų kultūrų induose.

Sėjamos kultūros paruošimas

26. Siekiant pripratinti bandymui naudojamus dumblius prie bandymo sąlygų ir užtikrinti, kad dumbliai į bandymo tirpalus būtų sėjami per jų eksponentinio augimo tarpsnį, sėjama kultūra bandymo terpėje paruošiama iki bandymo pradžios likus 2–4 dienoms. Dumblių biomasė turėtų būti tvarkoma taip, kad sėjamos kultūros augimas iki bandymo pradžios būtų iš esmės eksponentinis. Sėjama kultūra turėtų būti inkubuojama tokiomis pačiomis sąlygomis,

▼M6

kaip ir bandomosios kultūros. Sėjamos kultūros biomasės didėjimą reikėtų matuoti, siekiant įsitikinti, kad jos augimas atitinka normalų tai bandomajai padermei būdingą intervalą kultūros auginimo sąlygomis. Dumblių kultūrų auginimo procedūros pavyzdys pateiktas 4 priedėlyje. Siekiant išvengti vienalaikio ląstelių dalijimosi per bandymą, gali reikėti palaukti, kol sėjamos kultūros organizmai pasidaugins antrą kartą.

Bandymo tirpalų ruošimas

27. Auginimo terpės ir pradinės bandymui naudojamų dumblių biomasės koncentracijos turi būti vienodos visuose bandymo tirpaluose. Pasirinktų koncentracijų bandymo tirpalai paprastai ruošiami sumaišant bandomosios cheminės medžiagos pradinį tirpalą su auginimo terpe ir sėjama kultūra. Pradiniai tirpalai paprastai ruošiami ištirpinant cheminę medžiagą bandymo terpėje.

28. Galima naudoti tirpiklius, pvz., acetoną, tret-butilo alkoholį ir dimetilformamidą, kaip nešiklius vandenyje mažai tirpioms cheminėms medžiagoms įmaišyti į bandymo terpę (2), (3). Tirpiklio koncentracija neturėtų viršyti 100 µl/l. Tos pačios koncentracijos tirpiklio turėtų būti dedama į visų bandymo serijos kultūrų (įskaitant kontrolines kultūras) indus.

Inkubacija

29. Bandymo indai užkemšami pralaidžiais orui kamščiais, sukratomi ir dedami į kultūros auginimo aparatą. Dumbliai per visą bandymą turi būti suspenduoti ir juos turi lengvai pasiekti anglies dioksidas, todėl indus reikėtų dažnai sukratyti arba pamaišyti. Bandomųjų kultūrų laikymo temperatūra turėtų būti 21–24 °C, reguliuojama ± 2 °C tikslumu. Jeigu naudojami 2 priedėlyje nenurodytų, pvz., tropinių rūšių organizmai, galbūt tiktų juos laikyti aukštesnėje temperatūroje, su sąlyga, kad nebūtų nukrypta nuo bandymo tinkamumo kriterijų. Bandymo kolbas patartina atsitiktine tvarka sudėti į inkubatorių ir kasdien sukeisti jas vietomis.

30. Kontrolinių bandinių terpės pH per bandymą neturėtų padidėti daugiau kaip 1,5 vieneto. Atliekant bandymą su metalais ir cheminėmis medžiagomis, kurios iš dalies jonizuojasi, kai pH lygis yra artimas bandymo pH, gali reikėti riboti pH kitimą, kad būtų gauti atkuriami ir tikslūs bandymo rezultatai. Techniškai įmanoma pasiekti, kad pH vertė pakistų mažiau kaip 0,5 vieneto, užtikrinant tinkamą CO_2 masės patekimo iš aplinkos oro į bandomąjį tirpalą spartą, pvz., dažniau pakratant indą. Taip pat galima mažinti CO_2 suvartojimą, sumažinant pradinės biomasės kiekį ar bandymo trukmę.

31. Paviršius, ant kurio inkubuojamos kultūros, turėtų būti nuolat ir vienodai apšviestas liuminescencinėmis, pvz., šaltai baltos arba dienos šviesos lempomis. Dumblių ir melsvabakterių padermėms šviesos reikia nevienodai. Šviesos stipris turėtų būti pritaikytas naudojamiems bandomiesiems organizmams. Rekomenduojamų rūšių žaliadumbliams tinkamas šviesos stipris bandymo tirpalų lygiu yra 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$, matuojant tinkamu jutikliu esant fotosintezei optimaliam 400–700 nm bangų ilgio intervalui. Kai kurios rūšys, ypač *Anabaena flos-aquae*, gerai auga esant ne tokiai stipriai šviesai; labai intensyvi šviesa gali joms pakenkti. Vidutinis šviesos stipris tokioms rūšims turėtų būti nuo 40 iki 60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (jeigu apšvietimo matavimo prietaisai kalibruoti liuksais, 4 440–8 880 lx apšvietimas šaltai balta šviesa maždaug atitinka rekomenduojamą 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ šviesos stiprį). Šviesos stipris neturi kisti daugiau kaip ± 15 % vidutinio šviesos, kuria apšviečiama inkubavimo vieta, stiprio.

▼M6

Bandymo trukmė

32. Įprasta bandymo trukmė – 72 val., tačiau visus 11 skirsnyje nurodytus tinkamumo kriterijus atitinkantis bandymas gali trukti ir trumpesnį arba ilgesnį laiko tarpą.

Matavimai ir analiziniai nustatymai

33. Dumblių biomasė kiekvienoje kolboje matuojama bent kartą per dieną per visą bandymo laikotarpį. Jeigu matavimai atliekami naudojant mažus biomasės kiekius, iš bandymo tirpalo ištrauktus pipete, po to biomasės papildyti nereikia.

34. Biomasės matavimai atliekami rankiniu būdu suskaičiuojant ląsteles per mikroskopą arba naudojant elektroninį dalelių skaitiklį (nustatant ląstelių skaičių ir (arba) biologinį tūrį). Galima taikyti ir kitus metodus, pvz., srovinę citometriją, *in vitro* arba *in vivo* chlorofilo fluorescenciją (5), (6) arba optinio tankio matavimą, jei galima įrodyti pakankamą koreliaciją su biomase, atitinkančia bandymui naudojamos biomasės intervalą.

35. Tirpalų pH turi būti išmatuotas pradedant ir baigiant bandymą.

36. Jeigu yra analizės procedūra, tinkama bandomajai cheminei medžiagai pasirinktame koncentracijų intervale nustatyti, reikėtų išanalizuoti bandymo tirpalus, siekiant patikrinti pradines jų koncentracijas ir per visą bandymą palaikyti poveikiui reikalingas koncentracijas.

37. Atliekant bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos analizę bandymo pradžioje ir pabaigoje, gali pakakti išanalizuoti tik vieną mažą ir vieną didelę bandymui pasirinktas koncentracijas ir numatomą EC_{50} vertę apytikriai atitinkančią koncentraciją, jeigu tikėtina, kad tos medžiagos efektyviosios koncentracijos per bandymą pakis mažiau kaip 20 % vardinių verčių. Jeigu manoma, jog koncentracijos pasikeis tiek, kad nebepateks į 80–120 % vardinės koncentracijos intervalą, patartina pradedant ir baigiant bandymą atlikti visų bandymui pasirinktų koncentracijų analizę. Kai bandomosios cheminės medžiagos yra lakios, nepatvarios arba lengvai įsigeriančios (adsorbuojamos), jų veikimo laikotarpiu rekomenduojama kas 24 val. imti papildomus pavyzdžius analizei, kad būtų galima tiksliau nustatyti, koks bandomosios medžiagos kiekis prarastas. Gali reikėti paruošti papildomų kartotinių bandinių su šiomis cheminėmis medžiagomis. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas visais atvejais reikia nustatyti tik viename kartotiniame bandymui pasirinktos koncentracijos inde (arba analizuojant sujungtą kartotinio bandinio indų turinį).

38. Bandymo terpės, specialiai ruošiamos efektyviosioms koncentracijoms per bandymą analizuoti, turėtų būti apdorojamos taip pat, kaip ir bandymui naudojamos terpės, t. y. į jas pasėjami dumbliai ir sudaromos tokios pačios inkubacijos sąlygos. Jeigu reikia išanalizuoti ištirpusios bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją, gali reikėti dumblius atskirti nuo terpės. Patartina juos atskirti centrifuguojant, nustačius mažą perkrovos jėgą – tik tiek, kiek reikia dumbliams nusodinti.

39. Jeigu yra įrodymų, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją per visą bandymą pavyko išlaikyti nepakitusią daugiau kaip ± 20 % vardinės arba išmatuotos pradinės koncentracijos vertės, rezultatus galima analizuoti remiantis vardinėmis arba išmatuotomis pradinėmis vertėmis. Jeigu nuo vardinės arba išmatuotos pradinės koncentracijos nukrypta daugiau kaip ± 20 %, rezultatus reikėtų analizuoti remiantis efektyviųjų koncentracijų geometriniu vidurkiu arba modeliais, kuriais parodytas bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos mažėjimas (3), (7).

▼M6

40. Dumblių augimo slopinimo bandymo sistema yra dinamiškesnė nei daugelio kitų trumpalaikių toksiškumo vandens organizmams bandymų, todėl gali būti sunku nustatyti faktines efektyviąsias koncentracijas, ypač lengvai įsigeriančių (adsorbuojamų) cheminių medžiagų, bandomų mažomis koncentracijomis. Tokiais atvejais bandomosios cheminės medžiagos dingimas iš tirpalo, jai įsigeriant į augančios dumblių biomasės paviršių, nereiškia, kad jos nebėra bandymo sistemoje. Analizuojant bandymo rezultatą, reikėtų patikrinti, ar per bandymą sumažėjus bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai, kartu sumažėjo dumblių augimo slopinimas. Jeigu taip, galima apsvarstyti, kaip reikėtų parodyti bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos mažėjimą taikant tinkamą modelį (7), o jeigu ne, rezultatų analizę galbūt reikėtų pagrįsti pradinėmis (vardinėmis arba išmatuotomis) koncentracijos vertėmis.

Kiti stebėjimai

41. Reikėtų per mikroskopą apžiūrėti sėjamą kultūrą, siekiant įsitikinti, kad ji yra normalios ir sveikos išvaizdos, ir pastebėti bet kokius neįprastus dumblių išvaizdos pakitimus (galėjusius atsirasti veikiant bandomajai cheminei medžiagai) bandymo pabaigoje.

Ribų nustatymo bandymas

42. Tam tikromis aplinkybėmis, pvz., jeigu išankstinis bandymas parodo, kad bandomoji cheminė medžiaga neturi toksinio poveikio, kol jos koncentracija nesiekia 100 mg/l arba tirpumo bandymo terpėje ribos (mažesnės iš šių verčių), galima atlikti ribų nustatymo bandymą, palyginant kontrolinės grupės ir vienos bandomosios (100 mg/l arba tirpumo ribinei vertei lygios koncentracijos) grupės atsaką į poveikį. Taip gautus rezultatus labai patartina patvirtinti atliekant efektyviosios koncentracijos analizę. Ribų nustatymo bandymas turi atitikti visas pirmiau aprašytas bandymo sąlygas ir tinkamumo kriterijus, tačiau kartotiniai bandiniai su bandomąja medžiaga turėtų būti ne mažiau kaip šeši. Kontrolinės ir bandomosios grupių atsako kintamuosius galima analizuoti taikant statistinį kriterijų vidurkiams palyginti, pvz., Stjudento *t* kriterijų. Jeigu abiejų grupių dispersijos yra nelygios, analizę reikėtų atlikti taikant nelygioms dispersijoms pritaikytą *t* kriterijų.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Augimo kreivių braižymas

43. Bandymo induose esančią biomasę galima išreikšti matavimui naudojamų pakaitinių parametrų (pvz., ląstelių skaičiaus, fluorescencijos) vienetais.

44. Rengiant augimo kreivių grafikus, į lenteles surašomos įvertintos bandomųjų ir kontrolinių kultūrų biomasės koncentracijos vertės, bandomosios medžiagos koncentracijos vertės ir matavimo laikas, skaičiuojamas bent valandos tikslumu. Šiame pirmajame etape galima naudoti tiek logaritminių, tiek linijinių parametrų skales, tačiau logaritmines skales naudoti būtina ir pagal jas paprastai geriau pavaizduojami organizmų augimo pokyčiai per bandymo laikotarpį. Įsidėmėtina, kad eksponentinis augimas logaritminėse koordinatėse vaizduojamas tiese, kurios nuolydis (krypties koeficientas) rodo savitąjį augimo greitį.

45. Naudodami grafikus patikrinkite, ar kontrolinės kultūros per visą bandymą eksponentiškai augo numatytu greičiu. Kritiškai įvertinkite visus duomenų taškus ir apžiūrėkite grafikus, patikrinkite neapdorotus duomenis ir procedūras, ar nėra klaidų. Ypač atidžiai tikrinkite kiekvieną duomenų tašką, kuris atrodo pasislinkęs dėl sistemingosios paklaidos. Jeigu akivaizdžiai yra ir (arba) labai tikėtina, kad yra procedūros klaidų, atitinkamas duomenų taškas pažymimas kaip riktas ir neįtraukiamas vėliau atliekant statistinę analizę (jeigu dumblių koncentracijos vertė viename iš dviejų ar trijų kartotinių

▼M6

indų yra lygi nuliui, tai gali reikšti, kad tame inde nebuvo tinkamai pasėti dumbliai arba indas buvo nepakankamai išvalytas). Bandymo ataskaitoje aiškiai nurodykite, dėl kokių priežasčių tam tikri duomenų taškai atmesti kaip riktai; tik (retai pasitaikančios) procedūros klaidos, o ne preciziškumo trūkumas, yra pateisinama priežastis. Statistinės riktų nustatymo procedūros tik iš dalies padeda išspręsti šią problemą ir negali atstoti ekspertų vertinimo. Riktus (atitinkamai juos pažymėjus) geriausia palikti tarp kitų duomenų taškų, vėliau kokia nors forma pateikiamų kaip grafikų arba lentelių duomenys.

Atsako kintamieji

46. Bandymo paskirtis – nustatyti bandomosios cheminės medžiagos poveikį dumblių augimui. Pagal šį bandymo metodą apibūdinami du atsako kintamieji, nes įvairiose jurisdikcijose skiriasi prioritetai ir norminiai reikalavimai. Siekiant, kad bandymo rezultatai būtų priimtini visose jurisdikcijose, poveikį reikėtų vertinti taikant abu toliau aprašytus atsako kintamuosius *a* ir *b*:

a) vidutinis savitasis augimo greitis. Šis atsako kintamasis apskaičiuojamas pagal logaritminį biomasės didėjimą (per parą) bandymo laikotarpiu;

b) išeiga – atsako kintamasis, reiškiantis biomasės skirtumą, atsiradusį nuo bandymo pradžios iki pabaigos.

47. Pažymėtina, kad taikant šiuos du atsako kintamuosius apskaičiuotos toksiškumo vertės nėra lygintinos tarpusavyje ir jų skirtumą būtina pripažinti naudojant bandymo rezultatus. Turint omenyje atitinkamų metodų matematinį pagrindą, jeigu laikomasi bandymo pagal šį metodą sąlygų, pagal vidutinį savitąjį augimo greitį nustatytos EC_x vertės (E_rC_x) paprastai yra didesnės negu išeiga pagrįsti rezultatai (E_yC_x). To nereikėtų suprasti kaip abiejų atsako kintamųjų jautrio skirtumo – tiesiog vertės skiriasi matematiškai. Vidutinio savitojo augimo greičio sąvoka apibrėžta remiantis bendrąja eksponentinio dumblių augimo nevaržomose kultūrose schema, kurią taikant toksiškumas vertinamas pagal poveikį augimo greičiui, nepriklausomai nuo kontrolinės kultūros absoliučiojo savitojo augimo greičio, koncentracijos ir atsako kreivės krypties koeficiento ar bandymo trukmės. Kitu atsako kintamuoju – išeiga – pagrįsti rezultatai, priešingai, yra priklausomi nuo visų šių kitų kintamųjų. E_yC_x vertė priklauso nuo kiekvienam bandymui naudojamos dumblių rūšies savitojo augimo greičio ir nuo didžiausio savitojo augimo greičio, kuris įvairių rūšių ir net atskirų dumblių padermių gali būti skirtingas. Šio atsako kintamojo nereikėtų naudoti lyginant kelių dumblių rūšių ar net atskirų padermių jautrį nuodingosioms medžiagoms. Nors toksiškumui vertinti moksliniu požiūriu labiau tinka vidutinis savitasis augimo greitis, pagal šį bandymo metodą numatyta naudoti ir išeiga pagrįstus toksiškumo įverčius, kurie yra privalomi pagal kai kuriose valstybėse galiojančių norminių teisės aktų reikalavimus.

Vidutinis augimo greitis

48. Vidutinis savitasis augimo greitis tam tikru laikotarpiu apskaičiuojamas kaip kiekvieno atskiro kontrolinių ir bandomųjų grupių indo biomasės logaritminis padidėjimas pagal lygtį [1]:

▼M6

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

kurioje:

μ_{i-j} – yra vidutinis savitasis augimo greitis per laiko tarpą *i–j*;

X_i – biomasė *i* laiku;

X_j – biomasė *j* laiku.

Apskaičiuojama kiekvienos bandomosios ir kontrolinės grupės augimo greičio vidutinė vertė ir dispersijos įverčiai.

49. Vidutinis savitasis augimo greitis per visą bandymo trukmę (paprastai 0–3 paras) apskaičiuojamas kaip pradinę vertę naudojant pasėtos biomasės kiekio vardinę vertę, o ne išmatuotą pradinę vertę, nes toks skaičiavimas paprastai yra tikslesnis. Jeigu mažą pasėlio biomasės kiekį galima pakankamai tiksliai nustatyti biomasei matuoti skirta įranga (pvz., tėkmės citometru), galima naudoti išmatuotą pradinę biomasės koncentraciją. Taip pat įvertinkite augimo greitį atskirais laiko tarpais, apskaičiuojamą kaip kiekvienos bandymo dienos (0–1, 1–2 ir 2–3 parų) savitasis augimo greitis, ir ištirkite, ar kontrolinių bandinių augimo greitis tebėra tolygus (žr. tinkamumo kriterijus 11 skirsnyje). Jeigu savitasis augimo greitis pirmąją parą yra kur kas mažesnis negu bendras vidutinis savitasis augimo greitis, tai gali reikšti latentinį periodą. Nors kontrolinių kultūrų latentinį periodą galima sutrumpinti arba visiškai panaikinti tinkamai pasėjant iš anksto paruoštą kultūrą, jeigu latentinį periodą patiria bandomosios medžiagos veikiamos kultūros, tai gali reikšti, kad jos atsigauna po pradinio toksinio streso arba iš pradžių patirtas bandomosios cheminės medžiagos poveikis vėliau susilpnėja netekus dalies jos kiekio (be kita ko, dėl gerties į dumblių biomasės paviršių). Taigi, augimo greitis atskirais laiko tarpais gali būti nustatomas siekiant įvertinti bandomosios cheminės medžiagos poveikį jos veikimo laikotarpiu. Jeigu tokie nustatyti augimo greičiai atskirais laiko tarpais reikšmingai skiriasi nuo vidutinio augimo greičio, tai rodo nuokrypį nuo tolygaus eksponentinio augimo ir reikia nuodugniai ištirti augimo kreives.

50. Apskaičiuokite augimo greičio procentinį slopinimą kiekviename kartotiniame bandinyje su bandomąja medžiaga pagal lygtį [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \qquad [2],$$

kurioje:

$\%I_r$ – vidutinio savitojo augimo greičio sumažėjimas procentais;

μ_C – kontrolinės grupės vidutinio savitojo augimo greičio (μ) vidutinė vertė;

μ_T – vidutinis savitasis augimo greitis kartotiniame bandinyje su bandomąja medžiaga.

51. Kai ruošiant bandymo tirpalus naudojami tirpikliai, apskaičiuojant augimo slopinimo procentinį dydį reikėtų naudoti tirpiklio kontrolinius bandinius, o ne kontrolinius bandinius be tirpiklių.

Išeiga

52. Išeiga apskaičiuojama kaip nuo bandymo pradžios iki pabaigos atsiradęs biomasės skirtumas kiekviename atskirame kontrolinių ir bandomųjų grupių inde. Apskaičiuokite kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos ir kontrolinės grupės išeigos vidutinę vertę kartu su dispersijos įverčiais. Kiekvieno bandomosios grupės kartotinio bandinio išeigos sumažėjimą procentais ($\%\ I_y$) galima apskaičiuoti pagal formulę

▼M6

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \qquad [3]$$

Šioje formulėje:

% I_y –išeigos sumažėjimas procentais;

Y_C – vidutinė kontrolinės grupės išeigos vertė;

Y_T – bandomosios grupės kartotinio bandinio išeigos vertė.

Koncentracijos ir atsako kreivės braižymas

53. Nubraižykite augimo slopinimo procentinio lygio ir bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos logaritmo grafiką ir nuodugniai jį išnagrinėkite, nekreipdami dėmesio į tuos duomenų taškus, kurie per pirmąjį etapą buvo pažymėti kaip riktai. Iš akies arba kompiuterinio interpoliavimo būdu nubrėžkite per duomenų taškus tolydžią liniją, kad gautumėte pradinį koncentracijos ir atsako santykio vaizdą. Tada taikykite išsamesnį, geriausia kompiuterinį statistinį, metodą. Priklausomai nuo numatomos duomenų paskirties, kokybės (preciziškumo) bei kiekio ir turimų duomenų analizės priemonių, galima (kartais labai pagrįstai) nuspręsti baigti duomenų analizę šiame etape ir tiesiog iš akies nubrėžtoje kreivėje rasti pagrindinius EC_{50}, EC_{10} ir (arba) EC_{20} dydžius (taip pat žr. tolesnį skirsnį, kuriame rašoma apie skatinamąjį poveikį). Statistinio metodo galima netaikyti dėl tokių pagrįstų priežasčių:

— apdorojant tuos duomenis kompiuterizuotais metodais gauti rezultatai nebūtų patikimesni negu ekspertų vertinimo rezultatai. Tokiais atvejais naudojant kai kurias kompiuterines programas gali net nepavykti gauti patikimo sprendinio (iteracijos gali nekonverguoti ir t. t.);

— turimomis kompiuterinėmis programomis neįmanoma tinkamai apdoroti atsako į augimo skatinimą duomenų (žr. toliau).

Statistinės procedūros

54. Tikslas yra kiekybiškai nustatyti koncentracijos ir atsako santykį atliekant regresinę analizę. Galima taikyti svertinę tiesinę regresiją atlikus atsako duomenų tiesinamąjį transformavimą, pvz., į probito, logito arba Weibull vienetus (8), tačiau geriau atlikti procedūras netiesinės regresijos metodais, per kurias geriau apdorojami neišvengiami duomenų neatitikimai ir nukrypimai nuo glodžiųjų skirstinių. Artėjant prie nulinio arba visiško augimo slopinimo, tokie neatitikimai dėl transformavimo gali padidėti ir trukdyti analizei (8). Pažymėtina, kad standartiniai analizės metodai naudojant probito, logito arba Weibull transformuotus dydžius yra skirti dvireikšmiams (pvz., gaištamumo arba išgyvenimo) kintamiesiems, todėl norint naudoti juos augimo ar biomasės duomenims, būtina juos atitinkamai pritaikyti. Konkrečios EC_x verčių nustatymo iš tolydžiųjų duomenų procedūros aprašytos literatūroje (9), (10), (11). Netiesinės regresijos analizės taikymas išsamiau aprašytas 5 priedėlyje.

55. Analizuodami kiekvieną atsako kintamąjį, remdamiesi koncentracijos ir atsako santykiu, apskaičiuokite EC_x verčių taškinius įverčius. Kai įmanoma, reikėtų nustatyti kiekvieno įverčio 95 % pasikliovimo ribas. Reikėtų pagal grafiką arba statistiškai įvertinti atsako duomenų atitiktį regresijos modeliui. Regresinė analizė turėtų būti atliekama naudojant atskirų kartotinių bandinių

▼M6

atsakus, o ne visos bandomosios grupės vidutines vertes. Tačiau jeigu netiesinę kreivę pritaikyti yra sunku arba neįmanoma dėl per didelės duomenų sklaidos, šią problemą galima apeiti atliekant nustatytų grupės vidutinių verčių regresiją – taip praktiškai sumažinama spėjamų riktų įtaka. Pasirinkus šį būdą, bandymo ataskaitoje reikėtų nurodyti, kad nukrypta nuo įprastos procedūros, nes pritaikant kreivę atskiriems kartotiniams bandiniams nebuvo gauta tinkamo rezultato.

56. Be to, jeigu esami regresijos modeliai ir (arba) metodai netinka turimiems duomenims, EC_{50} įverčius ir pasikliovimo ribas taip pat galima gauti atliekant tiesinę interpoliaciją su saviranka (angl. *bootstrapping*) (13).

57. Vertinant bandomosios cheminės medžiagos poveikio augimo greičiui LOEC, taigi ir NOEC, būtina palyginti bandomosios grupės vidutines vertes taikant dispersinės analizės (ANOVA) metodus. Taip gautą kiekvienos koncentracijos grupės vidurkį reikia palyginti su kontrolinės grupės vidurkiu taikant tinkamą kartotinių palyginimų arba trendo kriterijaus metodą. Gali būti naudinga taikyti Dunnett arba Williams kriterijų (12), (14), (15), (16), (17). Būtina įvertinti, ar tinka ANOVA dispersijos vienalytiškumo prielaida. Šį vertinimą galima atlikti naudojant grafiką arba taikant formalųjį kriterijų (17). Tinka taikyti Levene arba Bartlett kriterijus. Jeigu netinka dispersijų vienalytiškumo prielaida, kartais galima tai pataisyti logaritmine duomenų transformacija. Jei dispersija yra itin nevienalytė ir to neįmanoma pataisyti transformuojant duomenis, reikėtų apsvarstyti galimybę atlikti analizę kitais metodais, pvz., taikant laipsninio mažinimo *Jonkheere trend* kriterijus. Papildomų rekomendacijų, kaip nustatyti NOEC, pateikta literatūroje (11).

58. Atsižvelgiant į naujus mokslo pasiekimus, rekomenduojama atsisakyti NOEC sąvokos ir vietoj jos naudoti regresija pagrįstus EC_x taškinius įverčius. Pagal šį dumblių bandymo metodą tinkama x vertė nenustatyta, tačiau atrodo, kad tinka į 10–20 % intervalą patenkanti vertė (kuri priklauso nuo pasirinkto atsako kintamojo). Ataskaitoje geriausia nurodyti abi (EC_{10} ir EC_{20}) vertes.

Augimo skatinimas

59. Esant nedidelėms bandomųjų medžiagų koncentracijoms, kartais pastebima, kad jos skatina bandomųjų organizmų augimą (tai vadinama neigiamu slopinimu). Šio reiškinio priežastis gali būti hormezė („toksinis skatinimas“) arba tai, kad kartu su bandomąja medžiaga į naudojamą minimalią terpę pridėta augimo skatinimo veiksnių. Pažymėtina, kad neorganinių mitybinių medžiagų patekimas į terpę neturėtų turėti jokio tiesioginio poveikio organizmams, nes bandymo terpėje per visą bandymo laiką turėtų būti palaikomas mitybinių medžiagų perteklius. Į mažų dozių sukeltą skatinamąjį poveikį paprastai galima nekreipti dėmesio apskaičiuojant EC_{50}, jeigu jis nėra labai didelis. Tačiau jeigu toks poveikis yra itin didelis arba reikia apskaičiuoti EC_x vertę, kai *x* yra mažas, gali reikėti specialių procedūrų. Kai įmanoma, organizmų atsaką į skatinamąjį poveikį reikėtų įtraukti atliekant duomenų analizę, o jeigu naudojant turimą kreivių pritaikymo programinę įrangą į nedidelį skatinamąjį poveikį atsižvelgti neįmanoma, galima taikyti tiesinę interpoliaciją su saviranka. Jeigu skatinamasis poveikis itin didelis, galbūt tiktų taikyti hormezės modelį (18).

Netoksinis augimo slopinimas

60. Kai bandomosios medžiagos sugeria šviesą, organizmų augimas gali sulėtėti dėl tamsinimo sumažėjus gaunamam šviesos kiekiui. Tokių fizinių reiškinių poveikį reikėtų skirti nuo toksinio poveikio, atitinkamai pakeičiant bandymo sąlygas, ir ataskaitoje jį reikėtų aprašyti atskirai. Rekomendacijų pateikta literatūroje (2), (3).

BANDYMO ATASKAITA

61. Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta toliau nurodyta informacija.

▼M6

Bandomoji cheminė medžiaga

— Medžiagos fizikinė prigimtis ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės, įskaitant tirpumo vandenyje ribą.

— Cheminės medžiagos atpažinties duomenys (pvz., CAS numeris), įskaitant grynumą (priemaišas).

Bandomosios rūšys

— Pasirinkta padermė, tiekėjas arba šaltinis ir kultūros auginimo sąlygos.

Bandymo sąlygos

— Bandymo pradžios data ir trukmė.

— Bandymo plano aprašymas: naudojami bandymo indai, kultūrų tūriai, biomasės tankis bandymo pradžioje.

— Terpės sudėtis.

— Bandymui pasirinktos koncentracijos ir kartotiniai bandiniai (pvz., kartotinių bandinių skaičius, bandymui pasirinktų koncentracijų skaičius ir taikyta geometrinė progresija).

— Bandymo tirpalų ruošimo aprašymas, įskaitant tirpiklių naudojimą ir t. t.

— Kultūros auginimo aparatūra.

— Šviesos stipris ir apšvietimo kokybė (šaltinis, vienalytiškumas).

— Temperatūra.

— Bandomosios koncentracijos – vardinės bandymui pasirinktos koncentracijos ir bet kokie analizių, atliktų nustatant bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją bandymo induose, rezultatai. Reikėtų nurodyti bandomosios medžiagos regeneravimo našumą pagal pasirinktą metodą ir kiekybinio nustatymo ribą bandymo matricoje.

— Bet kokie nukrypimai nuo šio bandymo metodo.

— Biomasės nustatymo metodas ir matuojamo parametro bei sausosios medžiagos masės sąsajos įrodymas.

Rezultatai

— Visų bandomosios grupės indų pH vertės bandymo pradžioje ir pabaigoje.

— Kiekvienos kolbos biomasė kiekviename matavimo taške ir biomasės matavimo metodas.

— Augimo kreivės (biomasės kaip laiko funkcijos grafikas).

— Apskaičiuoti kiekvieno bandomosios grupės kartotinio bandinio atsako kintamieji, jų vidutinės vertės ir kartotinių bandinių variacijos koeficientas.

— Koncentracijos ir poveikio santykio grafikas.

▼M6

— Toksiškumo įverčiai pagal atsako kintamuosius, pvz., EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, ir atitinkami pasikliautinieji intervalai. LOEC ir NOEC vertės (jeigu apskaičiuotos) ir statistiniai metodai, pagal kuriuos jos nustatytos.

— Jei taikytas ANOVA metodas – mažiausio aptinkamo poveikio dydis (pvz., mažiausias reikšminis skirtumas).

— Bet koks bandomosiose grupėse nustatytas augimo skatinimas.

— Bet kokie kiti pastebėti reiškiniai, pvz., dumblių sandaros (morfologiniai) pokyčiai.

— Rezultatų aptarimas, be kita ko, paaiškinant bet kokių nukrypimų nuo šio bandymo metodo įtaką bandymo rezultatams.

NUORODOS

(1) International Organisation for Standardisation (1993). ISO 8692 Water quality – Algal growth inhibition test.

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

(3) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(4) International Organisation for Standardisation (1998). ISO 5667-16 Water quality – Sampling – Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.

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

(6) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22: 919-925

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

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

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

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

(11) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

▼M6

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

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

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

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

(16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 519-531.

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

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

▼M6

1 priedėlis

Sąvokų apibrėžtys

Toliau pateiktos taikant šį bandymo metodą vartojamų sąvokų apibrėžtys.

Biomasė – gyvų organizmų populiacijos masė, išreiškiama tam tikrame tūrio vienete esančios sausosios medžiagos mase, pvz., kiek miligramų dumblių yra viename bandymo tirpalo litre (mg/l). Biomasės sąvoka paprastai suprantama kaip masė, tačiau per šį bandymą šis terminas vartojamas masei tūrio vienete apibūdinti. Be to, per šį bandymą vietoj biomasės paprastai matuojami pakaitiniai parametrai, kaip antai ląstelių skaičius, fluorescencija ir t. t., taigi biomasės sąvoka apima ir šiuos pakaitinius matavimo vienetus.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Variacijos koeficientas – nedimensinis tam tikro parametro kintamumo matas, apibrėžiamas kaip standartinio nuokrypio ir vidurkio santykis. Jį galima išreikšti ir procentine verte. Kartotinių kontrolinių kultūrų vidutinio savitojo augimo greičio vidutinis variacijos koeficientas turėtų būti apskaičiuojamas taip:

1. pagal kasdienio (atskirų laiko tarpų) augimo greičius apskaičiuojamas atitinkamo kartotinio bandinio vidutinio savitojo augimo greičio variacijos koeficientas (procentais);

2. apskaičiuojama visų taip, kaip nurodyta pirmojoje įtraukoje, apskaičiuotų verčių vidutinė vertė, pagal kurią gaunamas kartotinių kontrolinių kultūrų kasdienio (atskirų laiko tarpų) savitojo augimo greičio vidutinis variacijos koeficientas.

EC_x – bandymo terpėje ištirpusios bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant bandomojo organizmo augimas per nustatytą bandomosios medžiagos veikimo laikotarpį (kuris, jeigu skiriasi nuo visos arba įprastos bandymo trukmės, turi būti tiksliai nurodytas) sumažėja x % (pvz., 50 %). Pagal augimo greitį arba išeigą nustatytai EC vertei vienareikšmiškai žymėti vartojami simboliai E_rC (augimo greičio) ir E_yC (išeigos).

Auginimo terpė – visiškai paruošta sintetinė kultūrai auginti skirta terpė, kurioje per bandymą auginami bandomosios cheminės medžiagos veikiami dumbliai. Bandomoji cheminė medžiaga paprastai ištirpinama auginimo terpėje.

Augimo greitis (vidutinis savitasis augimo greitis) – logaritminis biomasės didėjimas bandomosios medžiagos veikimo laikotarpiu.

Mažiausia pastebėto poveikio koncentracija (LOEC) – mažiausia bandymui pasirinkta koncentracija, kuriai esant pastebimas statistiškai reikšmingas cheminės medžiagos slopinamasis poveikis bandomųjų organizmų augimui (kai $p < 0,05$), palyginti su kontroliniais bandiniais, per nustatytą tos medžiagos veikimo laikotarpį; tačiau visų LOEC viršijančių bandymo koncentracijos verčių kenksmingas poveikis turi būti lygus LOEC poveikiui arba didesnis. Kai šios dvi sąlygos netenkinamos, būtina išsamiai paaiškinti, kaip pasirinkta LOEC (taigi ir NOEC) vertė.

Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) – bandymui pasirinkta koncentracija, kuri yra tik truputį mažesnė negu LOEC koncentracija.

Atsako kintamasis – toksiškumui vertinti naudojamas kintamasis, gautas pagal bet kurį iš matuojamų parametrų, kuriais apibūdinama biomasė taikant skirtingus apskaičiavimo metodus. Pagal šį bandymo metodą atsako kintamieji yra augimo greitis ir išeiga, nustatyti matuojant pačią biomasę arba kurį nors iš nurodytų pakaitinių parametrų.

▼M6

Savitasis augimo greitis – atsako kintamasis, apibrėžiamas kaip stebimo parametro (pagal šį bandymo metodą – biomasės) natūraliųjų logaritmų skirtumo ir atitinkamo laikotarpio dalmuo.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

Išeiga – matuojamo kintamojo verčių bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pabaigoje ir pradžioje skirtumas, kuriuo išreiškiamas biomasės padidėjimas per bandymo laikotarpį.

▼M6

2 priedėlis

Bandymui tinkamos padermės

Žaliadumbliai

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

Desmodesmus subspicatus (anksčiau vadinti *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG.

Titnagdumbliai

Navicula pelliculosa, UTEX 664.

Melsvabakterės

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

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1.

Padermių šaltiniai

Rekomenduojamas dumblių padermes galima gauti kaip vienarūšes kultūras iš šių rinkinių (išvardyti abėcėlės tvarka):

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

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

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

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

▼M6

Rekomenduojamų naudoti rūšių išvaizda ir savybės

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Išvaizda	Lenktos, susuktos pavienės ląstelės	Ovalo formos, daugiausia pavienės ląstelės	Lazdelės	Ovalo formos ląstelių grandinės	Lazdelės
Dydis (ilgis ir plotis), μm	8–14 × 2–3	7–15 × 3–12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Ląstelės tūris (μm^3/ląstelė)	40–60 ([1])	60–80 ([1])	40–50 ([1])	30–40 ([1])	2,5 ([2])
Sausoji ląstelių masė (mg/ląstelė)	$2–3 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$1–2 \times 10^{-8}$	$2–3 \times 10^{-9}$
Augimo greitis ([3]) ($para^{-1}$)	1,5–1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0–2,4

([1]) Išmatuotas elektroniniu dalelių skaitikliu.
([2]) Apskaičiuotas pagal dydį.
([3]) Dažniausiai pastebimas augimo EBPO siūlomoje terpėje greitis esant maždaug 70 μE m^{-2} s^{-1} šviesos stipriui ir 21 °C temperatūrai.

Konkrečios rekomendacijos dėl bandymams rekomenduojamų rūšių kultūrų auginimo ir priežiūros

Pseudokirchneriella subcapitata ir Desmodesmus subspicatus

Šiuos žaliadumblius apskritai lengva prižiūrėti įvairiose auginimo terpėse. Informaciją apie tinkamas terpes teikia atitinkamų kultūrų rinkinių tiekėjai. Ląstelės paprastai yra pavienės, jų tankį lengva išmatuoti elektroniniu dalelių skaitikliu arba mikroskopu.

Anabaena flos-aquae

Pradinei kultūrai laikyti tinka įvairios auginimo terpės. Itin svarbu užtikrinti, kad nesibaigtų atnaujinamos atskiromis partijomis ruošiamos kultūros eksponentinio augimo tarpsnis, nes atgaivinti pasibaigus šiam tarpsniui būtų sunku.

Anabaena flos-aquae sudaro viena prie kitos prikibusių ląstelių grandinių sankaupas, kurių dydis gali kisti priklausomai nuo kultūros auginimo sąlygų. Šias sankaupas gali reikėti suardyti, kai biomasei nustatyti atliekami skaičiavimai mikroskopu arba elektroniniu dalelių skaitikliu.

Siekiant suardyti ląstelių grandines ir taip sumažinti jų skaičiaus kintamumą, dalinius ėminius galima apdoroti ultragarsu. Ilgiau, negu reikia grandinėms sutrumpinti, ultragarsu apdorojamos ląstelės gali žūti. Kiekvieno apdorojimo ultragarsu intensyvumas ir trukmė turi būti vienodi.

Siekiant kompensuoti kintamumą, suskaičiuokite pakankamai daug hemocitometro laukų (bent 400 ląstelių). Tai padės patikimiau nustatyti tankį mikroskopu.

Bendrą *Anabaena* ląstelių tūrį galima nustatyti elektroniniu dalelių skaitikliu, ląstelių grandines suardžius atsargiai apdorojant ultragarsu. Kad ląstelės nesuirtų, apdorojimo ultragarsu jėga turi būti reguliuojama.

Siekiant užtikrinti, kad į bandymo indus sėjama dumblių suspensija būtų gerai sumaišyta ir vienalytė, naudojamas sūkurinis maišytuvas arba panašus tinkamas būdas.

▼M6

Bandymo indus reikėtų pastatyti ant sukamosios arba slankiojamosios purtyklės stalo ir maišyti maždaug 150 sūkių per minutę greičiu. Arba galima suplakti indų turinį darant pertraukas – taip *Anabaena* būtų mažiau linkę sudaryti gniužulus. Jei susidaro gniužulų, būtina stengtis paimti reprezentatyvius ėminius biomasei matuoti. Norint suardyti dumblių gniužulus, prieš imant ėminius gali reikėti juos stipriai pakratyti.

Synechococcus leopoliensis

Pradinei kultūrai laikyti tinka įvairios auginimo terpės. Informaciją apie tinkamas terpes teikia atitinkamų kultūrų rinkinių tiekėjai.

Synechococcus leopoliensis yra pavienės lazdelės formos ląstelės, kurios yra labai mažos, todėl matuojant biomasę jas sunku suskaičiuoti mikroskopu. Pravartu naudoti elektroninius dalelių skaitiklius, pritaikytus mažesnėms, iki maždaug 1 μm dydžio dalelėms skaičiuoti. Taip pat tinka atlikti *in vitro* fluorimetrinius matavimus.

Navicula pelliculosa

Pradinei kultūrai laikyti tinka įvairios auginimo terpės. Informaciją apie tinkamas terpes teikia atitinkamų kultūrų rinkinių tiekėjai. Atminkite, kad terpės sudėtyje turi būti silikato.

Tam tikromis auginimo sąlygomis *Navicula pelliculosa* gali sudaryti sankaupas. Dėl lipidų susidarymo šių dumblių ląstelės kartais sudaro plėvelę terpės paviršiuje. Tokiomis sąlygomis imant dalinius ėminius biomasei nustatyti, būtina imtis specialių priemonių, kad ėminiai būtų reprezentatyvūs. Gali reikėti stipriai sukratyti dumblius, pvz., sūkuriniu maišytuvu.

▼M6

3 priedėlis

Auginimo terpės

Galima naudoti vieną iš šių dviejų auginimo terpių:

— EBPO terpė – originali EBPO TG 201 terpė, taip pat naudojama pagal standartą ISO 8692;

— JAV aplinkos apsaugos agentūros AAP terpė, taip pat naudojama pagal ASTM.

Šioms terpėms ruošti turėtų būti naudojamos analiziškai grynos cheminės medžiagos ir dejonizuotas vanduo.

AAP (JAV aplinkos apsaugos agentūros) terpės ir EBPO TG 201 terpės sudėtis

Sudedamoji dalis	AAP terpė		EBPO terpė	
	mg/l	mmol	mg/l	mmol
$NaHCO_3$	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
$CuCl_2$ $2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

EDTA ir geležies molinis santykis vos viršija vienetą; taip nesusidaro geležies nuosėdų ir kartu sunkiųjų metalų jonų chelodara yra minimali.

Bandymui naudojant titnagdumblius *Navicula pelliculosa*, siekiant gauti 1,4 mg Si/l koncentraciją, į abi terpes turi būti papildomai dedama $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$.

▼**M6**

Terpės pH vertė gaunama nusistovėjus pusiausvyrai tarp terpės karbonatinės sistemos ir atmosferos oro dalinio CO_2 slėgio. Apytikris santykis tarp pH vertės, esant 25 °C temperatūrai, ir molinės hidrokarbonato koncentracijos išreiškiamas formule

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

Esant 15 mg $NaHCO_3$/l, $pH_{eq} = 7{,}5$ (JAV aplinkos apsaugos agentūros siūlomoje terpėje), o esant 50 mg $NaHCO_3$/l, $pH_{eq} = 8{,}1$ (EBPO terpėje).

Bandymo terpių elementinė sudėtis

Elementas	AAP terpė	EBPO terpė
	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

EBPO terpės ruošimas

Mitybinė medžiaga	Koncentracija pradiniame tirpale
1 pradinis tirpalas: mitybiniai makroelementai	
NH_4Cl	1,5 g/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
2 pradinis tirpalas: geležis	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
3 pradinis tirpalas: mikroelementai	
H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l

▼**M6**

Mitybinė medžiaga	Koncentracija pradiniame tirpale
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
4 pradinis tirpalas: hidrokarbonatas	
$NaHCO_3$	50 g/l
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Pradiniai tirpalai sterilizuojami membraninio filtravimo būdu (vidutinis akučių skersmuo 0,2 μm) arba apdorojant autoklave (120 °C temperatūroje, 15 min.). Tirpalai laikomi tamsoje, 4 °C temperatūroje.

Autoklave negalima apdoroti 2 ir 4 pradinių tirpalų, jie sterilizuojami membraninio filtravimo būdu.

Auginimo terpė paruošiama į vandenį įpilant atitinkamą 1–4 pradinių tirpalų kiekį.

Į 500 ml sterilizuoto vandens įpilama:

10 ml 1 pradinio tirpalo;

1 ml 2 pradinio tirpalo;

1 ml 3 pradinio tirpalo;

1 ml 4 pradinio tirpalo.

Atskiedžiama sterilizuotu vandeniu iki 1 000 ml tūrio.

Terpė pakankamai ilgai laikoma, kad tarp jos ir atmosferos oro nusistovėtų CO_2 pusiausvyra, jei reikia, kelias valandas barbotuojant sterilų filtruotą orą.

JAV aplinkos apsaugos agentūros terpės ruošimas

1. Po 1 ml kiekvieno iš *2.1–2.7* punktuose nurodytų pradinių tirpalų įpilama į maždaug 900 ml dejonizuoto arba distiliuoto vandens ir atskiedžiama iki 1 litro tūrio.

2. Mitybinių makroelementų pradiniai tirpalai ruošiami 500 ml dejonizuoto arba distiliuoto vandens ištirpinant toliau nurodytus medžiagų kiekius. *2.1, 2.2, 2.3* ir *2.4* punktuose nurodytus reagentus galima sumaišyti viename pradiniame tirpale.

2.1	$NaNO_3$	12,750 g
2.2	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	6,082 g
2.3	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,205 g
2.4	Mitybinių mikroelementų pradiniai tirpalai (žr. 3)	
2.5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,350 g
2.6	K_2HPO_4	0,522 g
2.7	$NaHCO_3$	7,500 g
2.8	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	Žr. 1 pastabą.

▼**M6**

1 pastaba. Tinka tik bandomosioms titnagdumblių rūšims. Galima dėti tiesiai į terpę (202,4 mg) arba kaip pradinį tirpalą, kad galutinė koncentracija terpėje būtų 20 mg/l Si.

3. Mitybinių mikroelementų pradinis tirpalas ruošiamas 500 ml dejonizuoto arba distiliuoto vandens ištirpinant:

3.1	H_3BO_3	92,760 mg	
3.2	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	207,690 mg	
3.3	$ZnCl_2$	1,635 mg	
3.4	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	79,880 mg	
3.5	CoCl2 · 6H2O	0,714 mg	
3.6	Na2$MoO_4 \cdot 2H_2O$	3,630 mg	
3.7	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,006 mg	
3.8	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	150,000 mg	[dinatrio (etilendinitrilo) tetraacetatas]
3.9	$Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$	0,005 mg	Žr. 2 pastabą.

2 pastaba. Tinka dėti tik į titnagdumblių rūšių pradinių kultūrų terpes.

4. Nustatoma 7,5 ± 0,1 pH vertė įdedant 0,1 *N* arba 1,0 *N* NaOH arba HCl.

5. Terpės perfiltruojamos į sterilią talpą per 0,22 μm akučių membraninį filtrą, jeigu bus naudojamas dalelių skaitiklis, arba per 0,45 μm akučių filtrą, jeigu dalelių skaitiklis nebus naudojamas.

6. Terpė iki naudojimo laikoma tamsoje, maždaug 4 °C temperatūroje.

▼M6

4 priedėlis

Dumblių kultūrų auginimo procedūros pavyzdys

Bendrosios pastabos

Pagal šią procedūrą dumblių kultūros auginamos toksiškumo bandymams atlikti.

Tinkamais metodais užtikrinkite, kad dumblių kultūros nebūtų užkrėstos bakterijomis. Gali būti patartina naudoti sterilizuotas kultūras, tačiau turi būti gautos ir naudojamos vienarūšės dumblių kultūros.

Stengiantis išvengti užkrėtimo bakterijomis ir kitais dumbliais, visus veiksmus būtina atlikti steriliomis sąlygomis.

Naudojama įranga ir medžiagos

Žr. šio bandymo metodo aprašymą („Aparatūra“).

Dumblių kultūrų gavimo procedūros

Mitybinių medžiagų tirpalų (terpių) ruošimas

Paruošiami visų į terpę dedamų mitybinių medžiagų druskų koncentruoti pradiniai tirpalai, kurie laikomi tamsoje ir šaltai. Šie tirpalai sterilizuojami filtruojant arba apdorojant autoklave.

Terpė ruošiama į sterilų distiliuotą vandenį įpilant reikiamą pradinio tirpalo kiekį, imantis apsaugos nuo užkrėtimo priemonių. Ruošiant kietąją terpę įdedama 0,8 % agaro.

Pradinė kultūra

Pradinės kultūros yra mažos dumblių kultūros, kurios reguliariai perkeliamos į šviežią terpę ir naudojamos kaip pradinė bandymų medžiaga. Jeigu kultūros reguliariai nenaudojamos, jos perkeliamos ant gulsčiojo agaro mėgintuvėliuose. Šios kultūros bent kartą per du mėnesius perkeliamos į šviežią terpę.

Pradinės kultūros auginamos tinkamoje terpėje (apie 100 ml tūrio) kūginėse kolbose. 20 °C temperatūroje nuolatinio apšvietimo sąlygomis inkubuojamus dumblius reikia perkelti kas savaitę.

Į kolbą su šviežia terpe sterilia pipete perkeliamas toks „senos“ kultūros kiekis, kad pradinė koncentracija greitai augančių rūšių atveju būtų maždaug 100 kartų mažesnė nei senos kultūros.

Konkrečios rūšies dumblių augimo greitį galima nustatyti iš augimo kreivės. Žinant augimo greitį, galima įvertinti, koks turėtų būti į naują terpę perkeliamos kultūros tankis. Tai reikia padaryti anksčiau, negu atitinkama kultūra pasieks žūties tarpsnį.

Iš anksto paruošta kultūra

Iš anksto paruošta kultūra naudojama bandomųjų kultūrų pasėliui reikalingam dumblių kiekiui gauti. Iš anksto paruošta kultūra inkubuojama bandymo sąlygomis ir naudojama per eksponentinio augimo tarpsnį, paprastai maždaug po 2–4 parų inkubacinio periodo. Dumblių kultūrose esančios deformuotos arba neįprastos sandaros ląstelės turi būti pašalintos.

▼M6

5 priedėlis

Duomenų analizė netiesinės regresijos būdu

Bendrosios pastabos

Per dumblių ir kitų mikroorganizmų augimo bandymus gaunamas atsakas – biomasės augimas – yra iš esmės tolydusis arba metrinis kintamasis – proceso greitis, jei naudojamas augimo greitis, ir jo integralas pagal laiką, kintamuoju pasirinkus biomasę. Abu dydžiai lyginami su atitinkamu bandomosios medžiagos neveikiamų kartotinių kontrolinių bandinių vidutiniu atsaku, kuris yra didžiausias atsakas nustatytomis sąlygomis (pagrindiniai lemiamą įtaką turintys veiksniai per dumblių bandymą yra šviesa ir temperatūra). Bandymo sistema yra paskirstytoji arba vienalytė ir biomasę galima vertinti kaip ištisinį parametrą neatsižvelgiant į atskiras ląsteles. Tokioje sistemoje būdingo atsako dispersijos pasiskirstymas (paprastai apibūdinamas logaritminiu normaliuoju arba normaliuoju paklaidų skirstiniu) siejamas tik su bandymo veiksniais. Tai yra priešinga tipiniams dvireikšmių kintamųjų bioanalizės atsakams, dėl kurių dažnai daroma prielaida, kad atskirų organizmų atsparumas (paprastai išreikštas binominiu skirstiniu) yra vyraujantis dispersijos komponentas. Šiuo atveju kontrolinės grupės atsakas yra nulinio arba foninio lygio.

Nesudėtingu atveju normalizuotas arba santykinis atsakas *r* tolygiai mažėja nuo 1 (nulinis slopinimas) iki 0 (100 % slopinimas). Įsidėmėtina, kad visi atsakai turi asocijuotąją paklaidą ir kad gali būti apskaičiuotas tariamas neigiamas slopinimas, kuris būtų tik atsitiktinės paklaidos rezultatas.

Regresinė analizė

Modeliai

Regresinės analizės tikslas – koncentracijos ir atsako kreivę kiekybiškai apibūdinti kaip matematinės regresijos funkciją $Y = f(C)$ arba, dažniau, $F(Z)$, kai $Z = log\ C$. Naudojant atvirkštinę funkciją $C = f^{-1}(Y)$ galima apskaičiuoti EC_x vertes, įskaitant EC_{50}, EC_{10} ir EC_{20}, ir jų 95 % pasikliovimo ribas. Įrodyta, kad dumblių augimo slopinimo bandymais gautiems koncentracijos ir atsako santykiams apibūdinti tinka kelios paprastos matematinių funkcijų formulės. Tokios funkcijos yra, pvz., logistinė lygtis, nesimetrinė Weibull lygtis ir logaritminio normaliojo skirstinio funkcija. Visos jos yra sigmoidės, asimptotiškai artėjančios prie vieneto, kai $C \rightarrow 0$, ir prie nulio, kai $C \rightarrow$ begalybė.

Neseniai pasiūlyta kaip alternatyvą asimptotiniams modeliams taikyti tolydžiosios slenksčio funkcijos modelius (pvz., Kooijman „populiacijos augimo slopinimo“ modelį, Kooijman *et al.*, 1996). Pagal šį modelį daroma prielaida, kad poveikio nėra, kol koncentracija nesiekia tam tikros ribinės EC_0+ vertės, įvertinamos ekstrapoliuojant atsako ir koncentracijos santykį iki sankirtos su koncentracijos verčių ašimi, naudojant paprastą tolydžiąją funkciją, nediferencijuojamą pradžios taške.

Įsidėmėtina, kad analizė gali būti atliekama paprasčiausiai naudojant minimalias liekanų kvadratų (pastovios dispersijos atveju) sumas arba svertinių kvadratų sumas, jeigu kompensuojamas dispersijos nevienalytiškumas.

Procedūra

Taikomą procedūrą galima glaustai apibūdinti taip: pasirinkta tinkama funkcinė lygtis $Y = f(C)$ pritaikoma turimiems duomenims taikant netiesinę regresiją. Siekiant iš turimų duomenų gauti kuo daugiau informacijos, geriau naudoti atskirus kiekvienos kolbos matavimų duomenis, o ne vidutines kartotinių

▼M6

bandinių vertes. Kita vertus, esant didelei dispersijai, iš praktinės patirties yra žinoma, kad naudojant kartotinių bandinių vidurkius galima atlikti patikimesnį, mažiau duomenų sistemingųjų paklaidų veikiamą matematinį vertinimą negu tada, kai naudojamas kiekvienas atskiras paliktas duomenų taškas.

Grafike pavaizduojama pritaikyta kreivė kartu su matavimų duomenimis ir patikrinama, ar kreivė pritaikyta tinkamai. Šiuo tikslu gali būti itin naudinga atlikti liekanų analizę. Jeigu pasirinkta koncentracijos ir atsako pritaikymo funkcija tinka ne visai kreivei arba tik kuriai nors esminei jos daliai aprašyti, pvz., atsako „duobei“ esant mažoms koncentracijos vertėms, vietoj simetrinės pasirenkama kita pritaikoma kreivė, pvz., nesimetrinė Weibull funkcijos kreivė. Dėl neigiamo slopinimo gali kilti problemų, pvz., naudojant logaritminio normaliojo skirstinio funkciją; tokiu atveju irgi reikės rinktis kitą regresijos funkciją. Tokių neigiamų verčių nepatartina prilyginti nuliui ar priskirti joms mažą teigiamą vertę, nes taip būtų iškreiptas paklaidų pasiskirstymas. Norint įvertinti EC_x, kai *x* yra mažas, vertes, galbūt tiktų pritaikyti kreivę atskirose jos dalyse, pvz., mažo slopinimo dalyje. Pagal pritaikytą lygtį apskaičiuojami („atvirkštinio įvertinimo“ būdu) $C = f^{-1}(Y)$ būdingųjų taškų įverčiai EC_x ir ataskaitoje pateikiamas bent EC_{50} įvertis bei vienas iš dviejų EC_x, esant mažam *x*, įverčių. Iš bandymų praktikos žinoma, kad dėl dumblių bandymo preciziškumo paprastai galima pakankamai tiksliai įvertinti 10 % slopinimo lygį, jeigu yra pakankamai duomenų taškų, nebent, esant mažoms koncentracijoms, iškraipantysis veiksnys būtų augimo skatinimas. EC_{20} įverčio preciziškumas dažnai yra kur kas didesnis negu EC_{10}, nes EC_{20} paprastai yra maždaug tiesiojoje vidurinės koncentracijos ir atsako kreivės dalyje. Kartais EC_{10} duomenis gali būti sunku aiškinti dėl skatinamojo poveikio augimui. Todėl, nors EC_{10} vertę paprastai galima pakankamai tiksliai nustatyti, rekomenduojama ataskaitoje visada nurodyti ir EC_{20}.

Svertiniai koeficientai

Bandymų dispersija apskritai yra nepastovi ir į ją paprastai įeina proporcinis komponentas, taigi įprastai galima sėkmingai atlikti svertinę regresinę analizę. Tokiai analizei naudojami svertiniai koeficientai paprastai laikomi atvirkščiai proporcingais dispersijai:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Naudojant daugelį regresijos programų galima pasirinkti svertinę regresinę analizę, svertinius koeficientus pateikiant lentelėje. Patogu normalizuoti svertinius koeficientus dauginant juos iš $n/\Sigma\ w_i$ (n yra duomenų taškų skaičius), kad jų suma būtų lygi vienetui.

Atsakų normalizavimas

Normalizavimas pagal vidutinį kontrolinių bandinių atsaką kelia tam tikrų metodinių problemų ir gaunama gan sudėtingos struktūros dispersija. Kai augimo slopinimo procentinė vertė gaunama dalijant konkrečias atsako vertes iš kontrolinių bandinių atsako vidurkio, atsiranda papildoma paklaida dėl kontrolinių bandinių vidurkio paklaidos, todėl būtina atlikti regresijos svertinių koeficientų ir pasikliovimo ribų pataisą dėl kovariacijos su kontroliniais bandiniais (Draper ir Smith, 1981), nebent ši paklaida būtų labai maža. Įsidėmėtina, jog svarbu didelis kontrolinių bandinių vidutinio atsako įverčio preciziškumas, kad santykinio atsako suminė dispersija būtų kuo mažesnė. Ši dispersija atrodo taip:

(apatinis *i* indeksas reiškia *i* koncentracijos lygį, 0 indeksas – kontrolinius bandinius)

$$Yi = \text{santykinis atsakas} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i),$$

▼M6

kurio dispersija $Var(Y_i) = Var(r_i/r_0) \cong (\partial Yi / \partial r_i)^2 \cdot Var(r_i) + ((\partial Y_i/ \partial r_0)^2 \cdot Var(r_0))$,

ir kadangi $(\partial Y_i/ \partial r_i) = 1/r_0$ ir $(\partial Y_i/ \partial r_0) = r_i/r_0^2$,

esant normaliajam duomenų skirstiniui ir m_i bei m_0 kartotiniams bandiniams: $Var(r_i) = \sigma^2/m_i$

suminė santykinio atsako Y_i dispersija yra

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

Kontrolinių bandinių vidurkio paklaida yra atvirkščiai proporcinga kvadratinei šakniai iš suvidurkintų kontrolinių kartotinių bandinių skaičiaus; kartais galima pagrįstai įtraukti iš anksčiau sukauptus duomenis ir taip labai sumažinti paklaidą. Pagal alternatyvią procedūrą nereikia normalizuoti duomenų ir pritaikyti absoliučiųjų atsakų dydžių, įskaitant kontrolinių bandinių atsakų duomenis, tačiau reikia naudoti kontrolinių bandinių atsako vertę kaip papildomą parametrą, pritaikomą netiesinės regresijos būdu. Naudojant įprastą 2 parametrų regresijos lygtį, pagal šį metodą reikia pritaikyti 3 parametrus, todėl reikia daugiau duomenų taškų negu taikant netiesinę regresiją duomenims, kurie normalizuojami naudojant iš anksto nustatytą kontrolinių bandinių atsaką.

Atvirkštiniai pasikliautinieji intervalai

Netiesinės regresijos pasikliautinųjų intervalų apskaičiavimas atliekant atvirkštinį įvertinimą yra gana sudėtingas ir įprastuose statistikos kompiuterinių programų rinkiniuose jo nėra kaip tipinės pasirinkties. Apytikrius pasikliautinuosius intervalus galima gauti naudojant įprastas netiesinės regresijos programas ir atliekant parametrų keitimą (Bruce ir Versteeg, 1992), kurį sudaro matematinės lygties perrašymas pagal reikiamus taškų įverčius, pvz., EC_{10} ir EC_{50} kaip vertinamus parametrus (tarkime, kad yra funkcija I = f (α, β, koncentracija) ir naudojami apibrėžiamieji santykiai f (α, β, EC_{10}) = 0,1 bei f (α, β, EC_{50}) = 0,5 funkcijai f (α, β, koncentracija) pakeisti lygiaverte funkcija g (EC_{10}, EC_{50}, koncentracija).

Labiau tiesioginis apskaičiavimas (Andersen *et al.*, 1998) atliekamas nekeičiant pradinės lygties ir taikant Taylor eilutės skleidinį apie r_i ir r_0 vidurkius.

Neseniai išpopuliarėjo savirankos (angl. *bootstrap*) metodai. Taikant tokius metodus empiriniam dispersijos skirstiniui vertinti naudojami matavimų duomenys ir, naudojant atsitiktinių skaičių generatorių, dažnai imami pakartotiniai ėminiai.

NUORODOS

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

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

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

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

▼C1

C.4. LENGVO BIOLOGINIO SKAIDUMO MATAVIMAS

I DALIS. BENDRIEJI KLAUSIMAI

I.1. ĮVADAS

Aprašyti šeši metodai, kurie leidžia tirti cheminių medžiagų biologinio skaidumo lengvumą aerobinėje vandeninėje terpėje:

a) Ištirpusios organinės anglies (DOC) išnykimo (Die-Away) (C.4-A metodas);

b) Modifikuotas OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development* – Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacija) atrankos bandymas – DOC išnykimas (C.4-B metodas);

c) Anglies dioksido (CO_2) išsiskyrimas (modifikuotas Sturm bandymas) (C.4-C metodas);

d) Manometrinė respirometrija (C.4-D metodas);

e) Uždarosios kolbos (*closed bottle*) metodas (C.4-E metodas);

f) MITI (*Ministry of International Trade and Industry* (Tarptautinės prekybos ir pramonės ministerija) – Japonija) (C.4-F metodas).

Bendrieji ir įprastieji visų šešių bandymų klausimai pateikti metodo I dalyje. Atskiriems metodams specifiniai klausimai pateikti II–VII dalyse. Priedėliuose pateikiamos apibrėžtys, formulės ir rekomendacijos.

OECD tarplaboratorinio lyginimo bandymai, atlikti 1988 m. parodė, kad šiais metodais gauti rezultatai yra suderinami. Tačiau priklausomai nuo fizikinių bandomosios medžiagos savybių, pirmenybė gali būti teikiama vienam arba kitam metodui.

I.2. TINKAMO METODO PARINKIMAS

Norint parinkti tinkamiausią metodą, labai svarbi yra informacija apie cheminės medžiagos tirpumą, garų slėgį ir adsorbcijos charakteristikas. Turi būti žinoma cheminė medžiagos struktūra arba formulė, norint skaičiuoti teorines vertes ir (arba) tikrinti išmatuotas parametrų vertes, pvz., ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOC, COD (žr. 1 ir 2 priedėlius).

Bandomosios cheminės medžiagos, kurių tirpumas vandenyje yra bent 100 mg/l, ir jei jos nėra lakios ir neadsorbuojamos, gali būti įvertintos visais metodais. Toms cheminėms medžiagoms, kurios mažai tirpsta vandenyje, yra lakios arba yra adsorbuojamos, tinkami metodai nurodyti 1 lentelėje. Būdas, kaip reikia elgtis su mažai vandenyje tirpiomis ir lakiomis medžiagomis, yra aprašytas 3 priedėlyje. Vidutiniškai lakios cheminės medžiagos gali būti bandomos DOC išnykimo metodu, jei bandymo induose (kurie turi būti tinkamai užkimšti) dujoms yra pakankamai vietos. Šiuo atveju turi būti įdiegta abiotinė kontrolė, kad būtų galima atsižvelgti į bet kokius fizinius nuostolius.

▼C1

1 lentelė

Bandymo metodų tinkamumas

Bandymas	Analizės metodas	Tinkamumas medžiagoms, kurios yra:		
		mažai tirpios	lakios	adsorbuojamos
DOC išnykimas	Ištirpusi organinė anglis	—	—	+/-
Modifikuotas OECD atrankos bandymas – DOC išnykimas	Ištirpusi organinė anglis	—	—	+/-
CO_2 išsiskyrimas	Respirometrija: CO_2 išsiskyrimas	+	—	+
Manometrinė respirometrija	Manometrinė respirometrija: deguonies suvartojimas	+	+/-	+
Uždarosios kolbos	Respirometrija: ištirpęs deguonis	+/-	+	+
MITI	Respirometrija: deguonies suvartojimas	+	+/-	+

Norint aiškinti gautus rezultatus, ypač kai rezultatai yra žemi arba ribiniai, reikalinga informacija apie bandomosios medžiagos grynumą arba apie pagrindinių komponentų santykinę dalį.

Informacija apie bandomųjų medžiagų toksiškumą bakterijoms (4 priedėlis) gali būti labai naudinga, kai reikia pasirinkti tinkamas bandomąsias koncentracijas, ir gali būti esminė, kai reikia teisingai paaiškinti, kodėl biologinio skaidymo vertės yra mažos.

I.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Norint tikrinti metodiką, lygiagrečiai įprastiems bandymams tinkamai paruoštoje kolboje bandomos etaloninės medžiagos, kurios atitinka lengvo biologinio skaidumo kriterijus.

Tinkamos cheminės medžiagos yra anilinas (šviežiai distiliuotas), natrio acetatas ir natrio benzoatas. Visos šios etaloninės medžiagos skaidomos šių bandymų sąlygomis, net jei sėjimo kultūra ir nėra specialiai įdėta.

Buvo siūloma, kad reikėtų rasti etaloninę medžiagą, kuri būtų lengvai biologiškai skaidoma, tačiau tik kai yra įdėta sėjimo kultūros. Buvo pasiūlytas kalio hidroftalatas, tačiau prieš priimant jį kaip etaloninę medžiagą, reikia apie šią medžiagą surinkti daugiau duomenų.

Respirometriniuose bandymuose junginiai su azotu gali turėti įtakos deguonies suvartojimui dėl nitrifikavimo (žr. 2 ir 5 priedėlius).

I.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Į bandomosios medžiagos tirpalą arba suspensiją mineralinėje terpėje dedama sėjimo kultūra ir tirpalas inkubuojamas aerobinėmis sąlygomis tamsoje arba išsklaidytoje šviesoje. Sėjimo kultūros DOC kiekis bandomosios medžiagos tirpale turi būti kiek įmanoma mažesnis lyginant su bandomosios medžiagos DOC kiekiu. Atsižvelgiama į sėjimo kultūros endogeninį aktyvumą, lygiagrečiai atliekant tuščiuosius bandymus su sėjimo kultūra, bet be bandomosios medžiagos, nors ląstelių endogeninis aktyvumas, kai yra bandomosios medžiagos, nevisiškai tiksliai atitinka aktyvumą endogeninio aktyvumo kontroliniame bandyme. Metodikų veikimui tikrinti lygiagrečiai atliekamas bandymas su etalonine medžiaga.

▼C1

Paprastai skaidymo eiga sekama nustatant parametrus, pvz., DOC, CO_2 susidarymą ir deguonies suvartojimą; matavimai daromi pakankamai dažnai, kad galima būtų nustatyti biologinio skaidymo pradžią ir pabaigą. Jei naudojami automatiniai respirometrai, matavimas yra nepertraukiamas. Kai matuojamas kitas parametras, kartais papildomai matuojama DOC, tačiau tai paprastai daroma tik bandymo pradžioje ir pabaigoje. Galima naudoti specifinę cheminę analizę, kai norima įvertinti pradinį bandomosios medžiagos skaidymą ir nustatyti bet kurios susidariusios tarpinės medžiagos koncentraciją (privaloma MITI bandyme).

Paprastai bandymas tęsiamas 28 paras. Tačiau bandymą galima baigti anksčiau nei po 28 parų, t. y. kai biologinio skaidymo kreivė pasiekia gulsčiąją dalį bent po trijų matavimų. Bandymai gali būti pratęsti ir atliekami ilgiau nei 28 paras, kai kreivė rodo, kad biologinis skaidymas prasidėjo, tačiau 28 parą gulsčioji dalis dar nepasiekta.

I.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

I.5.1. **Atkuriamumas**

Dėl biologinio skaidymo prigimties ir dėl mišrios bakterijų populiacijų, naudojamos kaip sėjimo kultūros, sudėties matavimai turi būti daromi bent du kartus.

Bendra patirtis rodo, kad, kuo didesnė bandymo pradžioje į bandomąją terpę įdėtų mikroorganizmų koncentracija, tuo mažesnė bus lygiagrečių bandymų sklaida. Tarplaboratorinio lyginimo bandymai taip pat parodė, kad gali labai skirtis rezultatai, gauti skirtingose laboratorijose, tačiau lengvai biologiškai skaidomų junginių atveju rezultatai paprastai yra pakankamai panašūs.

I.5.2. **Bandymo tinkamumas**

Bandymas yra tinkamas, jei skirtumas tarp bandomosios medžiagos šalinimo pakartotinai gautų kraštinių verčių gulsčioje kreivės dalyje, bandymo pabaigoje arba 10 parų lango pabaigoje, kai tinkama, yra mažesnis kaip 20 %, ir jei etaloninės medžiagos skaidymo procentinė vertė iki 14 paros pasiekė lengvo biologinio skaidumo lygį. Jei kuri nors iš šių sąlygų neįvykdyta, bandymas turi būti pakartotas. Dėl metodų tikslumo mažos vertės nebūtinai reiškia, kad bandomoji medžiaga aplinkos sąlygomis biologiškai neskaidi, tačiau jos rodo, kad biologiniam skaidumui nustatyti būtina tęsti darbą.

Jei toksiškumo bandyme, kuriame naudojama ir bandomoji medžiaga, ir etaloninė cheminė medžiaga, skaidymas po 14 parų yra mažesnis kaip 35 % (pagal DOC) arba mažesnis kaip 25 % (pagal ThOD arba $ThCO_2$), bandomosios cheminės medžiagos gali būti laikomos inhibuojančiomis (dar žr. 4 priedėlį). Bandymų serijos turi būti pakartotos, jei įmanoma, naudojant mažesnę bandomosios medžiagos koncentraciją ir (arba) didesnę sėjimo kultūros koncentraciją, tačiau ne didesnę kaip 30 mg kietųjų dalelių/litre.

I.6. BENDROSIOS METODIKOS IR PREPARATAI

Bendrosios bandymų sąlygos apibendrintos 2 lentelėje. Aparatūra ir kitos eksperimento sąlygos, specifiškai siejamos su atskiru bandymu, aprašytos toliau pateiktame to bandymo aprašyme.

▼C1

2 lentelė

Bandymų sąlygos

Bandymas	DOC išnykimas	CO_2 išsiskyrimas	Manometrinė respirometrija	OECD atrankos bandymas	Uždarosios kolbos bandymas	MITI (I)
Bandomosios medžiagos koncentracija						
mg/l			100		2–10	100
mg DOC/l	10–40	10–20		10–40		
mg ThOD/l			50–100		5–10	
Sėjimo kultūros koncentracija (ląstelių/l, apytikriai)	≤ 30 mg/l SS arba ≤ 100 ml ištakio/l ($10^{7-1}0^{8}$)			0,5 ml antrinio ištakio/l (10^{5})	≤ 5 ml ištakio/l ($10^{4-1}0^{6}$)	30 mg/l SS ($10^{7-1}0^{8}$)
Elementų koncentracija mineralinėje terpėje						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05– 0,1				0,05– 0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					geriau 7,0
Temperatūra	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = ištirpusi organinė anglis ThOD = teorinis deguonies suvartojimas SS = Suspenduotos kietosios dalelės

I.6.1. **Skiedimo vanduo**

Naudojamas dejonizuotas arba distiliuotas vanduo, kuriame nebūtų inhibuojančios koncentracijos nuodingųjų medžiagų (pvz., Cu^{2+} jonų). Vandenyje organinės anglies neturi būti daugiau kaip 10 % to kiekio, kuris yra bandomojoje medžiagoje. Didelis bandymo vandens grynumas reikalingas tam, kad būtų eliminuotos didelės tuščiųjų bandinių vertės. Užterštumas gali atsirasti dėl vandeniui būdingų priemaišų ir dėl jonitinių dervų bei bakterijų ir dumblių irimo produktų. Kiekvienoje bandymų serijoje naudokite tik vienos partijos vandenį, iš anksto patikrintą atliekant DOC analizę. Toks tikrinimas nėra būtinas uždarosios kolbos bandyme, tačiau vandens suvartojamas deguonies kiekis turi būti mažas.

▼C1

I.6.2. **Pradiniai mineralinių komponentų tirpalai**

Norint ruošti bandomuosius tirpalus, ruošiami atitinkamų koncentracijų mineralinių komponentų pradiniai tirpalai. DOC išnykimo, modifikuotos OECD atrankos, CO_2 išsiskyrimo, manometrinės respirometrijos, uždarosios kolbos bandymuose galima naudoti tokius pradinius (su skirtingais skiedimo faktoriais) tirpalus.

Skiedimo faktoriai ir specialios mineralinės terpės ruošimas MITI bandymui pateikti konkrečių metodų aprašymuose.

Pradiniai tirpalai:

Paruoškite šiuos pradinius tirpalus, naudodami analiziškai grynas medžiagas.

a) kalio dihidrofosfatas, KH_2PO_4 8,50 g

kalio hidrofosfatas, K_2HPO_4 21,75 g

natrio hidrofosfatas, dihidratas, $Na_2HPO_4 . 2 H_2O$ 33,40 g

Amonio chloridas NH_4CL 0,50 g

Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro. Tirpalo pH turi būti 7,4.

b) kalcio chloridas, bevandenis, $CaCl_2$ 27,50 g

arba kalcio chloridas, dihidratas, $CaCl_2, 2 H_2O$ 36,40 g

Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro

c) magnio sulfatas, heptahidratas, $MgSO_4 . 7 H_2O$ 22,50 g

Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro

d) geležies (III) chloridas, heksahidratas, $FeC1_3 . 6H_2O$ 0,25 g

Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro

Pastaba. Jei nenorite ruošti šio tirpalo prieš patį bandymą, vienam tirpalo litrui įlašinkite vieną lašą konc. HCl arba įdėkite 0,4 g etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druskos (EDTA).

I.6.3. **Cheminių medžiagų pradiniai tirpalai**

Pavyzdžiui, dejonizuotame vandenyje ištirpinkite 1–10 g (kiek reikia) bandomosios arba etaloninės medžiagos ir skieskite iki 1 litro, jei tirpumas didesnis kaip 1 g/l. Pagal kitą būdą pradinius tirpalus ruoškite mineralinėje terpėje arba cheminę medžiagą dėkite tiesiai į mineralinę terpę. Kaip ruošti mažiau tirpias chemines medžiagas, žr. 3 priedėlį, tačiau MITI bandyme (C.4-F metodas) nei tirpikliai, nei emulsikliai neturi būti naudojami.

▼C1

I.6.4. **Sėjimo kultūros**

Sėjimo kultūrą galima gauti iš įvairių šaltinių: aktyvusis dumblas, nuotekų ištakiai (nechloruoti), paviršiniai vandenys ir dirvožemiai, arba mišiniai iš šių šaltinių. Jei DOC išnykimo, CO_2 išsiskyrimo ir manometrinės respirometrijos bandymams naudojamas aktyvusis dumblas, jis turi būti imamas iš nuotekų valymo įrenginių arba laboratorinių valymo įrenginių, į kuriuos daugiausia patenka buitinės nuotekos. Buvo nustatyta, kad naudojant sėjimo kultūras iš kitų šaltinių, rezultatų sklaida didesnė. Modifikuotam OECD atrankos ir uždarosios kolbos bandymams reikia labiau praskiestos sėjimo kultūros be dumblo dribsnių, todėl labiau pageidautinas šaltinis yra antrinis ištakis iš buitinių nuotekų valymo įrenginio arba laboratorinio valymo įrenginio. MITI bandymui sėjimo kultūra daroma iš įvairių šaltinių gauto mišinio ir aprašyta šio specialaus bandymo skyriuje.

I.6.4.1. *Sėjimo kultūra iš aktyviųjų dumblų*

Iš daugiausia buitines nuotekas valančio valymo įrenginio arba laboratorinio valymo įrenginio aeravimo talpos surinkite šviežią aktyviojo dumblo bandinį. Prireikus stambias daleles šalinkite filtruodami per tankų tinklinį filtrą ir toliau dumblą laikykite aerobinėmis sąlygomis.

Kita galimybė – pašalinę visas stambias daleles, leiskite dumblui nusistovėti arba centrifuguokite (pvz., 10 min veikiant 100 g). Skystį nuo dumblo pilkite lauk. Dumblą galite plauti mineraline terpe. Suspenduokite koncentruotą dumblą mineralinėje terpėje, kad suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija būtų 3–5 g/l, ir aeruokite tol, kol dumblą panaudosite.

Dumblas turi būti imamas iš gerai veikiančio standartinio įrenginio. Jei dumblą reikia imti iš didelio našumo valymo įrenginio, arba, jei manoma, kad dumble yra inhibitorių, jis turi būti plaunamas. Gerai sumaišytą, pakartotinai suspenduotą dumblą palikite nusistovėti arba centrifuguokite, nupilkite nuo jo skystį ir išplautą dumblą dar kartą suspenduokite kitame mineralinės terpės tūryje. Šiuos veiksmus kartokite tol, kol bus galima manyti, kad substrato pertekliaus arba inhibitorių neliko.

Prieš pat dumblo naudojimą, paimkite vėl visiškai suspenduoto arba neapdoroto dumblo bandinį sausų suspenduotų kietųjų dalelių masei nustatyti.

Pagal kitą būdą galima homogenizuoti aktyvųjį dumblą (3–5 g/l suspenduotų kietųjų dalelių). Maišykite dumblą 2 min. vidutiniu greičiu mechaniniame maišiklyje. Palikite sumaišytą dumblą 30 min. arba ilgiau, jei to reikia, ir dekantuokite skystį, kurį naudosite kaip sėjimo kultūrą, pagal normą 10 ml/l mineralinės terpės.

I.6.4.2. *Kiti sėjimo kultūros šaltiniai*

Ją galima gauti iš valymo įrenginio arba laboratorinio valymo įrenginio, apdorojančių daugiausia buitines nuotekas, antrinio ištakio. Paimkite šviežią bandinį ir, kol gabenate, laikykite jį aerobinėmis sąlygomis. Palikite nusistovėti 1 h arba filtruokite per stambų filtrinį popierių, ir dekantuotą ištakį arba filtratą laikykite aerobinėmis sąlygomis, kol naudosite. Vienam litrui mineralinės terpės galima naudoti iki 100 ml šios rūšies sėjimo kultūros.

▼C1

Kitas sėjimo terpės šaltinis yra paviršinis vanduo. Šiuo atveju paimkite tinkamo paviršinio vandens, pvz., upės, ežero, bandinį ir laikykite aerobinėmis sąlygomis, kol panaudosite. Prireikus sėjimo kultūrą koncentruokite filtravimo arba centrifugavimo būdu.

I.6.5. **Sėjimo kultūrų pradinis kondicionavimas**

Sėjimo kultūros gali būti iš anksto kondicionuojamos eksperimento sąlygoms, tačiau iš anksto prie bandomosios cheminės medžiagos neadaptuojamos. Pradinis kondicionavimas susideda iš aktyviojo dumblo tirpalo mineralinėje terpėje arba antrinio ištakio 5–7 parų trukmės aeravimo bandymo temperatūroje. Kartais pradinis kondicionavimas gerina bandymo metodų preciziškumą, nes sumažina tuščiųjų bandinių vertes. Laikoma, kad MITI bandymo sėjimo kultūrai pradinis kondicionavimas nebūtinas.

I.6.6. **Abiotinio skaidymo kontroliniai bandiniai**

Kai reikia, nustatykite galimą bandomosios medžiagos abiotinį skaidymą, matuodami DOC pašalinimą, deguonies suvartojimą arba anglies dioksido išsiskyrimą steriliuose kontroliniuose bandiniuose be sėjimo kultūros. Sterilizuokite filtruodami per membraną (0,2–0,45 μm) arba pridėkite reikiamos koncentracijos tinkamos toksinės medžiagos. Jei naudojamas filtravimas per membraną, sterilumui užtikrinti bandinius imkite aseptiniu būdu. Jei bandomosios medžiagos adsorbcijos galimybė nebuvo iš anksto atmesta, bandymai, kuriuose biologinis skaidymas nustatomas matuojant DOC šalinimą, ypač jei sėjimo kultūra iš aktyviojo dumblo, turi būti su abiotinio skaidymo kontroliniu bandiniu, į kurį dedama sėjimo kultūra ir nuodijama.

I.6.7. **Kolbų skaičius**

Kolbų skaičius tipiniame bandyme nurodytas skyriuje su atitinkamo metodo aprašymu. Galima naudoti tokio tipo kolbas:

— bandomoji suspensija: su bandomąja medžiaga ir sėjimo kultūra,

— sėjimo kultūros tuščiasis bandinys: tik su sėjimo kultūra,

— metodikos tikrinimo bandinys: su etalonine medžiaga ir sėjimo kultūra,

— abiotinio skaidymo sterilus kontrolinis bandinys: sterilus, su bandomąja medžiaga (žr. I.6.6),

— adsorbcijos kontrolinis bandinys: su bandomąja medžiaga, sėjimo kultūra ir sterilizavimo medžiaga,

— toksiškumo kontrolinis bandinys: su bandomąja medžiaga, etalonine medžiaga ir sėjimo

— kultūra.

Būtina, kad nustatymas bandomojoje suspensijoje ir sėjimo kultūros tuščiajame bandinyje būtų daromas lygiagrečiai. Patartina matavimus kitose kolbose taip pat daryti lygiagrečiai.

Tačiau tai ne visuomet gali būti įmanoma. Užtikrinkite, kad būtų paimtas pakankamas skaičius bandinių arba padaryta matavimų, norint įvertinti pašalinimo procentinę vertę po 10 parų lango.

▼C1

I.7. DUOMENYS IR VERTINIMAS

Skaičiuojant skaidymo procentinę vertę, D_t, naudojamos vidutinės vertės dviejų parametro matavimų bandymų induose ir tuščiajame bandinyje su sėjimo kultūra. Formulės pateiktos kituose konkrečius bandymus aprašančiuose skyriuose. Skaidymo eiga vaizduojama grafiškai ir pažymima 10 parų langas. Apskaičiuokite ir pateikite medžiagos šalinimo, baigiantis 10 parų langui, procentinę vertę ir gulsčiąją kreivės dalį atitinkančią vertę arba bandymo pabaigos vertę, kuri tinka.

Respirometriniuose bandymuose junginiai, turintys azoto, gali turėti įtakos deguonies suvartojimui dėl nitrifikavimo (žr. 2 ir 5 priedėlius).

I.7.1. **Skaidymas, nustatomas pagal DOC kiekio matavimą**

Skaidymo procentinė vertė D_t kiekvieną kartą, kai paimamas bandinys, turi būti skaičiuojama atskirai kolboms su bandomąja medžiaga, naudojant dviejų DOC matavimu vidutines vertes, kad būtų galima įvertinti bandymo tinkamumą (žr. I.5.2.). Skaidymas skaičiuojamas pagal lygtį:

$$D_t = \left(1 - \left(\frac{(C_t - C_{bt})}{(C_o - C_{b0})}\right)\right) \times 100$$

čia:

D_t = skaidymo % laiku t,

C_o = vidutinė pradinė DOC koncentracija terpėje su bandomąja medžiaga ir sėjimo kultūra (DOC mg/l),

C_t = vidutinė DOC koncentracija terpėje su bandomąja medžiaga ir sėjimo kultūra laiku t (DOC mg/l),

C_{bo} = vidutinė pradinė DOC koncentracija tuščiojo bandinio terpėje su mineraline sėjimo kultūra (DOC mg/l),

C_{bt} = vidutinė DOC koncentracija tuščiojo bandinio terpėje su mineraline sėjimo kultūra laiku t (DOC mg/l).

Visos koncentracijos nustatomos eksperimentiškai.

I.7.2. **Skaidymas, nustatomas atliekant specifinę analizę**

Kai yra specifinės analizės duomenys, pradinis biologinis skaidymas skaičiuojamas pagal formulę:

$$D_t = \left(\frac{(S_b - S_a)}{(S_b)}\right) \times 100$$

čia:

D_t = skaidymo % laiku t, paprastai 28 paros,

S_a = likutinis bandomosios medžiagos kiekis terpėje su sėjimo kultūra bandymo pabaigoje (mg),

S_b = likutinis bandomosios medžiagos kiekis tuščiajame bandinyje su vandeniu (terpe), į kurį buvo įdėta tik bandomoji medžiaga (mg).

▼C1

1.7.3. **Abiotinis skaidymas**

Naudojant sterilų kontrolinį bandinį abiotiniam skaidymui nustatyti, abiotinio skaidymo procentinė vertė skaičiuojama pagal formulę:

$$\text{Abiotinio skaidymo \%} = \left(\frac{(C_{s(o)} - C_{s(t)})}{(C_{s(o)})}\right) \times 100$$

čia:

$C_{s(o)}$ = DOC koncentracija steriliame kontroliniame bandinyje 0 parą

$C_{s(t)}$ = DOC koncentracija steriliame kontroliniame bandinyje t parą

I.8. ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta, jei įmanoma, tokia informacija:

— bandomoji ir etaloninė cheminė medžiaga, jų grynumas,

— bandymo sąlygos,

— sėjimo kultūra: prigimtis ir ėmimo vieta (-os), koncentracija ir bet koks pradinis kondicionavimas,

— nuotekose esančių pramoninių nuotekų dalis ir prigimtis, jei tai žinoma,

— bandymo trukmė ir temperatūra,

— apdorojimo būdas mažai tirpių cheminių medžiagų atveju,

— taikytas bandymo metodas; būtina moksliškai pagrįsti ir paaiškinti bet kokį metodikos keitimą,

— specifikacija,

— visi stebėti inhibavimo reiškiniai,

— bet koks stebimas abiotinis skaidymas,

— specifinės cheminės analizės duomenys, jei yra,

— analiziniai duomenys apie tarpinius produktus, jei yra,

— bandomosios medžiagos ir etaloninės medžiagos skaidymo procentinės dalies kitimo laike grafikas; turi būti aiškiai nurodyta vėlavimo fazė, skaidymo fazė, 10 parų langas ir kreivės krypties koeficientas (1 priedėlis). Jei bandymas atitinka tinkamumo kriterijus, grafikui sudaryti galima naudoti skaidymo procentinių verčių vidutines vertes, gautas kolbose su bandomąja medžiaga,

— šalinimo procentinė dalis po 10 parų lango ir kreivės gulsčioje dalyje arba bandymo pabaigoje.

II DALIS. **DOC IŠNYKIMO BANDYMAS** (C.4-A metodas)

II.1. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Išmatuotas mineralinės terpės su sėjimo kultūra ir žinomos koncentracijos bandomąja medžiaga (nuo 10 iki 40 mg/l DOC), kuri nominaliai yra vienintelis organinės anglies šaltinis, tūris yra aeruojamas tamsoje arba išsklaidytoje šviesoje 22 ± 2 °C temperatūroje.

▼C1

Skaidymas sekamas, 28 paras trumpais intervalais atliekant DOC analizę. Biologinio skaidymo laipsnis skaičiuojamas pašalintos DOC koncentraciją (pataisyta dėl DOC koncentracijos sėjimo kultūros tuščiajame kontroliniame bandinyje) reiškiant pradinės koncentracijos procentine dalimi. Pradinio biologinio skaidymo laipsnį galima skaičiuoti pagal papildomą cheminę analizę, atliekamą inkubavimo pradžioje ir pabaigoje.

II.2. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

II.2.1. **Aparatūra**

a) Kūginės kolbos, pvz., nuo 250 ml iki 2 litrų, tūris priklauso nuo DOC analizei reikalingo tūrio;

b) purtyklė, skirta kūginėms kolboms dėti, arba su automatiniu termostatavimu arba naudojama patalpoje su pastovia temperatūra, ir pakankamo galingumo, kad visose kolbose galima būtų palaikyti aerobines sąlygas;

c) filtravimo aparatas su tinkamomis membranomis;

d) DOC analizatorius;

e) ištirpusio deguonies nustatymo aparatūra;

f) centrifuga.

II.2.2. **Mineralinės terpės ruošimas**

Apie pradinių tirpalų ruošimą, žr. I.6.2.

Sumaišykite 10 ml (a) tirpalo su 800 ml skiedimo vandens, įpilkite po 1 ml (b) – (d) tirpalų ir praskieskite skiedimo vandeniu iki 1 litro.

II.2.3. **Sėjimo kultūros ruošimas ir pradinis kondicionavimas**

Sėjimo kultūrą galima ruošti iš įvairių šaltinių: aktyvusis dumblas; nuotekų ištakiai; paviršiniai vandenys; dirvožemiai arba mišiniai iš šių šaltinių.

Žr. I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ir I.6.5.

II.2.4. **Kolbų ruošimas**

Pavyzdžiui, į atskiras 2 l kūgines kolbas įpilkite po 800 ml mineralinės terpės ir pakankamą tūrį bandomosios ir etaloninės medžiagos pradinių tirpalų, kad DOC koncentracija atitiktų 10–40 mg/l. Patikrinkite pH vertes ir prireikus nustatykite lygią 7,4. Įdėkite į kolbas sėjimo kultūros iš aktyviojo dumblo arba kito šaltinio (žr. I.6.4), kad galutinė suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija būtų ne didesnė kaip 30 mg/l. Taip pat paruoškite sėjimo kultūros tirpalo mineralinėje terpėje kontrolinį bandinį, kuriame nebūtų bandomosios arba etaloninės medžiagos.

Jei reikia, vieną indą naudokite tikrinti galimam bandomosios medžiagos inhibuojamajam poveikiui, į panašios koncentracijos bandomosios ir etaloninės medžiagų tirpalą mineralinėje terpėje įdėję sėjimo kultūros.

Be to, jei reikia, paruoškite dar vieną sterilią kolbą su chemine medžiaga be sėjimo kultūros, kad galėtumėte nustatyti, ar vyksta bandomosios medžiagos abiotinis skaidymas (žr. I.6.6).

▼C1

Papildomai, jei kyla įtarimas, kad bandomąją medžiagą labai adsorbuoja stiklas, dumblas ir t. t., atlikite parengiamąjį vertinimą galimam adsorbcijos laipsniui nustatyti ir, tuo pačiu, bandymo tinkamumui šiai cheminei medžiagai (žr. 1 lentelę). Paruoškite kolbą su bandomąja medžiaga, sėjimo kultūra ir sterilizavimo medžiaga.

Visus tirpalus kolbose skieskite mineraline terpe iki 1 l ir, išmaišę, iš kiekvienos kolbos paimkite bandinį DOC pradinei koncentracijai nustatyti (žr. 2.4 priedėlį). Uždenkite kolbų angas pvz., aliuminio folija taip, kad tarp kolbos ir ją supančios aplinkos laisvai judėtų oras. Tuomet bandymui pradėti įstatykite kolbas į purtyklę.

II.2.5. **Kolbų skaičius tipiniame bandyme**

1 ir 2 kolba: bandomoji suspensija

3 ir 4 kolba: sėjimo kultūros tuščiasis bandinys

5 kolba: metodikos tikrinimo bandinys

ir pageidautina bei kai būtina:

6 kolba: abiotinio skaidymo sterilus kontrolinis bandinys

7 kolba: adsorbcijos kontrolinis bandinys

8 kolba: toksiškumo kontrolinis bandinys

Žr. dar I.6.7.

II.2.6. **Bandymo procedūra**

Visą bandymo laiką žinomais laiko tarpais, bet pakankamai dažnai, kad galima būtų nustatyti 10 parų lango pradžią ir šalinimo procentinę vertę 10 parų lango pabaigoje, kiekvienoje kolboje po du kartus nustatykite DOC koncentraciją. Imkite tik mažiausią bandomosios suspensijos tūrį, reikalingą kiekvienam nustatymui.

Jei būtina, prieš imdami bandinį, kompensuokite garavimo iš kolbų nuostolius, įpildami reikiamą kiekį skiedimo vandens (I.6.1). Prieš imdami bandinį, gerai sumaišykite kultūros terpę ir užtikrinkite, kad prieš bandinio ėmimą ant kolbos sienelių prilipusi medžiaga būtų ištirpinta arba suspenduota. Paėmę bandinį, jį iš karto filtruokite per membraninį filtrą arba centrifuguokite (žr. 2.4 priedėlį). Nufiltruotus arba centrifuguotus bandinius analizuokite tą pačią dieną arba laikykite 2–4 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 48 h, jei ilgiau – žemesnėje kaip –18 °C temperatūroje.

II.3. DUOMENYS IR ATASKAITA

II.3.1. **Rezultatų apdorojimas**

Apskaičiuokite skaidymo procentinę vertę laiku t, kaip nurodyta I.7.1. (DOC nustatymas) ir, neprivalomai, kaip I.7.2. (specifinė analizė).

Visus rezultatus užrašykite pateiktose specifikacijose.

▼C1

II.3.2. **Rezultatų tinkamumas**

Žr. I.5.2.

II.3.3. **Ataskaita**

Žr. I.8.

II.4. SPECIFIKACIJA

Toliau pateiktas specifikacijos pavyzdys.

DOC IŠNYKIMO BANDYMAS

1. **LABORATORIJA**

2. **BANDYMO PRADŽIOS DATA**

3. **BANDOMOJI MEDŽIAGA**

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija: … mg/l, kaip cheminės medžiagos

Pradinė koncentracija terpėje, t_0: … mg/l, kaip cheminės medžiagos

4. **SĖJIMO KULTŪRA**

Šaltinis:

Kaip apdorota:

Pradinis kondicionavimas, jei toks buvo:

Suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija reakcijos mišinyje: mg/l.

5. **ANGLIES NUSTATYMAS**

Anglies analizatorius:

	Kolba Nr.		DOC (mg/l) po n parų				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Bandomoji cheminė medžiaga ir sėjimo kultūra	1	a_1					
		a_2					
		a, vidutinė vertė $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, vidutinė vertė $C_{b(t)}$					

▼C1

	Kolba Nr.		DOC (mg/l) po n parų				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Sėjimo kultūros tuščiasis bandinys be bandomosios medžiagos	3	C_1					
		C_2					
		C, vidutinė verte $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, vidutinė vertė $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \left(\frac{(C_{c(t)} + C_{d(t)})}{(2)} \right)$						

6. **NEAPDOROTŲ DUOMENŲ VERTINIMAS**

Kolba Nr.		skaidymo % po n parų				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \left(\frac{(C_{a(t)} - C_{bl(t)})}{(C_{a(o)} - C_{bl(o)})} \right) \right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \left(\frac{(C_{b(t)} - C_{bl(t)})}{(C_{b(o)} - C_{bl(o)})} \right) \right) \times 100$	0				
Vidutinė vertė ([1])	$D = \left(\frac{(D_1 - D_2)}{(2)} \right)$	0				

([1]) D_1 ir D_2 vidutinė vertė neturi būti skaičiuojama, jei tarp jų yra didelis skirtumas.

Pastaba. Panašūs formatai gali būti taikomi etaloninei medžiagai ir toksiškumo kontroliniams bandiniams.

7. **ABIOTINIO SKAIDYMO KONTROLINIS BANDINYS** (neprivalomas)

	Laikas (paros)	
	0	t
DOC koncentracija (mg/l) steriliame kontroliniame bandinyje	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

biotinio skaidymo % = $\left(\frac{(C_{s(o)} - C_{s(t)})}{(C_{s(o)})} \times 100 \right)$

8. **SPECIFINĖ CHEMINĖ ANALIZĖ** (neprivaloma)

	Bandomosios medžiagos likutinis kiekis bandymo pabaigoje (mg/l)	Pirminio skaidymo %
Sterilus kontrolinis bandinys	S_b	

▼C1

	Bandomosios medžiagos likutinis kiekis bandymo pabaigoje (mg/l)	Pirminio skaidymo %
Bandymo terpė su sėjimo kultūra	s_a	$\left(\frac{(S_b - S_a)}{(S_b)}\right) \times 100$

III DALIS. **MODIFIKUOTAS OECD ATRANKOS BANDYMAS (C.4-B metodas)**

III.1. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Į išmatuotą mineralinės terpės tūrį su žinoma koncentracija bandomosios medžiagos (nuo 10 iki 40 mg/l DOC), kuri nominaliai yra vienintelis organinės anglies šaltinis, įpilama sėjimo kultūros 0,5 ml vienam litrui terpės. Mišinys yra aeruojamas tamsoje arba išsklaidytoje šviesoje 22 ± 2 °C temperatūroje.

Skaidymas sekamas, 28 paras trumpais intervalais atliekant DOC analizę. Biologinio skaidymo laipsnis skaičiuojamas pašalintos DOC koncentraciją (pataisyta dėl DOC koncentracijos sėjimo kultūros tuščiajame kontroliniame bandinyje) reiškiant pradinės koncentracijos procentine dalimi. Pradinio biologinio skaidymo laipsnį galima skaičiuoti pagal papildomą cheminę analizę, atliekamą inkubavimo pradžioje ir pabaigoje.

III.2. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

III.2.1. **Aparatūra**

1) Kūginės kolbos, pvz., nuo 250 ml iki 2 litrų, tūris priklauso nuo DOC analizei reikalingo tūrio;

2) purtyklė, skirta kūginėms kolboms dėti, kuri būtų arba su automatiniu termostatavimu arba naudojama patalpoje su pastovia temperatūra, ir pakankamo galingumo, kad visose kolbose galima būtų palaikyti aerobines sąlygas;

3) filtravimo aparatas, su tinkamomis membranomis;

4) DOC analizatorius;

5) ištirpusio deguonies nustatymo aparatūra;

6) centrifuga.

III.2.2. **Mineralinės terpės ruošimas**

Apie pradinių tirpalų ruošimą žr. I.6.2.

Sumaišykite 10 ml (a) tirpalo su 800 ml skiedimo vandens, įpilkite po 1 ml (b) – (d) tirpalų ir praskieskite skiedimo vandeniu iki 1 litro.

Šiame metode kaip sėjimo kultūra naudojama tik 0,5 ml ištakio/litre ir todėl gali tekti didinti terpės mikroelementų ir augimo faktorių koncentraciją. Tai daroma įpilant po 1 ml kiekvieno šių tirpalų vienam galutinio terpės tūrio litrui.

▼C1

Mikroelementų tirpalas:

Mangano sulfatas, tetrahidratas, $MnSO_4$. $4H_2O$	39,9 mg
Boro rūgštis, H_3BO_3	57,2 mg
Cinko sulfatas, heptahidratas, $ZnSO_4$. $7H_2O$	42,8 mg
Amonio heptamolibdatas, $(NH_4)_6$ MO_7O_{24}	34,7 mg
Fe-chelatas ($FeCl_3$ ir etilendiamintetraacto rūgštis)	100,0 mg
Ištirpinkite skiedimo vandenyje ir praskieskite juo iki 1 000 ml	

Vitaminų tirpalas:

Mielių ekstraktas	15,0 mg

Ištirpinkite mielių ekstraktą 100 ml vandens. Sterilizuokite filtruodami per 0,2 μm membraną arba pagaminkite šviežiai.

III.2.3. **Sėjimo kultūros ruošimas ir pradinis kondicionavimas**

Sėjimo kultūra ruošiama iš nuotekų valymo įrenginio arba laboratorinio valymo įrenginio, valančių daugiausia buitines nuotekas, antrinio ištakio. Žr. I.6.4.2. ir I.6.5.

Naudojama 0,5 ml vienam litrui mineralinės terpės.

III.2.4. **Kolbų ruošimas**

Pavyzdžiui, į atskiras 2 l kūgines kolbas įpilkite po 800 ml mineralinės terpės ir pakankamą tūrį bandomosios ir etaloninės medžiagos pradinių tirpalų, kad DOC koncentracija atitiktų 10–40 mg/l. Patikrinkite pH vertę ir prireikus nustatykite lygią 7,4. Įdėkite į kolbas 0,5 ml/l sėjimo kultūros iš nuotekų ištakio (žr. I.6.4.2). Taip pat paruoškite sėjimo kultūros tirpalo mineralinėje terpėje kontrolinį bandinį, kuriame nebūtų bandomosios arba etaloninės medžiagos.

Jei reikia, vieną indą naudokite tikrinti galimam bandomosios medžiagos inhibuojamajam veikimui, į panašios koncentracijos bandomosios ir etaloninės medžiagų tirpalą mineralinėje terpėje įdėję sėjimo kultūros. Be to, jei reikia, paruoškite dar vieną sterilią kolbą su chemine medžiaga be sėjimo kultūros, kad galėtumėte nustatyti, arba vyksta bandomosios medžiagos abiotinis skaidymas (žr. I.6.6.).

Papildomai, jei kyla įtarimas, kad bandomąją medžiagą labai adsorbuoja stiklas, dumblas ir t. t., atlikite parengiamąjį vertinimą galimam adsorbcijos laipsniui nustatyti ir, tuo pačiu, bandymo tinkamumui šiai cheminei medžiagai (žr. 1 lentelę). Paruoškite kolbą su bandomąja medžiaga, sėjimo kultūra ir sterilizavimo medžiaga.

Visus tirpalus kolbose skieskite mineraline terpe iki 1 l ir, tirpalus išmaišę, iš kiekvienos kolbos paimkite bandinį DOC pradinei koncentracijai nustatyti (žr. 2.4 priedėlį). Uždenkite kolbų angas,

pvz., aliuminio folija taip, kad tarp kolbos ir ją supančios aplinkos laisvai judėtų oras. Tuomet bandymui pradėti įstatykite kolbas į purtyklę.

▼C1

III.2.5. **Kolbų skaičius tipiniame bandyme**

1 ir 2 kolba: bandomoji suspensija

3 ir 4 kolba: sėjimo kultūros tuščiasis bandinys

5 kolba: metodikos tikrinimo bandinys

ir pageidautina bei kai būtina:

6 kolba: abiotinio skaidymo sterilus kontrolinis bandinys

7 kolba: adsorbcijos kontrolinis bandinys

8 kolba: toksiškumo kontrolinis bandinys

Žr. dar I.6.7.

III.2.6. **Bandymo procedūra**

Visą bandymą žinomais laiko intervalais, bet pakankamai dažnai, kad galima būtų nustatyti 10 parų lango pradžią ir procentinę šalinimo vertę 10 parų lango pabaigoje, nustatykite po du kartus DOC koncentracijas kiekvienoje kolboje. Imkite tik minimalų kiekvienam nustatymui reikalingą bandomosios suspensijos tūrį.

Jei būtina, prieš imdami bandinį kompensuokite garavimo iš kolbų nuostolius, įpildami reikiamą kiekį skiedimo vandens (I.6.1). Prieš imdami bandinį, gerai sumaišykite kultūros terpę ir užtikrinkite, kad prieš bandinio ėmimą ant kolbos sienelių prilipusi medžiaga būtų ištirpinta arba suspenduota. Paėmę bandinį, jį iš karto filtruokite per membraninį filtrą arba centrifuguokite (žr. 2.4 priedėlį). Nufiltruotus arba centrifuguotus bandinius analizuokite tą pačią dieną arba laikykite 2–4 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 48 h, jei ilgiau – žemesnėje kaip -18 °C temperatūroje.

III.3. DUOMENYS IR ATASKAITA

III.3.1. **Rezultatų apdorojimas**

Apskaičiuokite skaidymo procentinę vertę laiku t, kaip nurodyta I.7.1. (DOC nustatymas) ir, neprivalomai, kaip I.7.2 (specifinė analizė).

Visus rezultatus užrašykite pateiktose specifikacijose.

III.3.2. **Rezultatų tinkamumas**

Žr. I.5.2.

III.3.3. **Ataskaita**

Žr. I.8.

III.4. SPECIFIKACIJA

Toliau pateiktas specifikacijos pavyzdys.

MODIFIKUOTAS OECD ATRANKOS BANDYMAS

1. **LABORATORIJA**

2. **BANDYMO PRADŽIOS DATA**

▼C1

3. **BANDOMOJI MEDŽIAGA**

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija: … mg/l, kaip cheminės medžiagos

Pradinė koncentracija terpėje: … mg/l, kaip cheminės medžiagos

4. **SĖJIMO KULTŪRA**

Šaltinis:

Kaip apdorota:

Pradinis kondicionavimas, jei toks buvo:

Suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija reakcijos mišinyje: mg/l

5. **ANGLIES NUSTATYMAS**

Anglies analizatorius:

	Kolba Nr.		DOC (mg/l) po n parų				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Bandomoji cheminė medžiaga ir sėjimo kultūra	1	a_1					
		a_2					
		a, vidutinė vertė $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, vidutinė vertė $C_{b(t)}$					
Sėjimo kultūros tuščiasis bandinys be bandomosios medžiagos	3	C_1					
		C_2					
		C, vidutinė vertė $C_{c(t)}$,					
	4	d_1					
		d_2					
		d, vidutinė vertė $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \left(\frac{(C_{c(t)} + C_{d(t)})}{(2)}\right)$						

6. **NEAPDOROTŲ DUOMENŲ VERTINIMAS**

Kolba Nr.		Skaidymo % po n parų				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \left(\frac{(C_{a(t)} - C_{bl(t)})}{(C_{a(o)} - C_{bl(o)})}\right)\right) \times 100$	0				

▼C1

Kolba Nr.		Skaidymo % po n parų				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
2	$D_2 = \left(1 - \left(\frac{(C_{b(t)} - C_{bl(t)})}{(C_{b(o)} - C_{bl(o)})}\right)\right) \times 100$	0				
Vidutinė vertė (*)	$D = \left(\frac{(D_1 - D_2)}{(2)}\right)$	0				

(*) D_1 ir D_2 vidutinė vertė neturi būti skaičiuojama, jei tarp jų yra didelis skirtumas.

Pastaba. Panašūs formatai gali būti taikomi etaloninei medžiagai ir toksiškumo kontroliniams bandiniams.

7. **ABIOTINIO SKAIDYMO KONTROLINIS BANDINYS** (neprivalomas)

	Laikas (paros)	
	0	t
DOC koncentracija (mg/l) steriliame kontroliniame bandyme	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{abiotinio skaidymo } \% = \left(\frac{(C_{s(o)} - C_{s(t)})}{(C_{s(o)})} \times 100\right)$$

8. **SPECIFINĖ CHEMINĖ ANALIZĖ** (neprivaloma)

	Bandomosios medžiagos likutis bandymo pabaigoje (mg/l)	Pirminis suirimas, %
Sterilus kontrolinis bandinys	S_b	
Bandymo terpė su sėjimo kultūra	S_a	$\left(\left(\frac{(S_b - S_a)}{(S_b)}\right) \times 100\right)$

IV DALIS. **CO_2 IŠSISKYRIMO BANDYMAS** (C.4-C metodas)

IV.1. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Išmatuotas mineralinės terpės su sėjimo kultūra tūris, kuriame kaip vienintelis nominalus organinės anglies šaltinis yra žinomos koncentracijos bandomoji cheminė medžiaga (10–20 mg DOC arba TOC/l), tamsoje arba išsklaidytoje šviesoje yra aeruojamas, reguliuojamu greičiu barbotuojant anglies dioksido neturintį orą. Skaidymas 28 paras stebimas, nustatant susidariusio anglies dioksido, sugeriamo bario arba natrio hidroksidu, kiekį, matuojamą likusio hidroksido titravimu arba kaip neorganinė anglis. Iš bandomosios cheminės medžiagos susidariusio anglies dioksido kiekis (pataisytas atsižvelgiant į anglies dioksido, susidarančio tuščiajame bandinyje su sėjimo kultūra, kiekį) yra skaičiuojamas kaip procentinė $ThCO_2$ vertė. Kitaip biologinio skaidymo laipsnį galima skaičiuoti atliekant papildomą DOC analizę inkubavimo laikotarpio pradžioje ir pabaigoje.

▼C1

IV.2. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

IV.2.1. **Aparatūra**

a) 2–5 litrų talpos kolbos, kiekviena su aeravimo vamzdžiu, beveik siekiančiu indo dugną, ir išleidimo anga;

b) magnetiniai maišikliai, kai vertinamos mažai tirpios cheminės medžiagos;

c) dujų sugėrimo kolbos;

d) įtaisas reguliuoti ir matuoti oro srautą;

e) aparatas anglies dioksidui išplauti, kuriuo ruošiamas oras, neturintis anglies dioksido; pagal kitą būdą galima naudoti iš balionų tiekiamų CO_2 neturinčio deguonies ir CO_2 neturinčio azoto mišinį, dujas maišant teisingu santykiu (20 % O_2: 80 % N_2);

f) įtaisas anglies dioksidui nustatyti titravimo būdu arba kokio nors tipo neorganinės anglies analizatorius;

g) membraninio filtravimo įtaisas (neprivalomas);

h) DOC analizatorius (neprivalomas).

IV.2.2. **Mineralinės terpės ruošimas**

Apie pradinių tirpalų ruošimą žr. I.6.2.

Sumaišykite 10 ml (a) tirpalo su 800 ml skiedimo vandens, įpilkite po 1 ml (b) – (d) tirpalų ir praskieskite skiedimo vandeniu iki 1 litro.

IV.2.3. **Sėjimo kultūros ruošimas ir pradinis kondicionavimas**

Sėjimo kultūrą galima ruošti iš įvairių šaltinių: aktyvusis dumblas; nuotekų ištakiai; paviršiniai vandenys; dirvožemiai arba mišiniai iš šių šaltinių.

Žr. I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ir I.6.5.

IV.2.4. **Kolbų ruošimas**

Kaip pavyzdys, toliau nurodyti tūriai ir masės 5 litrų kolboms su 3 l suspensijos. Jei naudojate mažesnius tūrius, kiekius atitinkamai keiskite, tačiau užtikrinkite, kad būtų galima tiksliai matuoti susidariusio anglies dioksido kiekį.

Į kiekvieną 5 litrų kolbą įpilkite 2 400 ml mineralinės terpės. Įpilkite atitinkamą tūrį paruošto aktyviojo dumblo (žr. I.6.4.1 ir I.6.5), kad suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija mišinio su sėjimo kultūra galutiniame 3 l tūryje būtų ne didesnė kaip 30 mg/l. Kitas būdas, kai paruoštas dumblas iš pradžių skiedžiamas mineralinėje terpėje ruošiant 500–1 000 mg/l suspensiją, po to alikvotinis šios suspensijos tūris pilamas į 5 litrų kolbos turinį, kad koncentracija būtų 30 mg/l; tai užtikrina didesnį preciziškumą. Galima naudoti kitus sėjimo kultūros šaltinius (žr. I.6.4.2).

Per naktį šiuos mišinius su sėjimo kultūra aeruokite CO_2 neturinčiu oru, kad iš sistemos būtų išvalytas anglies dioksidas.

▼C1

Į lygiagrečiam bandymui skirtas kolbas atskirai įpilkite bandomosios ir etaloninės medžiagų žinomus pradinių tirpalų tūrius, kad dėl įdėtų cheminių medžiagų būtų gautos nuo 10 iki 20 mg DOC arba TOC/l koncentracijos; į kai kurias kolbas cheminių medžiagų nedėkite, bet palikite jas kaip sėjimo kultūros kontrolinius bandinius. Mažai tirpias medžiagas dėkite tiesiai į kolbas, remdamiesi mase arba tūriu, arba darykite, kaip aprašyta 3 priedėlyje.

Jei reikia, vieną kolbą naudokite bandomosios cheminės medžiagos galimam inhibuojamajam veikimui tikrinti, įdėdami į ją ir bandomosios, ir etaloninės cheminės medžiagos, kurių koncentracija būtų tokia pat, kaip ir kitose kolbose.

Be to, jei reikia patikrinti, arba nevyksta bandomosios cheminės medžiagos abiotinis skaidymas, turėkite sterilią kolbą su bandomąja chemine medžiaga be sėjimo kultūros (žr. I.6.6). Sterilizuokite įdėdami atitinkamos koncentracijos nuodingos medžiagos.

Suspensijas visose kolbose skieskite iki 3 litrų, įpildami mineralinės terpės, prieš tai aeruojamos CO_2 neturinčiu oru. Neprivaloma, bet galima siurbti bandinius DOC analizei (žr. 2.4 priedėlį) ir (arba) specifinei analizei. Prie kolbų oro išleidimo angų prijunkite dujų sugėrimo kolbas.

Jei naudojamas bario hidroksidas, prie kiekvienos 5 1 kolbos nuosekliai prijunkite po tris dujų sugėrimo kolbas, kurių kiekvienoje būtų 100 ml 0,0125 M bario hidroksido tirpalo. Tirpale neturi būti sulfato ir karbonato nuosėdų ir jo koncentracija turi būti nustatyta prieš pat tirpalo naudojimą. Jei naudojamas natrio hidroksidas, junkite dvi gaudykles, iš kurių antroji būtų kontrolinė, siekiant įrodyti, kad visas anglies dioksidas buvo absorbuotas pirmoje gaudyklėje. Tinka dujų sugėrimo kolbos, uždarytos serumo butelių dangčiais. Į kiekvieną kolbą įpilkite 200 ml 0,05 M natrio hidroksido tirpalo, kurio pakanka sugerti visą kiekį anglies dioksido, išsiskyrusio visiškai suskaidant bandomąją medžiagą. Natrio hidroksido tirpalas, net šviežiai paruoštas, turi karbonatų pėdsakus; pataisa padaroma atimant tuščiajame bandinyje susidariusio karbonato kiekį.

IV.2.5. **Kolbų skaičius tipiniame bandyme**

1 ir 2 kolba: bandomoji suspensija

3 ir 4 kolba: sėjimo kultūros tuščiasis bandinys

5 kolba: metodikos tikrinimo bandinys

ir pageidautina bei kai būtina:

6 kolba: abiotinio skaidymo sterilus kontrolinis bandinys

7 kolba: toksiškumo kontrolinis bandinys

Žr. dar I.6.7.

IV.2.6. **Bandymo procedūra**

Pradėkite bandymą, per suspensijas barbotuodami 30–100 ml/min oro be CO_2 srautą. CO_2 nustatyti periodiškai imkite anglies dioksido absorbento bandinius. Norint identifikuoti 10 parų lango periodą, rekomenduojama pirmąsias dešimt dienų analizę atlikti kas antrą arba kas trečią dieną, o po to iki 28 paros – kas penktą dieną.

▼C1

28 parą paimkite bandinius (neprivalomai) DOC ir (arba) specifinei analizei, išmatuokite suspensijų pH vertes ir į kiekvieną kolbą įpilkite 1 ml koncentruotos druskos rūgšties; aeruokite kolbas per naktį, kad iš bandomųjų suspensijų būtų pašalintas anglies dioksidas. 29 parą atlikite paskutinę išsiskyrusio anglies dioksido analizę.

CO_2 matavimo dieną atjunkite arčiausiai kolbos prijungtą absorberį su bario hidroksidu, ir titruokite bario hidroksido tirpalą 0,05 M HC1 tirpalu, indikatoriumi naudodami fenolftaleiną. Perkelkite likusius absorberius per vieną vietą arčiau kolbos ir kitame nuosekliai sujungtų absorberių gale prijunkite naują absorberį su 100 ml šviežio 0,0125 M bario hidroksido. Titruokite, kai tai būtina, pvz., kai pirmojoje gaudyklėje matyti daug nuosėdų, bet jų dar nėra antroje, arba bent kartą per savaitę. Kitu atveju, jei absorbentu naudojamas NaOH, švirkštu iš arčiau kolbos stovinčio absorberio paimkite mažą natrio hidroksido tirpalo bandinį (tai priklauso nuo naudojamo anglies analizatoriaus charakteristikų). Purkškite bandinį į anglies analizatoriaus IC dalį, kad galėtumėte tiesiogiai nustatyti išsiskyrusį anglies dioksidą.

Antrosios gaudyklės turinį analizuokite tik bandymo pabaigoje, kad būtų galima padaryti pataisą dėl galimo anglies dioksido išnešimo.

IV.3. DUOMENYS IR ATASKAITA

IV.3.1. **Rezultatų apdorojimas**

Absorberyje titruojant sugerto CO_2 kiekis nustatomas pagal tokią formulę:

$$\text{mg } CO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

čia:

V = 100 ml absorberio turinio titruoti sunaudotos HC1 tūris (ml)

C_B = bario hidroksido tirpalo koncentracija (M)

C_A = druskos rūgšties tirpalo koncentracija (M)

jei C_B lygi 0,0125 M ir C_A lygi 0,05 M, 100 ml bario hidroksido tirpalui titruoti reikia 50 ml, ir CO_2 masė nustatoma pagal lygtį:

$$\left(\frac{(0{,}05)}{(2)}\right) \times (44 \times \text{ml HCI sunaudoto titravimui}) = 1{,}1 \times \text{ml HCI}$$

Taigi šiuo atveju titravimui sunaudoto HC1 tūrio perskaičiavimo į susidariusio CO_2 mg faktorius yra 1,1.

Naudodami atitinkamas titravimo vertes, apskaičiuokite vien iš sėjimo kultūros bei iš sėjimo kultūros ir bandomosios cheminės medžiagos gauto CO_2 mases, ir šių masių skirtumas yra masė CO_2, susidariusio vien tik iš bandomosios cheminės medžiagos.

Pavyzdžiui, jei vien tik sėjimo kultūros bandinio titravimas duoda 48 ml, o sėjimo terpės ir bandomosios cheminės medžiagos bandinio titravimas duoda 45 ml,

$$CO_2 \text{ iš sėjimo kultūros} = 1{,}1 \times (50–48) = 2{,}2 \text{ mg}$$

▼C1

CO_2 iš sėjimo kultūros ir bandomosios cheminės medžiagos = 1,1 x (50–45) = 5,5 mg

taigi, iš bandomosios cheminės medžiagos susidariusio CO_2 masė lygi 3,3 mg.

Procentinė biologinio skaidymo vertė skaičiuojama pagal formulę:

$$\text{skaidymo \%} = \left(\frac{(\text{mg } CO_2\text{išsiskyrusio} \times 100)}{(ThCO_2 \times \text{mg pridėtos bandomosios cheminės medžiagos})}\right)$$

arba,

$$\text{skaidymo \%} = \left(\frac{(\text{mg } CO_2\text{išsiskyrusio} \times 100)}{(\text{pridėtos bandyme TOC kiekis (mg)} \times 3{,}67)}\right)$$

3,67 yra anglies masės perskaičiavimo į anglies dioksido masę (44/12) faktorius.

Skaidymo po bet kurio laiko intervalo procentinę vertę gaukite pridėdami procentines $ThCO_2$ vertes, apskaičiuotas kiekvienai parai, iki to laiko, kuriuo jis buvo išmatuotas.

Absorberiams su natrio hidroksidu susidariusio anglies dioksido kiekį, išreikštą IC (mg), skaičiuokite daugindami IC koncentraciją absorbente iš absorbento tūrio.

Procentinę skaidymo vertę skaičiuokite pagal:

$$\%\text{ of } ThCO_2 = \left(\frac{(\text{IC kolboje su bandomą medžiaga (mg)} - \text{IC kolboje su tuščiuoju bandiniu (mg)})}{(\text{TOC, pridėtos kaip bandomoji medžiaga, masė (mg)})}\right) \times 100$$

Apskaičiuokite DOC šalinimą (neprivaloma), kaip aprašyta I.7. Užrašykite šiuos ir visus kitus rezultatus pridėtose specifikacijose.

IV.3.2. **Rezultatų tinkamumas**

Bandomosios cheminės medžiagos suspensijos mineralinėje terpėje IC kiekis bandymo pradžioje turi būti mažesnis kaip 5 % TC, ir tuščiajame bandinyje bandymo pabaigoje viso išsiskyrusio CO_2 kiekis paprastai neturi būti didesnis kaip 40 mg/l terpės. Jei gaunamos didesnės kaip 70 mg CO_2/litre vertės, duomenys ir eksperimento metodika turi būti kritiškai ištirti.

Žr. dar I.5.2.

IV.3.3. **Ataskaita**

Žr. I.8.

IV.4. SPECIFIKACIJA

ANGLIES DIOKSIDO IŠSISKYRIMO BANDYMAS

1. **LABORATORIJA**

2. **BANDYMO PRADŽIOS DATA**

3. **BANDOMOJI MEDŽIAGA**

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija: … mg/l, kaip cheminės medžiagos

▼C1

Pradinė koncentracija terpėje: … mg/l, kaip cheminės medžiagos

Bendras į kolbą įdėtos C kiekis: … mg C

$ThCO_2$: mg CO_2

4. **SĖJIMO KULTŪRA**

Šaltinis:

Kaip apdorota:

Pradinis kondicionavimas, jei toks buvo:

Suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija reakcijos mišinyje: mg/l

5. **ANGLIES DIOKSIDO SUSIDARYMAS IR SKAIDUMAS**

Metodas: $Ba(OH)_2$/NaOH/kitas

Laikas (paros)	Bandinyje susidaręs CO_2 (mg)		Tuščiajame bandinyje susidaręs CO_2 (mg)		Bendras susidaręs CO_2 (mg) (bandinio vidutinė vertė atėmus tuščiojo bandinio vidutinę vertę)		$ThCO_2$ bendras $\left(\frac{(CO_2)}{(ThCO_2)}\right) \times 100$		
	1 / 2	vidutinė vertė	3 / 4	vidutinė vertė	1	2	1	2	vidutinė vertė
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Pastaba. Panašūs formatai gali būti taikomi etaloninei medžiagai ir

toksiškumo kontroliniams bandiniams.

6. **ANGLIES ANALIZĖ** (neprivaloma)

Anglies analizatorius:

Laikas (paros)	Tuščiasis bandinys, mg/l	Bandomoji cheminė medžiaga, mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_0
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) Arba inkubavimo pabaigoje

▼C1

$$\text{pašalintos DOC \%} = \left(1 - \frac{(C_t - C_{b(t)})}{(C_t - C_{b(o)})}\right) \times 100$$

7. **ABIOTINIS SKAIDYMAS** (neprivalomas)

$$\text{abiotinio skaidymo \%} = \left(\frac{(CO_2\text{susidaręs CO sterilioje kolboje po 28 parų})}{(ThCO_2(\text{mg}))}\right) \times 100$$

V DALIS. **MANOMETRINIS RESPIROMETRINIS BANDYMAS** (C.4-D metodas)

V.1. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Išmatuotas mineralinės terpės su sėjimo kultūra tūris, turintis žinomos koncentracijos bandomąją cheminę medžiagą (100 mg/litre bandomosios medžiagos, duodančios bent 50–100 mg ThOD/l), kuri nominaliai yra vienintelis organinės anglies šaltinis, pastovioje temperatūroje (± 1 °C arba tiksliau) maišomas uždaroje kolboje iki 28 parų. Deguonies suvartojimas nustatomas arba matuojant deguonies (elektrolitiškai pagaminto) kiekį, kurio reikia pastoviam dujų tūriui respirometro kolboje palaikyti, arba pagal tūrio arba slėgio (arba abiejų kartu) kitimą aparate. Išsiskyręs anglies dioksidas sugeriamas kalio hidroksido tirpalu arba kitu tinkamu absorbentu. Bandomosios cheminės medžiagos suvartoto deguonies kiekis (pataisytas atsižvelgiant į deguonies, suvartoto lygiagrečiai atliekamame tuščiajame bandyme su sėjimo kultūra, kiekį) yra reiškiamas procentine ThOD arba COD verte. Neprivalomai, iš papildomos specifinės analizės, atliekamos inkubavimo pradžioje ir pabaigoje, duomenų galima apskaičiuoti pirminį biologinį skaidymą, o atliekant DOC analizę – biologinį suskaidymą.

V.2. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

V.2.1. **Aparatūra**

a) tinkamas respirometras;

b) termostatas, palaikantis temperatūrą ± 1 °C tikslumu arba geriau;

c) membraninio filtravimo įtaisas (neprivalomas);

d) anglies analizatorius (neprivalomas).

V.2.2. **Mineralinės terpės ruošimas**

Apie pradinių tirpalų ruošimą, žr. I.6.2.

Sumaišykite 10 ml (a) tirpalo su 800 ml skiedimo vandens, įpilkite po 1 ml (b) – (d) tirpalų ir praskieskite skiedimo vandeniu iki 1 litro.

V.2.3. **Sėjimo kultūros ruošimas ir pradinis kondicionavimas**

Sėjimo kultūrą galima ruošti iš įvairių šaltinių: aktyvusis dumblas; nuotekų ištakiai; paviršiniai vandenys; dirvožemiai arba mišiniai iš šių šaltinių.

Žr. I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ir I.6.5.

V.2.4. **Kolbų ruošimas**

Mineraline terpe skiesdami pradinius tirpalus, ruoškite atskiras serijas bandomosios ir etaloninės cheminių medžiagų tirpalų, kuriuose cheminės medžiagos koncentracija paprastai būtų 100 mg/litre (gauti ThOD bent 50–100 mg/l).

▼C1

ThOD skaičiuokite pagal amonio druskų susidarymą, jei nesitikite nitrifikavimo, kai skaičiuoti reikia pagal nitratų susidarymą (žr. 2.2 priedėlį).

Nustatykite pH vertes ir prireikus nustatykite 7,4 ± 0,2.

Mažai tirpios medžiagos turi būti pridedamos vėlesnėje pakopoje (žr. toliau).

Jei reikia nustatyti bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą, ruoškite dar vieną tirpalą mineralinėje terpėje, kuriame būtų ir bandomoji ir etaloninė medžiagos tokios koncentracijos, kokios yra atskiruose tirpaluose.

Jei reikia matuoti fizikocheminį deguonies suvartojimą, ruoškite bandomosios cheminės medžiagos tirpalą, paprastai 100 mg ThOD/-litre, kuris buvo sterilizuotas pridedant tinkamos nuodingos medžiagos (žr. I.6.6).

Įpilkite reikiamus bandomosios ir etaloninės medžiagos tirpalų tūrius, atitinkamai, bent į dvi kolbas. Į kitas kolbas įpilkite tik mineralinės terpės (sėjimo kultūros kontroliniai bandiniai) ir, jei reikia, maišytą bandomosios ir etaloninės cheminių medžiagų tirpalą ir sterilų tirpalą.

Jei bandomoji medžiaga mažai tirpi, dėkite jos pagal masę arba tūrį tiesiai šioje pakopoje arba apdorokite, kaip aprašyta 3 priedėlyje. Į CO_2 absorberio sekcijas įpilkite kalio hidroksido, natrio kalkių granulių arba kito absorbento.

V.2.5. **Kolbų skaičius tipiniame bandyme**

1 ir 2 kolba: bandomoji suspensija

3 ir 4 kolba: sėjimo kultūros tuščiasis bandinys

5 kolba: metodikos tikrinimo bandinys

ir pageidautina bei kai būtina:

6 kolba: sterilus kontrolinis bandinys

7 kolba: toksiškumo kontrolinis bandinys

Žr. dar I.6.7.

V.2.6. **Bandymo procedūra**

Leiskite kolboms pasiekti tinkamą temperatūrą ir į atitinkamas kolbas įdėkite tiek sėjimo kultūros iš paruošto aktyviojo dumblo arba kitokio jos šaltinio, kad suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija būtų ne didesnė kaip 30 mg/litre. Surinkite įrangą, įjunkite purtyklę, patikrinkite hermetiškumą ir pradėkite matuoti deguonies suvartojimą. Paprastai toliau prižiūrėti nereikia, išskyrus tai, kad reikia užrašyti būtinus rodmenis ir atlikti kasdienius tikrinimus norint įsitikinti, kad palaikoma teisinga temperatūra ir tinkamas maišymas.

Pagal dažnai ir reguliariais intervalais užrašomus rodmenis skaičiuokite deguonies suvartojimą, taikydami įrangos gamintojo nurodytus metodus. Inkubavimo pabaigoje, paprastai po 28 parų, matuokite kolbų turinio pH, ypač jei deguonies suvartojimas yra mažas arba didesnis nei $ThODN_{H4}$ (azoto turintiems junginiams).

▼C1

Jei reikia, bandymo pradžioje ir pabaigoje iš respirometrinių kolbų paimkite bandinius DOC analizei arba specifinei cheminei analizei (žr. 2.4 priedėlį). Imdami bandymo pradžioje užtikrinkite, kad kolboje likusios bandomosios suspensijos tūris būtų žinomas. Kai deguonį vartoja azoto turinti bandomoji medžiaga, nustatykite nitrito ir nitrato koncentracijos didėjimą per 28 paras ir apskaičiuokite pataisą dėl deguonies, suvartoto nitrifikavimui (5 priedėlis).

V.3. DUOMENYS IR ATASKAITA

V.3.1. **Rezultatų apdorojimas**

Padalinkite kiekį (mg) deguonies, suvartoto bandomosios cheminės medžiagos per tam tikrą laiką (pataisytą atsižvelgiant į deguonies, suvartoto per tą patį laiką tuščiajame sėjimo kultūros kontroliniame bandinyje, kiekį) iš paimtos bandomosios cheminės medžiagos masės. Taip gausite BOD, skaičiuojamą mg deguonies/mg bandomosios cheminės medžiagos, taigi:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{O}_2 \text{ suvartojimas bandomąja chemine medžiaga (mg)} - \text{O}_2 \text{ suvartojimas tuščiagame bandinyje (mg)})}{(\text{bandomosios medžiagos kolboje (mg)})}$$

$$= \text{mg O}_2 \text{ vienam mg bandomosios cheminės medžiagos}$$

biologinio skaidymo procentinę vertę skaičiuokite pagal:

$$\text{biologinio skaidymo \%} = \text{\% ThOD} = \left(\frac{(\text{BOD}(\text{mg O}_2/\text{mg cheminės medžiagos}))}{(\text{ThOD}(\text{mg O}_2 \text{ cheminei medžiagai}))} \right) \times 100$$

arba pagal:

$$\text{\% COD} = \left(\frac{(\text{BOD}(\text{mg O}_2/\text{mg cheminės medžiagos}))}{(\text{COD}(\text{mg O}_2 \text{ cheminės medžiagos}))} \right) \times 100$$

Reikia pažymėti, kad šie du metodai nebūtinai duoda tą pačią vertę; geriau naudoti pirmesnį metodą.

Azoto turinčioms bandomosioms medžiagoms naudokite atitinkamas ThOD vertes (NH_4 arba NO_3) pagal tai, kas yra žinoma apie nitrifikavimo galimybę arba ko iš jo laukiama (2.2 priedėlis). Jei nitrifikavimas vyksta, tačiau ne iki galo, pataisas nitrifikuoti suvartotam deguoniui skaičiuokite pagal nitrito ir nitrato koncentracijų pokyčius (5 priedėlis).

Kai atliekama neprivaloma organinės anglies ir (arba) specifinė analizė, apskaičiuokite skaidymo procentinę vertę, kaip tai aprašyta I.7.

Visus rezultatus užrašykite į pridedamas specifikacijas.

V.3.2. **Rezultatų tinkamumas**

Paprastai deguonies suvartojimas sėjimo kultūros tuščiajame bandinyje per 28 paras yra 20–30 mg O_2/l ir neturi būti didesnis kaip 60 mg/l. Jei vertės didesnės kaip 60 mg/l, būtina kritiškai ištirti duomenis ir eksperimento metodikas. Jei pH vertė nepatenka į 6–8,5 intervalą, o bandomoji medžiaga deguonies suvartoja mažiau kaip 60 %, bandymas turi būti pakartotas su mažesne bandomosios cheminės medžiagos koncentracija.

Žr. dar I.5.2.

▼C1

V.3.3. **Ataskaita**

Žr. I.8.

V.4. **SPECIFIKACIJA**

Toliau pateiktas specifikacijos pavyzdys.

MANOMETRINĖS RESPIROMETRIJOS BANDYMAS

1. **LABORATORIJA**

2. **BANDYMO PRADŽIOS DATA**

3. **BANDOMOJI MEDŽIAGA**

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija: … mg/l

Pradinė koncentracija terpėje, C_0: … mg/l

Tūris bandymo kolboje (V): … ml

ThOD arba COD: … mg O_2/mg bandomosios medžiagos (NH_4 arba NO_3)

4. **SĖJIMO KULTŪRA**

Šaltinis:

Kaip apdorota:

Pradinis kondicionavimas, jei toks buvo:

Suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija reakcijos mišinyje: … mg/l

5. **DEGUONIES SUVARTOJIMAS. BIOLOGINIS SKAIDUMAS**

		Laikas (paros)											
		0		7		14			21			28	
O_2 suvartojimas. (mg) bandomoji cheminė medžiaga	1												
	2												
	a, vidutinė vertė												
O_2 suvartojimas (mg) tuščiasis bandinys	3												
	4												
	b, vidutinė vertė												
Pataisyta BOD vertė (mg)	(a_1- b_m)												
	(a_2- b_m)												
BOD vienam mg bandomosios cheminės medžiagos	$\frac{(a_1 - b)}{(C_o V)}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{(C_o V)}$												

▼C1

		Laikas (paros)											
		0		7		14			21			28	
Skaidymo % $\left(\frac{(BOD)}{(ThOD)}\right) \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	vidutinė vertė (*)												

V = terpės tūris bandymo kolboje
(*) D_1 ir D_2 vidutinė vertė neturi būti skaičiuojama, jei tarp verčių yra didelis skirtumas.

Pastaba. Panašūs formatai gali būti taikomi etaloninei medžiagai ir toksiškumo kontroliniams bandiniams.

6. **PATAISA DĖL NITRIFIKAVIMO** (žr. 5 priedėlį)

Para		0	28	Skirtumas
i)	Nitrato koncentracija (mg N/l)			(N)
ii)	Deguonies ekvivalentas (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
iii)	Nitrito koncentracija (mg N/l)			(N)
iv)	Deguonies ekvivalentas (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
ii + iv)	Bendrasis deguonies ekvivalentas	—	—	

7. **ANGLIES ANALIZĖ** (neprivaloma)

Anglies analizatorius:

Laikas (paros)	Tuščiasis bandinys, mg/l	Bandomoji cheminė medžiaga, mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_0
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) Arba inkubavimo pabaigoje.

$$\text{DOC pašalinimas \%} = \left(1 - \left(\frac{(C_t - C_{blt})}{(C_o - C_{blo})}\right)\right) \times 100$$

8. **SPECIFINĖ CHEMINĖ ANALIZĖ** (neprivaloma)

S_b = koncentracija fizikocheminių procesų (steriliame) kontroliniame bandinyje po 28 parų

S_a = koncentracija kolboje su sėjimo kultūra po 28 parų.

$$\text{biologinio skaidymo \%} = \left(\frac{(S_b - S_a)}{(S_b)}\right) \times 100$$

9. **ABIOTINIS SKAIDYMAS** (neprivalomas)

a = deguonies suvartojimas steriliose kolbose po 28 parų (mg)

$$\text{deguonies suvartojimas mg bandomosios cheminės medžiagos} = \frac{(a \times 100)}{(C_o V)}$$

▼C1

(žr. 1 ir 3 skirsnius)

$$\text{abiotinio skaidymo } \% = \frac{(a \times 100)}{(C_o V \times ThOD)}$$

VI DALIS. **UŽDAROSIOS KOLBOS BANDYMAS** (C.4-E metodas)

VI.1 BANDYMO METODO PRINCIPAS

Į bandomosios cheminės medžiagos tirpalą mineralinėje terpėje, paprastai 2–5 mg/l, dedama sėjimo kultūra, turinti palyginti mažai mikroorganizmų iš mišrios populiacijos, ir tirpalas laikomas tamsoje visiškai pilnose ir uždarytose kolbose pastovios temperatūros sąlygomis. Skaidymas sekamas 28 paras analizuojant ištirpusį deguonį. Bandomosios medžiagos suvartotas deguonies kiekis, pakoregavus atsižvelgiant į deguonies, suvartoto lygiagrečiai atliekamame tuščiajame bandyme su sėjimo kultūra, kiekį, yra išreikiamas procentine ThOD arba COD verte.

VI.2. METODO APRAŠYMAS

VI.2.1. **Aparatūra**

a) BOD kolbos su šlifo kamščiais, pvz., 250–300 ml;

b) vandens vonia arba inkubatorius kolboms laikyti pastovioje temperatūroje (± 1 °C arba geriau) ir be apšvietimo;

c) didelės stiklinės kolbos (2–5 litrų) terpei ruošti ir BOD kolboms pildyti;

d) deguonies elektrodas ir matuoklis, arba įranga ir reagentai titruoti Winklerio metodu.

VI.2.2. **Mineralinės terpės ruošimas**

Apie pradinių tirpalų ruošimą žr. I.6.2.

Sumaišykite po 1 (vieną) ml (a) – (d) tirpalų ir praskieskite skiedimo vandeniu iki 1 litro.

VI.2.3. **Sėjimo kultūros ruošimas**

Sėjimo kultūra paprastai gaunama iš nuotekų valymo įrenginio arba laboratorinio valymo įrenginio, į kuriuos daugiausia patenka buitinės nuotekos, antrinio ištakio. Alternatyvus sėjimo kultūros šaltinis yra paviršinis vanduo. Paprastai 1 litrui terpės naudokite nuo vieno lašo (0,05 ml) iki 5 ml filtrato; gali tekti atlikti bandymus, kad galėtumėte nustatyti tam tikram ištakiui optimalų tūrį (žr. I.6.4.2 ir I.6.5).

VI.2.4. **Kolbų ruošimas**

Stipriai aeruokite mineralinę terpę bent 20 min. Atlikite kiekvieną bandymų grupę su mineraline terpe, gauta vienos partijos. Dažniausiai terpė yra tinkama naudoti po 20 h laikymo bandymo temperatūroje. Kontrolės tikslams nustatykite ištirpusio deguonies koncentraciją; jos vertė 20 °C temperatūroje turi būti apie 9 mg/l. Visus oru prisotintos terpės pernešimo ir užpildymo veiksmus atlikite neleisdami susidaryti oro burbuliukams, pvz., naudodami sifonus.

▼C1

Paruoškite lygiagrečias BOD kolbų grupes bandomajai ir etaloninei cheminei medžiagai nustatyti tuo pat metu daromų eksperimentų serijose. Surinkite pakankamą skaičių BOD kolbų, įskaitant kolbas tuščiajam bandiniui su sėjimo kultūra, kad galėtumėte daryti bent po du deguonies suvartojimo matavimus norimais laiko tarpais, pvz., po 0, 7, 14, 21 ir 28 parų. Norint užtikrinti galimybę identifikuoti 10 parų langą, kolbų gali reikėti daugiau.

Į dideles kolbas įpilkite visiškai aeruotos mineralinės terpės, kad ji užimtų maždaug trečdalį kolbos tūrio. Tuomet į atskiras dideles kolbas įpilkite pakankamą kiekį bandomosios ir etaloninės cheminių medžiagų pradinių tirpalų taip, kad galutinė cheminių medžiagų koncentracija paprastai būtų ne didesnė kaip 10 mg/litre. Į vieną didelę kolbą su tuščiojo kontrolinio bandinio terpe cheminių medžiagų nedėkite.

Norint užtikrinti, kad sėjimo kultūros aktyvumas nebūtų ribojamas, ištirpusio deguonies koncentracija BOD kolbose neturi sumažėti daugiau kaip iki 0,5 mg/litre. Tai nustato maždaug 2 mg/litre ribą tiriamosios cheminės medžiagos koncentracijai. Tačiau sunkiai skaidomų junginių ir tų junginių, kurių ThOD mažas, koncentracija gali būti 5–10 mg/l. Kai kuriais atvejais būtų patartina atlikti lygiagrečias bandymų serijas su dviem bandomosios cheminės medžiagos koncentracijomis, pvz., 2 ir 5 mg/l. Paprastai ThOD skaičiuokite pagal amonio druskų susidarymą, tačiau, jei manoma arba žinoma, kad gali vykti nitrifikavimas, skaičiuokite remdamiesi nitrato susidarymu ($ThOD_{NO3}$: žr. 2.2 priedėlį). Jei nitrifikavimas vyksta, tačiau ne iki galo, pataisas nitrifikuoti suvartotam deguoniui skaičiuokite pagal nitrito ir nitrato koncentracijų pokyčius (žr. 5 priedėlį).

Jei turi būti ištirtas bandomosios medžiagos toksiškumas (pvz., jei anksčiau buvo nustatytos mažos biologinio skaidumo vertės), reikia turėti dar vieną kolbų seriją.

Paruoškite dar vieną didelę kolbą, kurioje būtų aeruota mineralinė terpė (maždaug trečdalis kolbos tūrio) ir bandomoji bei etaloninė cheminės medžiagos, kurių galutinė koncentracija būtų tokia pati, kaip ir kitose didelėse kolbose.

Į tirpalus didelėse kolbose įpilkite sėjimo kultūros iš antrinio ištakio (nuo vieno lašo arba apie 0,05 ml iki 5 ml/l) arba iš kito šaltinio, pvz., upės vandens (žr. I.6.4.2). Pabaigoje tirpalus skieskite aeruota mineraline terpe iki žymės ant kolbos, naudodami į jos dugną nuleistą žarną, kad būtų atitinkamas maišymas.

VI.2.5. **Kolbų skaičius tipiniame bandyme**

Tipiniame bandyme naudojamos tokios kolbos:

— bent 10 su bandomąja chemine medžiaga ir sėjimo kultūra (bandomoji suspensija),

— bent 10 tik su sėjimo kultūra (tuščiasis sėjimo kultūros bandinys),

— bent 10 su etalonine chemine medžiaga ir sėjimo kultūra (metodikos tikrinimo bandinys),

▼C1

— ir, kai būtina, 6 kolbos su bandomąja chemine medžiaga, etalonine chemine medžiaga ir sėjimo kultūra (toksiškumo kontrolinis bandinys). Tačiau, norint užtikrinti galimybę identifikuoti 10 parų langą, kolbų reikėtų maždaug du kartus daugiau.

VI.2.6. Bandymo procedūra

Naudodami žarną, nuleistą į apatinį atitinkamos didelės kolbos ketvirtį (ne į dugną), iš karto išpilstykite kiekvieną paruoštą tirpalą į atitinkamą BOD kolbų grupę taip, kad visos BOD kolbos būtų visiškai užpildytos. Švelniai patapšnokite kolbas, kad būtų pašalinti visi oro burbuliukai. Neatidėliojant nustatykite pradinę ištirpusio deguonies koncentraciją kolbose, taikydami Winklerio arba elektrodo metodą. Kolbų turinį galite išsaugoti vėlesnei analizei Winklerio metodu, pridėdami mangano (II) sulfato ir natrio hidroksido (pirmasis Winklerio reagentas). Gerai užkimštas kolbas su deguonimi, surištu į rudą mangano (III) hidratuotą oksidą, laikykite tamsoje 10–20 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 24 valandas prieš atlikdami likusius veiksmus pagal Winklerio metodą. Likusias lygiagrečiai paruoštas kolbas užkimškite taip, kad į jas nepatektų oro burbuliukų, ir inkubuokite tamsoje 20 °C temperatūroje. Kiekvieną seriją turi lydėti pilna lygiagreti serija, skirta tuščiojo bandinio terpės su sėjimo kultūra analizei. Paimkite iš kiekvienos serijos bent po dvi kolbas ištirpusio deguonies analizei tam tikrais laiko tarpais (bent kas savaitę) per 28 inkubavimo paras.

Savaitiniai bandiniai turi leisti įvertinti šalinimo procentinę vertę 14 parų lange, tuo tarpu bandinių analizė kas 3–4 paras turi leisti identifikuoti 10 parų langą, o tam reikėtų maždaug du kartus daugiau kolbų.

Azoto turinčioms bandomosioms medžiagoms turi būti daroma pataisa dėl deguonies suvartojimo bet kokiame nitrifikavimo procese. Tam padaryti taikykite O_2-elektrodo metodą ištirpusio deguonies koncentracijai nustatyti, o po to iš BOD kolbos paimkite bandinį nitrito ir nitrato analizei. Pagal nitrito ir nitrato koncentracijos padidėjimą apskaičiuokite suvartotą deguonį (žr. 5 priedėlį).

VI.3. DUOMENYS IR ATASKAITA

VI.3.1. **Rezultatų apdorojimas**

Iš pradžių apskaičiuokite BOD, kuris pasireiškia per kiekvieną laiko periodą, atimdami deguonies suvartojimo tuščiajame bandinyje vertę (mg O_2/litre) iš deguonies suvartojimo bandomąja medžiaga. Gauti savitajai BOD vertei, skaičiuojamai mg deguonies vienam mg bandomosios cheminės medžiagos, šią pataisytą suvartojimo vertę dalinkite iš bandomosios medžiagos koncentracijos (mg/litre). Biologinio skaidumo procentinę vertę skaičiuokite dalindami savitąjį BOD iš savitojo ThOD (apskaičiuoto pagal 2.2 priedėlį) arba COD (nustatyto analizės būdu, žr. 2.3 priedėlį), taigi:

$$\text{BOD} = \left(\frac{(\text{O}_2 \text{ suvartojimas bandomąja chemine medžiaga (mg)} - \text{O}_2 \text{ suvartojimas tuščiajame bandinyje (mg)})}{(\text{bandomosios medžiagos kiekis kolboje (mg)})} \right)$$

▼C1

= kiekis O_2 (mg) vienam mg bandomosios cheminės medžiagos

$$\text{Skaidymo \%} = \left(\frac{(\text{BOD (mg } O_2/\text{mg bandomosios cheminės medžiagos}))}{(\text{ThOD(mg } O_2/\text{mg bandomosios cheminės medžiagos}))}\right) \times 100$$

Arba

$$\text{Skaidymo \%} = \left(\frac{(\text{BOD (mg } O_2/\text{mg bandomosios cheminės medžiagos}))}{(\text{COD(mg } O_2/\text{mg bandomosios cheminės medžiagos}))}\right) \times 100$$

Reikia pažymėti, kad šie du metodai nebūtinai duoda tą pačią vertę; geriau naudoti pirmesnį metodą.

Azoto turinčioms medžiagoms naudokite atitinkamas ThOD vertes (NH_4 arba NO_3) pagal tai, kas yra žinoma apie nitrifikavimo galimybę arba ko iš jo laukiama (2.2 priedėlis). Jei nitrifikavimas vyksta, tačiau ne iki galo, pataisas nitrifikuoti suvartotam deguoniui skaičiuokite pagal nitrito ir nitrato koncentracijų pokyčius (5 priedėlis).

VI.3.2. **Rezultatų tinkamumas**

Deguonies suvartojimas tuščiajame bandinyje su sėjimo kultūra po 28 parų turi būti ne didesnis kaip 1,5 mg/litre ištirpusio deguonies. Jei vertės didesnės, reikia tikrinti eksperimento metodikas. Likutinė deguonies koncentracija bet kuriuo momentu bandymo kolbose neturi sumažėti daugiau kaip iki 0,5 mg/litre. Tokių mažų deguonies lygių nustatymas yra tinkamas tik tokiu atveju, jei ištirpusio deguonies nustatymo metodu įmanoma tiksliai juos matuoti.

Žr. dar I.5.2.

VI.3.3. **Ataskaita**

Žr. I.8.

VI.4. SPECIFIKACIJA

Toliau pateiktas specifikacijos pavyzdys.

UŽDAROSIOS KOLBOS BANDYMAS

1. **LABORATORIJA**

2. **BANDYMO PRADŽIOS DATA**

3. **BANDOMOJI MEDŽIAGA**

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija: … mg/litre

Pradinė koncentracija kolboje: … mg/litre

ThOD arba COD: … mg O_2/mg bandomosios medžiagos

4. **SĖJIMO KULTŪRA**

Šaltinis:

Kaip apdorota:

▼C1

Pradinis kondicionavimas, jei toks buvo:

Koncentracija reakcijos mišinyje: … mg/litre

5. **DO NUSTATYMAS**

Metodas: Winklerio/elektrodas

Kolbų turinio analizė

Inkubavimo trukmė (paros)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Tuščiasis bandinys (be cheminės medžiagos)	1	C_1				
	2	C_2				
Vidutinė vertė	$m_b = \frac{(C_1 + C_2)}{(2)}$					
Bandomoji cheminė medžiaga	1	a_1				
	2	a_2				
Vidutinė vertė	$m_t = \frac{(a_1 + a_2)}{(2)}$					

Pastaba. Panašus formatas gali būti taikomas etaloninei medžiagai ir toksiškumo kontroliniam bandiniui.

6. **PATAISA DĖL NITRIFIKAVIMO** (žr. 5 priedėlį)

Inkubavimo trukmė (paros)		0	n_1	n_2	n_3
i)	Nitrato koncentracija (mg N/litre)				
ii)	Nitrato koncentracijos pokytis (mg N/litre)	—			
iii)	Deguonies ekvivalentas (mg/litre)	—			
iv)	Nitrito koncentracija (mg N/litre)				
v)	Nitrito koncentracijos pokytis (mg N/litre)	—			
vi)	Deguonies ekvivalentas (mg/litre)	—			
iii + vi)	Bendrasis deguonies ekvivalentas (mg/litre)	—			

7. **DO SUVARTOJIMAS. SKAIDYMO %**

	Suvartota per n parų (mg/litre)			
	n_1	n_2	n_3	
KOLBA 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
KOLBA 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼C1

	Suvartota per n parų (mg/litre)			
	n_1	n_2	n_3	
KOLBA 1: $D_1\% = \frac{([(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100)}{(\text{bandymo koncentracija} \times \text{cheminės medžiagos ThOD})}$				
KOLBA 2: $D_2\% = \frac{([(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100)}{(\text{bandymo koncentracija} \times \text{cheminės medžiagos} \times \text{ThOD})}$				
D % vidutinė vertė (*) $= \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) Jei tarp lygiagrečių nustatymų yra didelis skirtumas, vidutinės vertės neskaičiuokite.

m_{to} = vertė bandymo kolboje laiku 0

m_{tx} = vertė bandymo kolboje laiku x

m_{bo} = tuščiojo bandinio vidutinė vertė laiku 0

mb_x = tuščiojo bandinio vidutinė vertė laiku x

Taip pat darykite pataisą dėl nitrifikavimo, naudodami 6 skyriaus iii + vi.

8. **DO SUVARTOJIMAS TUŠČIAJAME BANDINYJE**

Deguonies suvartojimas tuščiajame bandinyje: (m_{bo} – m_{b28}) mg/litre. Šis suvartojimas svarbus bandymo tinkamumui. Suvartojimas turi būti mažesnis kaip 1,5 mg/litre.

VII DALIS. **M.I.T.I. BANDYMAS** (C.4-F metodas)

VII.1. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Deguonies suvartojimas maišomu bandomosios medžiagos tirpalu arba suspensija mineralinėje terpėje, į kurį dedama specialiai auginta neadaptuotų mikroorganizmų kultūra, 28 paras automatiškai matuojamas tamsoje ir 25 ± 1 °C temperatūroje laikomame uždarame respirometre. Išsiskyręs anglies dioksidas absorbuojamas natrio kalkėmis. Biologinis skaidumas reiškiamas deguonies suvartojimo (pataisyto atsižvelgiant į suvartojimą tuščiajame bandinyje) procentine teorinio suvartojimo (ThOD) dalimi. Be to, pirminio biologinio skaidumo procentinė vertė skaičiuojama pagal papildomos specifinės cheminės analizės, atliekamos inkubavimo pradžioje ir pabaigoje, duomenis ir, neprivalomai, pagal DOC analizės duomenis.

VII.2. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

VII.2.1. **Aparatūra**

a) Automatinis elektrolitinis BOD matuoklis arba respirometras, paprastai su 6 kolbomis, kurių kiekvienos tūris 300 ml, ir su indu CO_2 absorbentui laikyti;

▼C1

b) patalpa su pastovia temperatūra ir (arba) vandens vonia 25 °C ± 1 °C arba geriau;

c) membraninio filtravimo įtaisas (neprivalomas);

d) anglies analizatorius (neprivalomas).

VII.2.2. **Mineralinės terpės ruošimas**

Paruoškite šiuos pradinius tirpalus, naudodami analiziškai grynus reagentus ir vandenį (I.6. 1):

a)	Kalio dihidrofosfatas, KH_2PO_4	8,50 g
	Kalio hidrofosfatas, K_2HPO_4	21,75 g
	Natrio hidrofosfatas, dodekahidratas, Na_2HPO_4 12 H_2O	44,60 g
	Amonio chloridas, NH_4Cl	1,70 g
	Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro	
	Tirpalo pH turi būti 7,2	
b)	Magnio sulfatas, heptahidratas, $MgSO_4$ 7 H_2O	22,50 g
	Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro	
(c)	Kalcio chloridas, bevandenis, $CaCl_2$	27,50 g
	Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro	
(d)	Geležies (III) chloridas, heksahidratas, $FeCl_3$ 6 H_2O	0,25 g
	Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro	

Imkite 3 ml kiekvieno (a), (b), (c) ir (d) tirpalo ir praskieskite iki 1 litro.

VII.2.3. **Sėjimo kultūros ruošimas**

Surinkite šviežius bandinius iš ne mažiau kaip dešimties vietų, daugiausia iš tokių, kuriose įvairios cheminės medžiagos naudojamos ir šalinamos. Iš tokių vietų kaip, pvz., nuotekų valymo įrenginių, pramoninių nuotekų valymo įrenginių, upių, ežerų, jūrų, surinkite 1 l dumblo, paviršiaus dirvožemio, vandens ir t. t. bandinių ir gerai juos kartu sumaišykite. Pašalinkite paviršiuje plaukiojančias medžiagas ir palikite nusistovėti, po to natrio hidroksidu arba fosforo rūgštimi nustatykite skysčio virš nuosėdų pH vertę 7 ± 1.

Atitinkamą filtruoto skysčio virš nuosėdų tūrį naudokite užpildyti aktyviojo dumblo užpildymo ir išleidimo (*fill-and-draw*) indą ir aeruokite skystį maždaug 231/2 h. Trisdešimt minučių po aeravimo pabaigos maždaug trečdalį viso skysčio virš nuosėdų išpilkite ir ant nusodintos medžiagos užpilkite tokį pat tūrį tirpalo (pH 7), kuriame būtų po 0,1 % gliukozės, peptono ir kalio dihidrofosfato, ir vėl aeruokite. Kartokite šią procedūrą kartą per dieną. Dumblo įrenginys turi būti eksploatuojamas laikantis geros praktikos: ištakiai turi būti skaidrūs, turi būti palaikoma 25 ± 2 °C temperatūra, pH turi būti 7 ± 1, dumblas turi gerai nusistovėti, turi būti pakankamas aeravimas, kad mišinys visą laiką būtų aerobinis, turi būti paprasčiausių vienaląsčių organizmų ir dumblo aktyvumas turi būti tikrinamas pagal etaloninę medžiagą bent kas tris mėnesius. Dumblo kaip sėjimo kultūros nenaudokite anksčiau kaip po mėnesio nuo proceso pradžios, bet ne vėliau kaip po keturių mėnesių. Po to, imkite bandinius bent iš 10 vietų reguliariais laiko tarpais, kartą per tris mėnesius.

▼C1

Norint, kad senojo ir naujojo dumblo aktyvumas būtų toks pat, sumaišykite vienodus tūrius filtruoto skysčio virš naudojamo aktyviojo dumblo ir filtruoto skysčio virš šviežiai surinkto dešimties šaltinių mišinio ir auginkite mikroorganizmus supiltuose skysčiuose, kaip tai aprašyta aukščiau. Imkite dumblą naudoti kaip sėjimo kultūrą 18–24 h po to, kai įrenginys buvo įkrautas.

VII.2.4. **Kolbų ruošimas**

Paruoškite tokias šešias kolbas:

Nr. 1: bandomosios cheminės medžiagos tirpalas skiedimo vandenyje, 100 mg/l

Nr. 2, 3 ir 4: bandomosios cheminės medžiagos tirpalas mineralinėje terpėje, 100 mg/l

Nr. 5: etaloninės cheminės medžiagos (pvz., anilino) tirpalas mineralinėje terpėje, 100 mg/l

Nr. 6: tik mineralinė terpė

Mažai tirpias medžiagas dėkite tiesiai pagal masę arba pagal tūrį arba apdorokite, kaip aprašyta 3 priedėlyje, išskyrus tai, kad neturi būti naudojami nei tirpikliai, nei emulsikliai. Į visas kolbas specialiuose induose įdėkite CO_2 absorbento. Kolbose Nr. 2, 3 ir 4 nustatykite pH vertę 7,0.

VII.2.5. **Bandymo procedūra**

Į kolbas Nr. 2, 3 ir 4 (bandomosios suspensijos), Nr. 5 (aktyvumo kontrolinis bandinys) ir Nr. 6 (tuščiasis bandinys su sėjimo kultūra) įpilkite mažą tūrį sėjimo kultūros, kad suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija būtų 30 mg/l. Sėjimo kultūros nedėkite į kolbą Nr. 1, kurioje yra abiotinio skaidymo kontrolinis bandinys. Surinkite įrangą, patikrinkite hermetiškumą, įjunkite purtykles ir pradėkite matuoti deguonies suvartojimą tamsoje. Kasdien tikrinkite temperatūrą, purtyklę ir kulonometrinį deguonies suvartojimo registravimo įrenginį bei stebėkite bet kokius kolbų turinio spalvos kitimus. Deguonies suvartojimo rodmenis šešiose kolbose registruokite tiesiogiai tinkamu metodu, pvz., šešių taškų savirašiu, brėžiančiu BOD kreivę. Inkubavimo pabaigoje, kuris paprastai tęsiamas 28 paras, išmatuokite kolbų turinio pH ir nustatykite likusios bandomosios medžiagos ir kiekvieno tarpinio produkto koncentraciją, ir, vandenyje tirpios medžiagos atveju, DOC koncentraciją (2.4 priedėlis). Imkitės ypatingų priemonių lakiųjų cheminių medžiagų atveju. Jei tikitės, kad gali vykti nitrifikavimas, nustatykite nitrito ir nitrato koncentraciją, jei tai įmanoma.

VII.3. DUOMENYS IR ATASKAITA

VII.3.1. **Rezultatų apdorojimas**

Padalinkite kiekį (mg) deguonies, bandomosios cheminės medžiagos suvartoto per tam tikrą laiką ir pataisytą atsižvelgiant į deguonies, suvartoto per tą patį laiką tuščiajame sėjimo kultūros bandinyje, kiekį, iš naudojamos bandomosios cheminės medžiagos masės. Taip gaunamas BOD, skaičiuojamas mg deguonies/mg bandomosios medžiagos, taigi:

$$\text{BOD} = \left(\frac{(\text{O}_2 \text{ suvartojimas bandomąja chemine medžiaga (mg)} - \text{O}_2 \text{ suvartojimas tuščiajame bandinyje (mg)})}{(\text{bandomosios medžiagos kiekis kolboje (mg)})} \right)$$

= kiekis O_2 (mg) vienam mg bandomosios cheminės medžiagos

▼C1

Tuomet biologinio skaidymo procentinė vertė gaunama pagal lygtį:

$$\text{Skaidymo \%} = \%\ \text{ThOD} = \left(\frac{(\text{BOD (mg } O_2/\text{mg cheminės medžiagos))}}{(\text{ThOD (mg } O_2/\text{mg cheminės medžiagos))}}\right) \times 100$$

Mišinių ThOD skaičiuokite pagal elementinę analizę, kaip paprasto junginio. Naudokite atitinkamas ThOD ($ThOD_{NH4}$ arba $ThOD_{NO3}$) vertes pagal tai, ar nitrifikavimas nevyksta, ar jis yra visiškas (2.2 priedėlis). Jei nitrifikavimas vyksta, tačiau ne iki galo, pataisas nitrifikuoti suvartotam deguoniui skaičiuokite pagal nitrito ir nitrato koncentracijų pokyčius (5 priedėlis).

Pirminio biologinio skaidymo procentinę vertę skaičiuokite pagal specifinės (pradinės) cheminės medžiagos kiekio mažėjimą (žr. I.7.2).

$$D_t = \left(\frac{(S_b - S_a)}{(S_b)}\right) \times 100\ \ \%$$

Nurodykite ataskaitoje, jei sumažėjo bandomosios medžiagos koncentracija kolboje Nr. 1, kurioje matuojamas fizikocheminis pašalinimas, o bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją (S_b), šioje kolboje po 28 parų naudokite apskaičiuoti biologinio skaidymo procentinei vertei.

Kai daromi DOC nustatymai (neprivalomi), apskaičiuokite biologinio suskaidymo procentinę vertę pagal:

$$D_t = \left(1 - \frac{(C_t - C_{bt})}{(C_o - C_{bo})}\right) \times 100\ \ \%,$$

kaip aprašyta I.7.1. punkte. Jei DOC kiekis sumažėjo kolboje Nr. 1, DOC koncentraciją šioje kolboje naudokite apskaičiuoti biologinio skaidymo procentinei vertei.

Visus rezultatus užrašykite pateiktose specifikacijose.

VII.3.2. **Rezultatų tinkamumas**

Paprastai deguonies suvartojimas sėjimo kultūros tuščiajame bandinyje per 28 paras yra 20–30 mg O_2/litre ir neturi būti didesnis kaip 60 mg/litre. Jei vertės didesnės kaip 60 mg/litre, būtina kritiškai ištirti duomenis ir eksperimento metodikas. Jei pH vertė nepatenka į 6–8,5 intervalą, o bandomoji medžiaga deguonies suvartoja mažiau kaip 60 %, bandymas turi būti pakartotas su mažesne bandomosios cheminės medžiagos koncentracija.

Žr. dar I.5.2.

Jei anilino skaidymo procentinė vertė, apskaičiuota pagal deguonies suvartojimą, po 7 parų ne didesnė kaip 40 % ir po 14 parų ne didesnė kaip 65 %, laikoma, kad bandymas netinkamas.

VII.3.3. **Ataskaita**

Žr. I.8.

VII.4. SPECIFIKACIJA

Toliau pateiktas specifikacijos pavyzdys.

MITI (I) BANDYMAS

1. **LABORATORIJA**

2. **BANDYMO PRADŽIOS DATA**

▼C1

3. **BANDOMOJI MEDŽIAGA**

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija: … mg/l kaip cheminės medžiagos

Pradinė koncentracija terpėje, C_0: … mg/l kaip cheminės medžiagos

Reakcijos mišinio tūris, V: … ml

ThOD: … mg O_2/l

4. **SĖJIMO KULTŪRA**

Dumblo bandinių ėmimo vietos:

1) … 6) …

2) … 7) …

3) … 8) …

4) … 9) …

5) … 10) …

Suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija aktyviajame dumble po aklimatizavimo sintetinėmis nuotekomis =… mg/l

Aktyviojo dumblo tūris vienam litrui galutinai paruoštos terpės =… ml

Dumblo koncentracija galutinai paruoštoje terpėje =… mg/l

5. **DEGUONIES SUVARTOJIMAS. BIOLOGINIS SKAIDUMAS**

Naudoto respirometro tipas:

			Laikas (paros)				
			0	7	14	21	28
Bandomosios medžiagos suvartojamo O_2 kiekis (mg)	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2 suvartojimas (mg) tuščiajame bandyme	b						
Pataisyta O_2 suvartojimo vertė (mg)	$(a_1 - b_1)$ $(a_2 - b_1)$ $(a_3 - b_1)$						
BOD vienam mg bandomosios cheminės medžiagos	$\frac{(a - b)}{(C_o V)}$	1 Kolba					
		2 Kolba					
		3 Kolba					
Skaidymo % $\left(\frac{(BOD)}{(ThOD)}\right) \times 100$		1					
		2					
		3					
		vidutinė vertė (*)					

(*) Vidutinių verčių neskaičiuokite, jei tarp lygiagrečių nustatymų yra didelis skirtumas.

▼C1

Pastaba. Panašūs formatai gali būti taikomi etaloninei medžiagai.

6. **ANGLIES ANALIZĖ** (neprivaloma):

Anglies analizatorius:

Kolba	DOC				Pašalintos DOC %	Vidutinė vertė
	Matuota		Pataisyta			
Vanduo + bandomoji medžiaga	a				—	—
Dumblas + bandomoji medžiaga	b_1		$b_1 - c$			
Dumblas + bandomoji medžiaga	b_2		$b_2 - c$			
Dumblas + bandomoji medžiaga	b_3		$b_3 - c$			
Kontrolinis tuščiasis bandinys	c		—		—	—

$$\text{Pašalintos DOC \% : } \left(\frac{(a_1 - (b - c))}{(a)}\right) \times 100$$

7. **SPECIFINĖS CHEMINĖS ANALIZĖS DUOMENYS**

	Likutinis bandomosios medžiagos kiekis bandymo pabaigoje	Skaidymas %
Tuščiasis bandinys su vandeniu	S_b	
Terpė su sėjimo kultūra	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\text{Skaidymo \%} = \left(\frac{(S_b - S_a)}{(S_b)}\right) \times 100$$

Apskaičiuokite skaidymo % atitinkamai kolbose a_1, a_2 ir a_3.

8. **PASTABA**

Turi būti pridedama BOD kitimo laike kreivė, jei yra.

▼C1

1 priedėlis

SANTRUMPOS IR APIBRĖŽTYS

DO : Ištirpęs deguonis (mg/l) yra vandeniniame bandinyje ištirpusio deguonies koncentracija.

BOD : Biocheminis deguonies suvartojimas (g) yra deguonies kiekis, kurį suvartoja mikroorganizmai, įsisavindami bandomąją medžiagą; taip pat skaičiuojamas g suvartoto deguonies g bandomosios medžiagos (žr. C.5 metodą).

COD : Cheminis deguonies suvartojimas (g) yra deguonies kiekis, suvartotas bandomąją medžiagą oksiduojant karštu, rūgščiu dichromato tirpalu; COD yra turimo oksiduojamos medžiagos kiekio matas; taip pat skaičiuojamas g deguonies, suvartoto g bandomosios medžiagos (žr. C.6 metodą).

DOC : Ištirpusi organinė anglis yra organinė anglis tirpale arba organinė anglis, kuri praeina per 0,45 μm filtrą arba lieka skystyje virš nuosėdų po 15 min centrifugavimo 40 000 $m.s^{-2}$ (apie 4 000 g) pagreičiu.

ThOD : Teorinis deguonies suvartojimas (mg) yra bendras deguonies kiekis, kurio reikia visiškai oksiduoti cheminę medžiagą; jis skaičiuojamas pagal molekulinę formulę (žr. 2.2 priedėlį), dar kitaip skaičiuojamas mg deguonies, suvartojamo oksiduoti 1 mg bandomosios medžiagos.

$ThCO_2$: Teorinis anglies dioksido kiekis (mg) yra apskaičiuotas anglies dioksido, kuris susidaro iš žinomo arba išmatuoto anglies kiekio bandomojoje medžiagoje, kai ji visiškai mineralizuojama, kiekis; taip pat skaičiuojamas mg anglies dioksido, kuris susidaro iš 1 mg bandomosios medžiagos.

TOC : Bendroji bandinio organinė anglis yra ištirpusios ir suspenduotos organinės anglies bendras kiekis.

IC : Neorganinė anglis

TC : Bendroji anglis yra bandinio organinės ir neorganinės anglies bendras kiekis.

Pirminis biologinis skaidymas

Biologiškai veikiamos medžiagos cheminės sandaros pokytis, kai ji netenka tai medžiagai būdingų savybių.

Biologinis suskaidymas (aerobinis):

Pasiektas skaidymo lygis, kai mikroorganizmai bandomąją medžiagą visiškai suvartoja ir susidaro anglies dioksidas, vanduo, mineralinės druskos ir naujos mikrobiologinės ląstelinės sudedamosios dalys (biomasė).

Lengvai biologiškai skaidomas

Cheminių medžiagų, su kuriomis buvo atliekami kai kurie apibrėžti atrankos pagal biologinį suskaidymą bandymai, sutartinis klasifikavimas; šie bandymai yra tokie tikslūs, kad laikoma, kad vandens terpėse aerobinėmis sąlygomis tokie junginiai greitai ir visiškai biologiškai suyra.

▼C1

Natūraliai biologiškai skaidomas

Cheminių medžiagų, apie kurių biologinį skaidymą (pirminį arba suskaidymą) bet kokiame pripažintame biologinio skaidumo bandyme yra neabejotinų duomenų, klasifikavimas.

Apdorojamumas

Galimybė medžiagas paversti šalinamais junginiais biologinio nuotekų valymo metu, neigiamai neveikiant normalios valymo procesų eigos. Dažniausiai tinkamos apdoroti yra lengvai biologiškai skaidomos medžiagos, bet ne visi natūraliai biologiškai skaidomi junginiai. Gali vykti ir abiotiniai procesai.

Vėlavimo trukmė

Laikas nuo sėjimo kultūros įdėjimo DOC išnykimo bandyme iki kol skaidymo procentinė vertė pasiekia bent 10 %. Vėlavimo trukmė dažnai yra labai kintamas dydis ir jo atkuriamumas blogas.

Skaidymo trukmė

Laikas nuo vėlavimo laikotarpio pabaigos iki to laiko, kai skaidymas pasiekia 90 % didžiausios skaidymo vertės lygio.

10 parų langas

10 parų iš karto po to, kai skaidymo vertė pasiekė 10 %.

▼C1

2 priedėlis

ATITINKAMŲ BENDRŲJŲ PARAMETRŲ SKAIČIAVIMAS IR NUSTATYMAS

Nuo pasirinkto metodo priklauso, kokie bus reikalingi bendrieji parametrai. Šiame skyriuje aprašomas šių dydžių išvedimas. Šių parametrų taikymas aprašomas skyriuose apie atskirus metodus.

1. **Anglies kiekis**

Anglies kiekis skaičiuojamas pagal žinomą cheminę sudėtį arba nustatomas bandomosios medžiagos elementine analize.

2. **Teorinis deguonies suvartojimas (ThOD)**

Teorinis deguonies suvartojimas (ThOD) gali būti apskaičiuotas, jei žinoma elementinė sudėtis, arba jis gali būti nustatytas atliekant elementinę analizę. Junginio:

$C_cH_hCl_{Cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

jei nitrifikavimas nevyksta,

$$ThOD_{NH4} = \left(\frac{(16[2c + 1/2(h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o])}{(MW)} \right) \text{ mg/mg}$$

kai nitrifikavimas vyksta

$$ThOD_{NO3} = \left(\frac{(16[2c + 1/2(h - cl) + 5/2n + 3s + 5/2p + 1/2na - o])}{(MW)} \right) \text{ mg/mg}$$

3. **Cheminis deguonies suvartojimas (COD)**

Cheminis deguonies suvartojimas (COD) nustatomas pagal C.6 metodą.

4. **Ištirpusi organinė anglis (DOC)**

Ištirpusi organinė anglis (DOC) pagal apibrėžtį yra bet kurios cheminės medžiagos arba medžiagų mišinio vandenyje organinė anglis, praeinanti per 0,45 μm filtrą.

Bandiniai iš bandymo indų siurbiami ir iš karto filtruojami filtravimo įtaisu, naudojant atitinkamą membraninį filtrą Pirmieji 20 ml (kiekis gali būti mažesnis, kai naudojami maži filtrai) filtrato išpilami. 10–20 ml tūrio arba mažesni bandiniai, jei jie įpurškiami (tūris priklauso nuo anglies analizatoriui reikalingo tūrio), paliekami anglies kiekiui analizuoti. DOC koncentracija nustatoma organinės anglies analizatoriumi, kuriuo galima tiksliai nustatyti anglies koncentraciją, atitinkančią 10 % arba mažesnę nei 10 % bandyme naudotos pradinės DOC koncentracijos.

Filtruotus bandinius, kurių negalima analizuoti tą pačią darbo dieną, 48 h galima laikyti šaldytuve 2–4 °C temperatūroje, arba žemesnėje nei –18 °C, jei laikoma ilgiau.

Pastabos

Membraniniai filtrai, kad būtų hidrofiliški, dažnai impregnuojami paviršinio aktyvumo medžiagomis. Todėl filtre gali būti iki kelių mg ištirpusios organinės anglies, kuri trukdytų biologinio skaidumo nustatymams. Paviršinio aktyvumo medžiagos ir kitos tirpios organinės medžiagos iš filtrų šalinamos juos virinant tris kartus po vieną valandą dejonizuotame vandenyje. Toliau filtrai gali būti savaitę laikomi vandenyje. Jei naudojamos vienkartės filtravimo tūtos, kiekviena partija turi būti patikrinta, norint įsitikinti, kad nesusidaro ištirpusi organinė anglis.

▼C1

Atsižvelgiant į membraninio filtro tipą, bandomoji cheminė medžiaga gali būti sulaikyta dėl jos adsorbavimo. Todėl būtų patartina tikrinti, ar filtras neadsorbuoja cheminės medžiagos.

Kai norima lyginti TOC ir DOC, vietoje filtravimo gali būti taikomas 15 min centrifugavimas 40 000 m. sec^{-2} (4 000*g*) pagreičiu. Metodas nepatikimas, jei DOC pradinė koncentracija yra < 10 mg/l, nes arba pašalinamos ne visos bakterijos, arba anglis vėl ištirpsta kaip bakterijų plazmos dalis.

NUORODOS

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, p. 65.

— Wagner, R, Von Wasser, 1976, vol. 46, p. 139.

— DIN-Entwurf 38409 Teil 41 – Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und StoffkenngroBen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoff-bedarfs (CSB) (H 41), NonnenausschuB Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut fur Normung e. V.

— Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13 1), p. 169.

▼C1

3 priedėlis

MAŽAI TIRPIŲ MEDŽIAGŲ BIOLOGINIO SKAIDUMO VERTINIMAS

Mažai tirpių medžiagų biologinio skaidumo bandymuose ypatingas dėmesys turi būti kreipiamas į toliau nurodytus aspektus.

Jei homogeniniai skysčiai retai kelia bandinio ėmimo problemų, tai kietąsias medžiagas rekomenduojama homogenizuoti tinkamu būdu, kad būtų išvengta paklaidų dėl nehomogeniškumo. Reikalingos specialios atsargumo priemonės, kai reikia paimti kelių miligramų reprezentatyvius cheminių medžiagų mišinių arba daug priemaišų turinčių medžiagų bandinius.

Bandymuose galima taikyti įvairius maišymo būdus. Reikia stengtis užtikrinti tik tokį maišymą, kad medžiaga būtų disperguotoje būsenoje, ir vengti perkaitinimo, per didelio putojimo ir per didelių šlyties jėgų.

Galima naudoti emulsiklį, su kuriuo gaunama patvari cheminės medžiagos dispersija. Jis neturi būti nuodingas bakterijoms ir neturi būti biologiškai skaidomas arba bandymo sąlygomis putoti.

Emulsikliams taikomi kriterijai tinka ir tirpikliams.

Kietosioms bandomosioms medžiagoms nerekomenduojama naudoti kietuosius nešiklius, tačiau jie gali tikti aliejingoms medžiagoms.

Kai naudojamos pagalbinės medžiagos, pvz., emulsikliai, tirpikliai ir nešikliai, turi būti bandomas tuščiasis bandinys, kuriame būtų pagalbinė medžiaga.

Bet kuris iš trijų respirometrinių bandymų, CO_2, BOD, MITI, gali būti taikomas mažai tirpių junginių biologiniam skaidumui tirti.

NUORODOS

— de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, p. 833.

— Gerike, P., The Biodegradability testing of poorly water-soluble compounds. Chemosphere. 1984, vol. 13, p. 169.

▼C1

4 priedėlis

CHEMINIŲ MEDŽIAGŲ, KURIOS GALI BŪTI NUODINGOS SĖJIMO KULTŪRAI, BIOLOGINIO SKAIDUMO VERTINIMAS

Kai tiriant cheminę medžiagą lengvo biologinio skaidumo bandymuose paaiškėja, kad ji biologiškai neskaidoma, tai, jei norima atskirti, ar tai inhibuojamasis veikimas ar medžiagos inertiškumas, rekomenduojama tokia procedūra (Reynolds *et al*., 1987).

Toksiškumo ir biologinio skaidumo bandymuose turi būti naudojama panaši arba identiška sėjimo kultūra.

Norint įvertinti cheminių medžiagų, tiriamų lengvo biologinio skaidumo bandymuose, toksiškumą, tiktų, kaip manoma, atskirai arba kartu taikyti dumblo kvėpavimo intensyvumo inhibavimo (aktyviojo dumblo kvėpavimo inhibavimo bandymas – Direktyva 88/302/EEB), BOD ir (arba) augimo inhibavimo metodus.

Manoma, kad, jei reikia išvengti inhibavimo dėl medžiagos toksiškumo, bandomųjų medžiagų, naudojamų lengvo biologinio skaidumo bandymuose, koncentracija turėtų būti mažesnė nei 1/10 EC_{50} vertės (arba mažesnė nei EC_{20} vertė), gautos toksiškumo bandymuose. Nepanašu, kad junginiai, kurių EC_{50} vertė yra didesnė kaip 300 mg/l, būtų toksiški biologinio skaidumo bandymuose.

Mažesnės kaip 20 mg/l EC_{50} vertės greičiausiai turėtų kelti problemų toliau atliekamiems bandymams. Turi būti naudojamos mažos bandomosios koncentracijos, todėl reikia taikyti tikslų ir jautrų uždarosios kolbos metodą arba naudoti ^{14}C žymėtas mežiagas. Kitaip dar būtų galima naudoti aklimatizuotą sėjimo kultūrą, kuri, galbūt, leistų naudoti bandomąją medžiagą didesnėmis koncentracijomis. Tačiau šiuo atveju prarandamas specifinis lengvo biologinio skaidumo bandymo kriterijus.

NUORODOS

Reynolds, L. et al.. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, p. 225.

▼C1

5 priedėlis

DEGUONIES SUVARTOJIMO PATAISA DĖL NITRIFIKAVIMO KELIAMŲ TRUKDŽIŲ

Jei nekreipiama dėmesio į nitrifikavimą, kai biologinis skaidumas vertinamas pagal bandomųjų medžiagų suvartojamo deguonies kiekį, tai paklaidos medžiagoms, kuriose nėra azoto, yra nežymios (ne didesnės kaip 5 %), net jei terpės amonio azoto oksidavimas bandomojo ir tuščiojo bandinio induose vyksta nevienodai. Tačiau, jei bandomosios medžiagos turi azoto, paklaidos gali būti didelės.

Jei nitrifikavimas įvyko, tačiau nevisiškai, stebimas reakcijos mišinio suvartojamo deguonies kiekis gali būti pakoreguotas atsižvelgiant į deguonies kiekį, suvartotą amonio jonui oksiduoti į nitritą ir nitratą, jei nitrito ir nitrato koncentracijų pokytis inkubavimo metu nustatomas atsižvelgiant į tokias reakcijų lygtis:

$$2NH_4Cl + 3O_2 = 2HNO_2 + 2HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Suminė reakcija:

$$2NH_4Cl + 4O_2 = 2HNO_3 + 2HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Pagal 1) lygtį, 28 g azoto, kuris yra amonio chloride (NH_4Cl), oksiduoti į nitritą, reikia 96 g deguonies, t. y. faktorius lygus 3,43 (96/28). Tokiu pat būdu pagal 3) lygtį 28 g azoto, kai jis oksiduojamas į nitratą, suvartoja 128 g deguonies, t. y. faktorius lygus 4,57 (128/28).

Kadangi reakcijos yra nuoseklios ir vyksta dėl tam tikrų ir skirtingų bakterijų rūšių veiklos, įmanomas dalykas, kad nitrito koncentracija gali tiek didėti, tiek ir mažėti; pastaruoju atveju susidarytų ekvivalentiškas kiekis nitrato. Taigi, deguonies, suvartoto nitratui susidaryti, kiekis lygus 4,57 ir nitrato koncentracijos padidėjimo sandaugai, o deguonies kiekis nitritui susidaryti lygus 3,43 ir nitrito koncentracijos padidėjimo sandaugai arba – 3,43 ir nitrito koncentracijos sumažėjimo sandaugai, kai nitrito koncentracija mažėja.

T. y.:

O_2, suvartotas nitratui susidaryti = 4,57 × nitrato koncentracijos padidėjimo (4)

Ir

O_2, suvartotas nitritui susidaryti = 3,43 × nitrito koncentracijos padidėjimo (5)

Ir

O_2 netenkama dėl nitrito išnykimo = – 3,43 × nitrito koncentracijos sumažėjimo (6)

Taigi

O_2 suvartojimas dėl nitrifikavimo = ± 3,43 × nitrito konc. pokyčio. + 4,57 × nitrato konc. padidėjimo (7)

Ir todėl

O_2, suvartotas C oksiduoti = bendrasis stebėtas suvartotas kiekis – nitrifikavimui suvartotas kiekis (8)

Kitu atveju, jei nustatytas tik bendrasis oksiduoto azoto kiekis, tai, kaip pirminė aproksimacija, galima laikyti, kad deguonies suvartojimas dėl nitrifikavimo lygus 4,57 × oksiduoto N koncentracijos padidėjimo.

Toliau angliai oksiduoti suvartoto deguonies kiekio pataisyta vertė lyginama su ThOD NH_3 verte, kuri skaičiuojama 2 priedėlyje.

▼C1

C.5. SKAIDYMAS. BIOCHEMINIS DEGUONIES SUVARTOJIMAS

1. METODAS

1.1. ĮVADAS

Šio metodo tikslas yra išmatuoti kietųjų arba skystųjų organinių medžiagų biocheminį deguonies suvartojimą (COD).

Šiame bandyme gauti duomenys taikomi vandenyje tirpioms medžiagoms; tačiau taip pat galima bandyti, bent iš esmės, lakiąsias medžiagas arba medžiagas, kurios mažai tirpsta vandenyje.

Metodas tinka tik toms bandomosioms organinėms medžiagoms, kurios, būdamos bandyme naudojamos koncentracijos, neinhibuotų bakterijų veiklos. Jei bandomoji medžiaga nėra tiek tirpi, kad galima būtų pasiekti bandymo koncentraciją, gerai bandomosios medžiagos dispersijai gauti galima taikyti specialias priemones, pvz., dispergavimą ultragarsu.

Kai reikia aiškinti žemus rezultatus ir parinkti tinkamas bandomąsias koncentracijas, gali būti naudinga informacija apie cheminės medžiagos toksiškumą.

1.2. APIBRĖŽTIS IR VIENETAI

BOD apibrėžiamas kaip masė ištirpusio deguonies, suvartoto biocheminio oksidavimo procesui nustatytame tirpalo tūryje vykti apibrėžtomis sąlygomis.

Rezultatai skaičiuojami BOD gramais vienam gramui bandomosios medžiagos.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Pageidautina naudoti tinkamą etaloninę medžiagą, skirtą tikrinti sėjimo kultūros aktyvumą.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Gerai aeruojamoje tinkamoje terpėje ištirpinta arba disperguota medžiaga, kurios kiekis žinomas, veikiama mikroorganizmų kultūra ir tamsoje inkubuojama apibrėžtos pastovios aplinkos temperatūros sąlygomis.

BOD yra nustatomas pagal ištirpusio deguonies kiekio skirtumą bandymo pradžioje ir pabaigoje. Bandymo trukmė turi būti ne trumpesnė kaip penkios paros ir ne ilgesnė kaip 28 paros.

Lygiagrečiai turi būti daromas nustatymas tuščiajame bandinyje, kuriame nebūtų bandomosios medžiagos.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Negalima laikyti, kad BOD nustatymas yra tinkamas medžiagos biologinio skaidumo nustatymas. Į šį bandymą galima žiūrėti tik kaip į atrankos bandymą.

1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Ruošiamas pradinis medžiagos tirpalas arba dispersija gauti BOD koncentracijai, atitinkančiai taikomą metodą. Tuomet pagal bet kurį tinkamą nacionalinį arba tarptautinį standartizuotą metodą nustatomas BOD.

▼C1

2. **DUOMENYS IR VERTINIMAS**

BOD pradiniame tirpale skaičiuojamas pagal parinktą standartinį metodą ir verčiamas į BOD gramus vienam gramui bandomosios medžiagos.

3. **ATASKAITA**

Turi būti nurodytas taikytas metodas.

Biocheminis deguonies suvartojimas turi būti bent trijų tinkamų matavimų vidurkis.

Turi būti pateikta visa rezultatams aiškinti reikalinga informacija ir pastabos, ypač apie priemaišas, fizinę būseną, toksiškumo įtaką ir medžiagai būdingą sudėtį, kuri turėtų įtakos rezultatams.

Turi būti nurodyta, ar buvo naudotas biologinio nitrifikavimo inhibavimo priedas.

4. NUORODOS

Standartizuotų metodų sąrašas, pavyzdžiui:

NF T 90–103: Biocheminio deguonies suvartojimo nustatymas

NBN 407: Biocheminis deguonies suvartojimas

NEN 3235 5.4: Biocheminio deguonies suvartojimo (BDS) nustatymas.

Biocheminio deguonies suvartojimo nustatymas. Vandens ir susijusių medžiagų tyrimo metodai, HMSO, Londonas.

ISO 5815: Biocheminio deguonies suvartojimo nustatymas po n dienų.

▼C1

C.6. **SKAIDYMAS. CHEMINIS DEGUONIES SUVARTOJIMAS**

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Šio metodo tikslas yra standartiniu sutartu būdu išmatuoti kietųjų arba skystųjų organinių medžiagų cheminį deguonies suvartojimą (COD) nustatytomis laboratorinėmis sąlygomis.

Atliekant šį bandymą ir aiškinant gautus rezultatus bus naudinga informacija apie medžiagos formulę (pvz., halogenų druskos, organinių junginių geležies (II) druskos, chloro organiniai junginiai).

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Cheminis deguonies suvartojimas yra medžiagos oksiduojamumo matas, reiškiamas ekvivalentiniu oksiduojančio reagento, kurį suvartoja medžiaga nustatytomis laboratorinėmis sąlygomis, deguonies kiekiu.

Rezultatas skaičiuojamas COD gramais vienam gramui bandomosios medžiagos.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nebūtina kiekvienu atveju, kai tiriama nauja medžiaga, naudoti etalonines medžiagas. Jas daugiausia reikia naudoti tuomet, kai kartkartėmis daroma metodo veiksmingumo patikra ir norint lyginti rezultatus, kai taikomas kitas metodas.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Iš anksto nustatytas vandenyje ištirpintos arba disperguotos medžiagos kiekis dvi valandas oksiduojamas, su grįžtamuoju šaldytuvu, kalio dichromatu stipriai rūgščioje sieros rūgšties terpėje, kai katalizatorius sidabro sulfatas. Likusio dichromato kiekis nustatomas titruojant standartizuotu geležies (II) amonio sulfato tirpalu.

Jei medžiaga turi chloro, nustatymui trukdančio chlorido įtakai mažinti dedama gyvsidabrio (II) sulfato ([1]).

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Dėl to, kad tai sutartinis nustatymo būdas, COD yra „oksiduojamumo indikatorius“ ir naudojamas kaip praktinis organinės medžiagos kiekio nustatymo metodas.

Bandymui gali trukdyti chloridas; taip pat nustatant COD gali trukdyti neorganinės redukuojančios arba oksiduojančios medžiagos.

Kai kurie cikliniai junginiai ir didelis skaičius lakiųjų medžiagų (pvz., mažesnės molekulinės masės sočiosios rūgštys) šiame bandyme nėra visiškai oksiduojamos.

1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Ruošiamas pradinis medžiagos tirpalas arba dispersija COD vertei nuo 250 mg iki 600 mg litre gauti.

([1]) Norint išvengti gyvsidabrio išsisklaidymo aplinkoje, panaudoti tirpalai su gyvsidabrio druskomis turi būti apdoroti.

▼C1

Pastabos

Mažai tirpių ir nedisperguojamų medžiagų atveju galima pasverti tam tikrą kiekį į labai smulkius miltelius sumaltos medžiagos arba skystos medžiagos, atitinkančios maždaug 5 mg COD, ir įdėti ją į eksperimento indą su vandeniu.

Dažnai, ir ypač mažai tirpių medžiagų atveju, cheminį deguonies suvartojimą (COD) geriau nustatyti taikant metodo pakeitimą, t. y. uždaroje sistemoje su slėgio lygintuvu (H. Kelkenberg, 1975). Taikant šį metodo keitimą, dažnai galima sėkmingai kiekybiškai nustatyti junginius, pvz., acto rūgštį, kuriuos standartiniu metodu nustatyti sunku. Tačiau ir šiuo metodu nepasiseka nustatyti piridino. Jei kalio dichromato koncentracija, kaip nurodyta 1 nuorodoje, padidinama iki 0,25 N (0,0416 M), palengvėja tiesioginis 5–10 mg medžiagos svėrimas, kas yra svarbu nustatant mažai vandenyje tirpių medžiagų COD (2 nuoroda).

Kitu atveju COD nustatomas pagal bet kurį atitinkamą nacionalinį arba tarptautinį standartizuotą metodą.

2. **DUOMENYS IR VERTINIMAS**

Bandymų kolboje turimas COD skaičiuojamas pagal pasirinktą standartizuotą metodą ir verčiamas į COD gramus vienam gramui bandomosios medžiagos.

3. **ATASKAITA**

Turi būti nurodytas taikytas etaloninis metodas.

Cheminis deguonies suvartojimas turi būti bent trijų matavimų vidurkis. Turi būti pateikta visa rezultatams aiškinti reikalinga informacija ir pastabos, ypač apie priemaišas, fizinę būseną ir medžiagai būdingas savybes (jei žinomos), kurios turėtų įtakos rezultatams.

Ataskaitoje turi būti nurodyta apie gyvsidabrio (II) sulfato naudojimą nustatymui trukdančio chlorido įtakai mažinti.

4. **NUORODOS**

1) Kelkenberg, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Standartizuotų metodų sąrašas, pvz.:

NBN T 91–201 Cheminio deguonies suvartojimo nustatymas.

ISBN O 11 7512494 Cheminis deguonies suvartojimas (dichromato vertė) užterštuose vandenyse ir nuotekose.

NF T 90–101 Cheminio deguonies suvartojimo nustatymas.

DS 217 = Vandens analizė. Cheminio deguonies suvartojimo nustatymas.

DIN 38409-H-41 Cheminio deguonies suvartojimo (COD) nustatymas intervale virš 15 mg/l.

NEN 3235 5.3 Cheminio deguonies suvartojimo nustatymas.

ISO 6060 Vandens kokybė. Dichromato metodai cheminiam deguonies suvartojimui nustatyti.

▼C1

C.7. **SKAIDYMAS. ABIOTINIS SKAIDYMAS. HIDROLIZĖ KAIP pH FUNKCIJA**

1. **METODAS**

Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 111 (2004).

1.1. ĮVADAS

Cheminės medžiagos gali patekti į paviršinius vandenis tiesiogiai jų pridedant, pasklidus purškiamoms medžiagoms, dėl nuotėkio, drenažo, atliekų šalinimo, pramoninių, buitinių arba žemės ūkio nuotekų ir nuosėdų iš atmosferos, o vandenyje gali pasikeisti vykstant cheminiams (pvz., hidrolizės, oksidacijos), fotocheminiams ir (arba) mikrobiologiniams procesams. Šioje rekomendacijoje aprašytas laboratorinis bandymo metodas, skirtas cheminių medžiagų abiotiniam hidroliziniam virsmui vandens sistemose įvertinti, esant aplinkoje dažniausiai pasitaikančioms pH vertėms (pH 4–9). Rekomendacija grindžiama jau priimtomis rekomendacijomis (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Bandymai atliekami siekiant nustatyti: i) bandomosios medžiagos hidrolizės greitį kaip pH funkciją ir ii) konkrečius hidrolizės produktus, galinčius veikti organizmus, arba jų tipą ir susidarymo bei išnykimo greitį. Tokius tyrimus gali reikėti atlikti su cheminėmis medžiagomis, kurios tiesiogiai dedamos į vandenį arba kurios gali patekti į aplinką kitais pirmiau aprašytais būdais.

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Žr. 2 priedėlį.

1.3. BANDYMO METODO TINKAMUMAS

Bandymo metodas iš esmės tinka visoms cheminėms medžiagoms (nežymėtosioms arba žymėtosioms), kurioms nustatyti yra sukurtas pakankamo tikslumo ir jautrio analizės metodas. Jis taikytinas mažai lakiems ir nelakiems pakankamai tirpiems vandenyje junginiams. Bandymas neturėtų būti taikomas cheminėms medžiagoms, kurios labai greitai išgaruoja iš vandens (pvz., fumigantai, organiniai tirpikliai), todėl negali būti laikomos tirpale šio bandymo sąlygomis. Taikant šį bandymo metodą gali būti sunku bandyti vandenyje labai mažai tirpias medžiagas (8).

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Sterilūs vandeniniai skirtingų pH verčių (pH 4, 7 ir 9) buferiniai tirpalai apdorojami bandomąja medžiaga ir inkubuojami tamsoje kontroliuojamomis laboratorijos sąlygomis (esant pastoviai temperatūrai). Kas tam tikrą laiko tarpą buferiniai tirpalai analizuojami bandomajai medžiagai ir hidrolizės produktams nustatyti. Naudojant žymėtąją bandomąją medžiagą (pvz., ^{14}C), lengviau galima nustatyti masių balansą.

Šis bandymo metodas yra pakopinis. Šios pakopos parodytos ir paaiškintos 1 priedėlyje. Kiekvieną pakopą lemia ankstesnės pakopos rezultatai.

▼C1

1.5. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

Hidrolizės greičiui matuoti gali būti naudojama nežymėtoji arba žymėtoji bandomoji medžiaga. Paprastai geriau naudoti žymėtąją medžiagą, kai reikia tirti hidrolizės kelią ir nustatyti masių balansą; tačiau tam tikrais atvejais žymėjimas nėra būtinas. Rekomenduojama žymėti ^{14}C, tačiau gali būti naudojami ir kiti izotopai, pvz., ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H. Jei įmanoma, žymėtasis atomas turėtų būti patvariausioje (-iose) molekulės dalyje (-yse). Pvz., jei bandomoji medžiaga turi vieną žiedą, žymėtasis atomas turi būti šiame žiede; jei bandomoji medžiaga turi du žiedus arba daugiau, gali tekti atlikti atskirus tyrimus kiekvieno žiedo su žymėtuoju atomu kitimui įvertinti ir atitinkamai informacijai apie hidrolizės produktų susidarymą gauti. Bandomosios medžiagos grynumas turi būti bent 95 %.

Prieš atliekant hidrolizės bandymą, reikėtų turėti tokią informaciją apie bandomąją medžiagą:

a) tirpumas vandenyje [A.6 bandymo metodas];

b) tirpumas organiniuose tirpikliuose;

c) garų slėgis [A.4 bandymo metodas] ir (arba) Henrio dėsnio konstanta;

d) pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolis/vanduo) [A.8 bandymo metodas];

e) disociacijos konstanta (pK_a) [112 OECD rekomendacija] (9);

f) tiesioginio ir netiesioginio fotocheminio transformavimo vandenyje greitis, jei tinka.

Reikėtų turėti analizės metodus bandomosios medžiagos kiekiui nustatyti ir, jei tinka, hidrolizės produktams ir jų kiekiui vandeniniuose tirpaluose nustatyti (žr. 1.7.2 skirsnį).

1.6. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Jei įmanoma, turėtų būti naudojamos etaloninės medžiagos hidrolizės produktams ir jų kiekiui nustatyti, taikant spektroskopinius ir chromatografijos metodus arba kitus tinkamo jautrumo metodus.

1.7. KOKYBĖS KRITERIJAI

1.7.1. **Atgavimas**

Bent dviejų kartotinių buferinių tirpalų ėminių arba jų ekstraktų analizė iškart po bandomosios medžiagos pridėjimo yra pirmasis analizės metodo pakartojamumo ir bandomosios medžiagos įdėjimo metodikos tolygumo rodiklis. Vėlesnių bandymo etapų atgavimo laipsnis gaunamas atliekant masių balansą (kai naudojama žymėtoji medžiaga). Žymėtųjų ir nežymėtųjų cheminių medžiagų atgavimo laipsnis turi būti nuo 90 % iki 110 % (7). Jei šį intervalą techniškai sunku pasiekti, nežymėtosioms cheminėms medžiagoms leidžiamas 70 % atgavimo laipsnis, tačiau jį reikia pagrįsti.

▼C1

1.7.2. **Analizės metodo pakartojamumas ir jautrumas**

Vėliau analizės metodo (-ų), taikyto (-ų) bandomajai medžiagai ir hidrolizės produktams kiekybiškai nustatyti, pakartojamumas gali būti tikrinamas atliekant tų pačių buferinių tirpalų (arba jų ekstraktų) kartotinę analizę, kai susidaro kiekybiniam nustatymui pakankamas hidrolizės produktų kiekis.

Analizės metodas turi būti pakankamai jautrus bandomajai medžiagai kiekybiškai nustatyti, kai jos koncentracija sumažėja iki 10 % pradinės koncentracijos arba dar labiau. Be to, prireikus analizės metodai turi būti pakankamai jautrūs visų hidrolizės produktų kiekiui nustatyti, kai jie sudaro 10 % arba daugiau įdėtos medžiagos koncentracijos (bet kuriuo tyrimo metu) iki 25 % arba mažiau jų didžiausios koncentracijos.

1.7.3. **Hidrolizės kinetikos duomenų pasikliovimo intervalai**

Turėtų būti apskaičiuoti ir pateikti visų regresijos koeficientų, greičio konstantų, pusėjimo trukmės verčių ir visų kitų kinetinių parametrų (pvz., DT50) pasikliovimo intervalai.

1.8. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.8.1. **Įranga ir aparatūra**

Tyrimas turėtų būti atliekamas naudojant stiklinius indus (pvz., mėgintuvėlius, mažas kolbas), tamsoje ir steriliomis sąlygomis, jei būtina, išskyrus atvejus, kai išankstinė informacija (pvz., pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolis/vanduo)) rodo, kad bandomoji medžiaga gali prilipti prie stiklo. Tokiu atveju reikėtų numatyti kitas medžiagas (pvz., tefloną). Bandomosios medžiagos sukibimo su stiklu problema gali būti iš dalies sumažinta taikant vieną iš šių metodų:

— nustatyti bandymo indų stiklo sorbuotos bandomosios medžiagos ir hidrolizės produktų masę,

— naudoti ultragarso vonią,

— užtikrinti, kad kiekvienu bandinio ėmimo laikotarpiu visi stikliniai indai būtų plaunami tirpikliu,

— naudoti produktų preparatus,

— naudoti padidintą antrojo tirpiklio kiekį bandomajai medžiagai į sistemą įdėti; jei naudojamas antrasis tirpiklis, jis neturėtų sukelti bandomosios medžiagos hidrolizės.

Paprastai reikia turėti purtykles su reguliuojamos temperatūros vandens vonia arba reguliuojamos temperatūros inkubatorius įvairiems bandomiesiems tirpalams inkubuoti.

Reikia turėti tipinę laboratorinę įrangą, įskaitant, visų pirma, šią:

— pH metrą,

▼C1

— analizės prietaisus, pvz., dujų chromatografijos (GC), efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC), plonasluoksnės chromatografijos (TLC) įrangą, įskaitant atitinkamas aptikimo sistemas žymėtosioms ir nežymėtosioms medžiagoms analizuoti arba atvirkštinio izotopų skiedimo metodo įrangą,

— nustatymo prietaisus (pvz., MS, GC-MS, HPLC-MS, MBR ir t. t.),

— skysčių scintiliacinį skaitiklį,

— dalijamuosius piltuvus, skirtus skysčius ekstrahuoti skysčiais,

— įrangą tirpalams ir ekstraktams koncentruoti (pvz., sukamąjį garintuvą),

— temperatūros reguliavimo įtaisą (pvz., vandens vonią).

Cheminius reagentus sudaro, pvz.:

— analiziškai gryni organiniai tirpikliai, pvz., heksanas, dichlormetanas ir kt.,

— scintiliacinis skystis,

— buferiniai tirpalai (išsami informacija pateikta 1.8.3 skirsnyje).

Visi hidrolizės bandymams naudojami stikliniai indai, analiziškai grynas vanduo ir buferiniai tirpalai turėtų būti sterilizuoti.

1.8.2. **Bandomosios medžiagos įdėjimas**

Tiriamoji medžiaga turi būti įpilama kaip vandeninis tirpalas į skirtingus buferinius tirpalus (žr. 3 priedėlį). Jei būtina siekiant užtikrinti tinkamą ištirpinimą, bandomosios medžiagos įdėjimui ir paskirstymui leidžiama naudoti nedidelį su vandeniu maišių tirpiklių kiekį (pvz., acetonitrilo, acetono, etanolio), bet jis paprastai turi būti ne didesnis kaip 1 % v/v. Jei numatoma naudoti didesnę tirpiklių koncentraciją (pvz., mažai tirpių bandomųjų medžiagų atveju), tai galėtų būti leistina tik tais atvejais, kai galima įrodyti, kad tirpiklis neturi įtakos bandomųjų medžiagų hidrolizei.

Preparatų paprastai nerekomenduojama naudoti, nes negalima atmesti galimybės, kad preparato ingredientai gali paveikti hidrolizės procesą. Tačiau jei bandomosios medžiagos yra mažai tirpios vandenyje arba limpa prie stiklo (ž. 1.8.1 skirsnį), preparato naudojimas gali būti tinkama išeitis.

Naudojama tik viena bandomosios medžiagos koncentracija; ji neturi būti didesnė kaip 0,01 mol/l arba kaip pusė soties koncentracijos (žr. 1 priedėlį).

▼C1

1.8.3. **Buferiniai tirpalai**

Hidrolizės bandymas turi būti atliekamas, kai pH vertės yra 4, 7 ir 9. Todėl buferiniai tirpalai turi būti paruošiami naudojant analiziškai grynus reagentus ir vandenį. Kai kurios tinkamos buferinės sistemos pateiktos 3 priedėlyje. Reikia pažymėti, kad naudojama buferinė sistema gali daryti įtaką hidrolizės greičiui, ir, kai tai stebima, reikia naudoti kitą buferinę sistemą ([1]).

Kiekvieno buferinio tirpalo pH vertė turi būti tikrinama kalibruotu pH-metru, kurio tikslumas būtų bent 0,1, esant reikiamai temperatūrai.

1.8.4. **Bandymo sąlygos**

1.8.4.1. *Bandymo temperatūra*

Hidrolizės bandymai turėtų būti atliekami esant pastoviai temperatūrai. Norint ekstrapoliuoti, svarbu užtikrinti temperatūros pastovumą bent ± 0,5 °C tikslumu.

Pradinis bandymas (1 pakopa) atliekamas 50 °C temperatūroje, jei nežinomos bandomosios medžiagos hidrolizės savybės. Aukštesnių pakopų kinetiniai bandymai atliekami esant bent trims skirtingoms temperatūros vertėms (įskaitant bandymą esant 50 °C), nebent atliekant 1 pakopos bandymą nustatoma, kad bandomoji medžiaga yra atspari hidrolizei. Siūlomas temperatūros intervalas – 10–70 °C (gerai būtų, kad viena iš temperatūros verčių būtų mažesnė kaip 25 °C), į kurį patektų ataskaitoje pateikiama 25 °C temperatūra ir didesnė dalis lauko sąlygomis pasitaikančios temperatūros verčių.

1.8.4.2. *Šviesa ir deguonis*

Visi hidrolizės bandymai turėtų būti atliekami taikant bet kurį iš tinkamų metodų, kuris leistų išvengti fotolizės reiškinių. Reikėtų imtis visų tinkamų priemonių, kad nepatektų deguonis (pvz., prieš ruošiant tirpalą, 5 minutes barbotuoti helį, azotą arba argoną).

1.8.4.3. *Bandymo trukmė*

Pradinis bandymas turėtų būti atliekamas 5 paras, o aukštesniųjų pakopų bandymai turėtų būti atliekami tol, kol hidrolizuojasi 90 % bandomosios medžiagos, bet ne ilgiau kaip 30 parų.

1.8.5. **Bandymo procedūra**

1.8.5.1. *Pradinis bandymas (1 pakopa)*

Pradinis bandymas atliekamas esant 50 ± 0,5 °C ir pH 4,0, 7,0 ir 9,0. Jei po 5 parų hidrolizuojasi mažiau kaip 10 % ($t_{o,5,\ 25\ °C} > 1$ metai) medžiagos, bandomoji medžiaga priskiriama hidrolizei atsparioms medžiagoms ir paprastai daugiau bandyti nereikia. Jei žinoma, kad medžiaga yra nepatvari ([2]) aplinkos temperatūrą atitinkančiomis sąlygomis, pradinio bandymo atlikti nereikia. Analizės metodas turi būti pakankamai tikslus ir jautrus, kad juo būtų galima nustatyti pradinės koncentracijos sumažėjimą 10 %.

([1]) Mabey ir Mill rekomenduoja vietoj fosfatinio naudoti boratinį arba acetatinį buferinį tirpalą (11).

([2]) Tokią informaciją galima gauti iš kitų šaltinių, pvz., gimininges struktūros junginių hidrolizės duomenys, nurodyti literatūroje arba gauti atliekant kitus pradinius, pusiau kiekybinius bandomosios medžiagos hidrolizės bandymus ankstesnėje parengtinėje stadijoje.

▼C1

1.8.5.2. *Nepatvarių medžiagų hidrolizė (2 pakopa)*

Aukštesnės pakopos (sudėtingesnis) bandymas turi būti atliekamas esant tokioms pH vertėms, kurioms esant pradinio bandymo metu buvo nustatytas medžiagos nepatvarumas. Pasirinkta bandomosios medžiagos buferinių tirpalų temperatūra palaikoma naudojant termostatą. Pirmojo laipsnio hidrolizei patikrinti, kiekvienas reakcijos tirpalas turėtų būti analizuojamas tokiais laiko tarpais, kad būtų gauti bent šeši atskiri duomenų taškai – paprastai nuo 10 % iki 90 % pradinės medžiagos hidrolizės. Atskiri kartotiniai bandiniai (bent du bandiniai iš atskirų reakcijos indų) imami ir jų turinys analizuojamas bent šešis kartus (kad būtų gauta ne mažiau kaip dvylika kartotinių duomenų taškų). Laikoma, kad nepakanka naudoti vieną didelį ėminį, iš kurio būtų imamos atskiros alikvotinės bandomojo tirpalo dalys kiekvienu mėginio ėmimo momentu, kadangi toks būdas neleidžia analizuoti duomenų kintamumo ir gali kilti problemų dėl bandomojo tirpalo užteršimo. Sterilumo patvirtinimo bandymai turėtų būti atliekami baigus aukštesnės pakopos bandymą (t. y. įvykus 90 % hidrolizei arba po 30 parų). Tačiau jei skaidymas (t. y. virsmas) nestebimas, sterilumo bandymų atlikti nebūtina.

1.8.5.3. *Hidrolizės produktų nustatymas (3 pakopa)*

Visi pagrindiniai hidrolizės produktai, bent tie, kurie sudaro > 10 % naudotos dozės, turėtų būti nustatomi taikant tinkamus analizės metodus.

1.8.5.4. *Neprivalomi bandymai*

Hidrolizei neatsparią bandomąją medžiagą gali tekti bandyti papildomai, esant kitoms nei 4, 7 ir 9 pH vertėms. Pvz., dėl fiziologinių priežasčių gali reikėti atlikti bandymą rūgštesnėje terpėje (pvz., kai pH yra 1,2) ir esant vienai fiziologiškai artimai temperatūros vertei (37 °C).

2. **DUOMENYS**

Bandomosios medžiagos ir hidrolizės produktų, jei jų yra, kiekis, nustatytas kiekvienu bandinio ėmimo etapu, kiekvienai pH vertei bei bandymo temperatūrai, turėtų būti nurodytas įdėtos pradinės koncentracijos % ir, prireikus, mg/l. Be to, naudojant žymėtąją bandomąją medžiagą, turėtų būti pateikiamas masių balansas, išreikštas įdėtos pradinės medžiagos koncentracijos procentine dalimi.

Ataskaitoje pateikiamas logaritminis bandomosios medžiagos koncentracijos kaip laiko funkcijos duomenų grafikas. Be to, turi būti nustatyti visi pagrindiniai hidrolizės produktai, bent tie, kurių kiekis sudaro ≥ 10 % įdėtos dozės, ir jų susidarymo bei išnykimo greičiams parodyti turi būti gauti jų koncentracijos logaritmo kaip laiko funkcijos grafikai, kokie buvo gauti pradinės medžiagos atveju.

▼C1

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Pusėjimo trukmės arba DT_{50} vertės nustatomos tiksliau, taikant atitinkamo kinetinio modelio apskaičiavimus. Pusėjimo trukmės ir (arba) DT_{50} vertės (įskaitant pasikliovimo ribas) pateikiamos kiekvienai pH ir temperatūros vertei, kartu aprašomas taikytas modelis, kinetikos laipsnis ir nustatymo koeficientas (r^2). Be to, jei tinka, apskaičiavimai taikomi hidrolizės produktams.

Atliekant greičio tyrimus, esant skirtingoms temperatūros vertėms, pseudopirmojo laipsnio hidrolizės greičio konstantos (k_{obs}) turėtų būti aprašytos kaip temperatūros funkcija. Apskaičiavimas turėtų būti pagrįstas k_{obs} konstantos padalijimu į hidrolizės, katalizuojamos rūgštine, neutralia ir šarmine terpe, konstantas (atitinkamai k_H, $k_{neutral}$ ir k_{OH}) ir Arenijaus lygtimi:

$$k_{obs} = (k_H[H^+]) + (k_{neutral}) + (k_{OH}[OH^-]) = \left(\left(\sum_{i=H,neutral,OH} \right) \left(A_i e^{-B_i/T} \right) \right)$$

kurioje A_i ir B_i yra geriausios atitikties tiesių, gautų naudojant tiesinę ln k_i kaip atvirkštinės absoliučiosios temperatūros (T) funkcijos regresiją, atkarpa ir krypties koeficientas. Taikant Arenijaus lygtis hidrolizei, katalizuojamai rūgštine, neutralia ir šarmine terpe, gaunamos pseudopirmojo laipsnio greičio konstantos, taigi pusėjimo trukmės vertės gali būti apskaičiuotos kitoms temperatūros vertėms, kurioms tiesioginis greičio konstantos nustatymas bandymo keliu yra neįmanomas (10).

2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Didžioji dalis hidrolizės reakcijų vyksta pseudopirmojo laipsnio reakcijos greičiu, taigi pusėjimo trukmės vertės nepriklauso nuo koncentracijos (žr. 2 priedėlio 4 lygtį). Dėl šios priežasties laboratorinius rezultatus, gautus 10–2–10–3 mol/l, paprastai galima taikyti aplinkos sąlygoms (≤ 10–6 mol/1) (10). Kelis įvairių cheminių medžiagų hidrolizės greičių, išmatuotų švariame ir gamtiniame vandenyje, gero sutapimo pavyzdžius, jei buvo matuojamos pH ir temperatūros vertės, paskelbė Mabey ir Mill (11).

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti bent ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

— įprastas pavadinimas, cheminis pavadinimas, CAS numeris, struktūrinė formulė (rodanti žymėtojo atomo padėtį, jei naudojama žymėtoji medžiaga) ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės (žr. 1.5 skirsnį),

— bandomosios medžiagos grynumas (priemaišos),

— radiocheminis žymėtosios cheminės medžiagos grynumas ir molinis aktyvumas (jei tinka).

▼C1

— Buferiniai tirpalai:

— ruošimo datos ir išsami informacija,

— naudoti buferiniai tirpalai ir vanduo,

— buferinių tirpalų molinė koncentracija ir pH.

Bandymo sąlygos:

— tyrimų atlikimo datos,

— įdėtos bandomosios medžiagos kiekis,

— metodai ir tirpikliai (tipas ir kiekis), naudoti bandomajai medžiagai įdėti,

— inkubuojamų buferuotų bandomosios medžiagos tirpalų tūris,

— naudotos inkubavimo sistemos aprašymas,

— pH ir temperatūra tyrimo laikotarpiu,

— mėginių ėmimo laikas,

— ekstrahavimo metodas (-ai),

— bandomosios medžiagos ir jos hidrolizės buferiniuose tirpaluose kiekybinio nustatymo ir identifikavimo metodai,

— kartotinių bandinių skaičius.

Rezultatai:

— taikytų analizės metodų pakartojamumas ir jautrumas,

— atgavimo laipsnio vertės (tinkamu patvirtinto tyrimo % vertės yra pateiktos 1.7.1 skirsnyje),

— kartotinių bandinių duomenys ir vidurkiai lentelių pavidalu,

— masių balansas tyrimų eigoje ir jų pabaigoje (kai naudojama žymėtoji bandomoji medžiaga),

— pradinio bandymo rezultatai,

— rezultatų aptarimas ir aiškinimas,

— visi pradiniai duomenys ir skaičiai.

Šią informaciją reikia pateikti tik nustačius hidrolizės greitį:

— bandomosios medžiagos ir, jei tinka, hidrolizės produktų koncentracijos verčių kaip laiko funkcijos grafikus kiekvienai pH ir temperatūros vertei,

— Arenijaus lygties rezultatų duomenis esant 20 °C/25 °C temperatūrai, pH vertes, greičio konstantą [h^{-1} arba $para^{-1}$], pusėjimo trukmę arba DT_{50}, temperatūros vertes [°C], įskaitant pasikliovimo ribas ir koreliacijos koeficientus (r^2), arba palyginamąją informaciją;

— siūlomą hidrolizės kelią.

▼C1

4. **NUORODOS**

1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adopted 12 May 1981.

2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

4) European Union (ES) (1995). Commission Directive 95/36/EC amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex V: Fate and Behaviour in the Environment.

5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and SAFEty Publications Series on Testing and Assessment Nr. 23.

9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994–2000): Addenda 6–11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

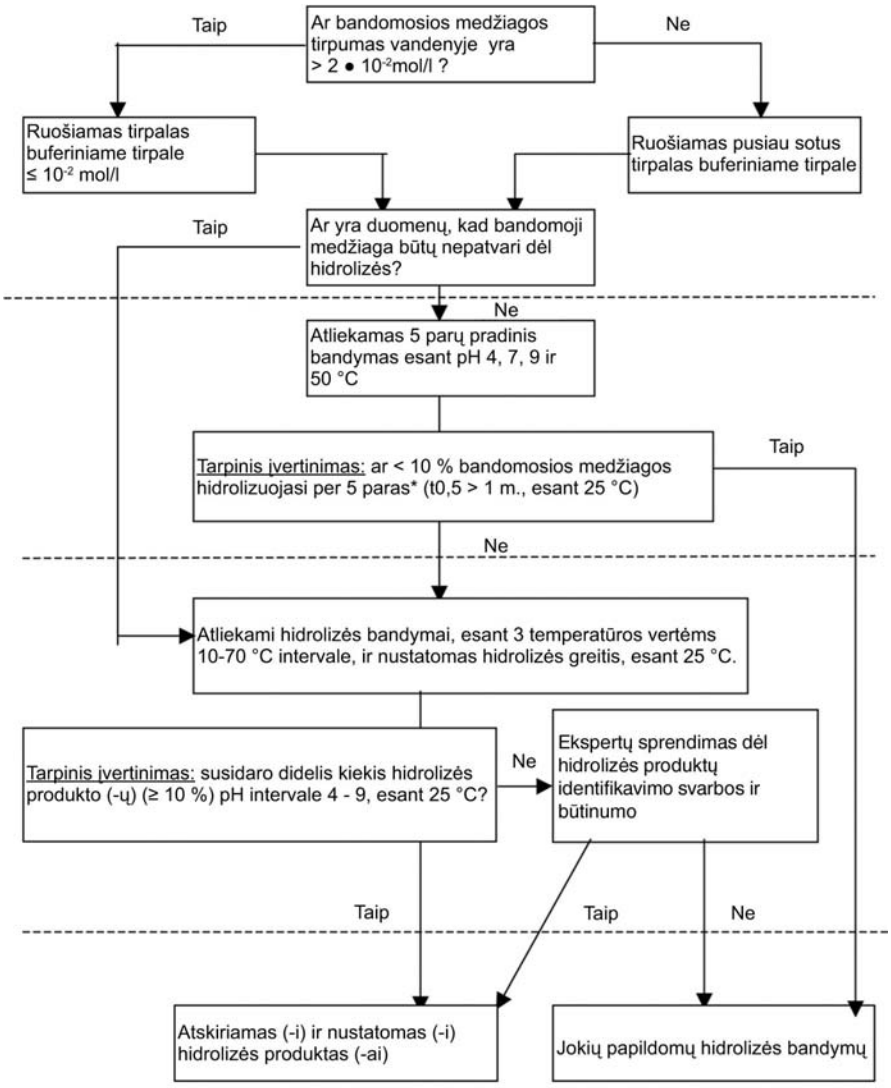
10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383–415.

▼C1

1 priedėlis

Pakopinio hidrolizės bandymo schema



* Bandomosios medžiagos hidrolizės laipsnis 10 %, esant 50 °C, atitinka maždaug 30 parų pusėjimo trukmę, o tai atitinka maždaug 1 metų vertę, esant 25 °C Nu

▼C1

2 priedėlis

Apibrėžtys ir vienetai

Visais atvejais turėtų būti naudojami ***Tarptautinės vienetų sistemos (SI)*** vienetai.

Bandomoji medžiaga – bet kuri medžiaga, ar tai būtų pradinis junginys ar atitinkami virsmo produktai.

Virsmo produktai – visos medžiagos, susidarančios vykstant biotiniam arba abiotiniam bandomosios medžiagos virsmui.

Hidrolizės produktai – visos medžiagos, susidarančios vykstant bandomosios medžiagos hidrolizinio virsmo reakcijoms.

Hidrolizė – bandomosios medžiagos RX reakcija su vandeniu, kai reakcijos centro X grupė pakeičiama vien tik OH:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Pagal šią supaprastintą proceso lygtį RX koncentracijos mažėjimo greitis aprašomas lygtimi:

greitis = $k\ [H_2O]\ [RX]$ antrojo laipsnio reakcija

arba

greitis = $k\ [RX]$ pirmojo laipsnio reakcija

priklausomai nuo greitį ribojančios stadijos. Kadangi palyginus su bandomosios medžiagos koncentracija vandens perteklius yra didelis, šio tipo reakcija paprastai aprašoma pseudopirmojo laipsnio reakcija, kurios stebima greičio konstanta aprašoma lygtimi:

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

ir gali būti nustatyta taikant šią išraišką (*):

$$k_{obs} = \left(\frac{(1)}{(t)}\right) \ln \left(\frac{(C_o)}{(C_t)}\right) \qquad [3]$$

čia t – laikas,

C_0, C_t – RX koncentracija laike 0 ir t.

Šios konstantos vienetų dimensija $(laikas)^{-1}$, o reakcijos pusėjimo trukmė (laikas, per kurį sureaguoja 50 % RX) aprašoma lygtimi:

$$t_{0,5} = \left(\frac{(\ln 2)}{(k_{obs})}\right) \qquad [4]$$

Pusėjimo trukmė ($t_{0,5}$) – laikas, per kurį hidrolizuojasi 50 % bandomosios medžiagos, kai reakcija gali būti aprašyta pirmojo laipsnio kinetika; trukmė nepriklauso nuo koncentracijos.

(*) Jei logaritminis duomenų kaip laiko funkcijos grafikas nėra tiesė (aprašanti pirmojo laipsnio reakcijos greitį), [3] lygtis netinka bandomojo junginio hidrolizės greičio konstantai nustatyti.

▼C1

DT_{50} (išnykimo trukmė 50) – laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 50 %; ši trukmė ir pusėjimo trukmė $t_{0,5}$ skiriasi, kai reakcija neatitinka pirmojo laipsnio kinetikos.

k įvertinimas esant skirtingoms temperatūros vertėms

Kai reakcijos greičio konstantos žinomos dviem temperatūros vertėms, reakcijos greičio konstantos vertės kitai temperatūrai gali būti apskaičiuotos taikant Arenijaus lygtį:

$$k = \left(A \times e^{-\left(\frac{E}{R \times T}\right)} \right) \text{ arba } \ln k = \left(\frac{(-E)}{(R \times T)} \right) + \ln A$$

ln k kaip l/T funkcijos grafikas yra tiesė, kurios krypties koeficientas – E/R

čia:

k = greičio konstanta, išmatuota esant skirtingoms temperatūros vertėms,

E = aktyvacijos energija [kJ/mol],

T = absoliučioji temperatūra [K],

R = dujų konstanta [8,314 J/mol. K]

Aktyvacijos energija buvo apskaičiuota, taikant regresinę analizę arba šią lygtį:

$$E = R \times \left(\frac{(\ln k_2 - ln\, k_1)}{\left(\left(\frac{(1)}{(T_1)}\right) - \left(\frac{(1)}{(T_2)}\right) \right)} \right)$$

čia: $T_2 > T_1$.

▼C1

3 priedėlis

Buferinių tirpalų sistemos

A. **CLARK IR LUBS**

CLARK ir LUBS buferiniai mišiniai (*)

Sudėtis	pH
0,2 N HCl ir 0,2 N KCl esant 20 °C	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl skiesti iki 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl skiesti iki 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl skiesti iki 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl skiesti iki 100 ml	1,6
8,3 ml HC1 + 25 ml KCl skiesti iki 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl skiesti iki 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl skiesti iki 100 ml	2,2
0,1 M kalio biftalato + 0,1 N HCl esant 20 °C	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalato iki 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato iki 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato iki 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato iki 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato iki 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato iki 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato iki 100 ml	3,4
97 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato iki 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato iki 100 ml	3,8
0,1 M kalio biftalato + 0,1 N NaOH esant 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	4,8

(*) Šiose lentelėse pateiktos pH vertės buvo apskaičiuotos pagal potencialo matavimus, taikant Sorensen standartines lygtis (1909 m.). Atitinkamos pH vertės yra 0,04 vieneto didesnės nei nurodytos lentelėje.

▼C1

Sudėtis	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalato iki 100 ml	6,0

CLARK ir LUBS buferiniai mišiniai (tęsinys)

0,1 M kalio dihidrofosfato + 0,1 N NaOH esant 20 °C	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	8,0
0,1 M H_3BO_3 + 0,1 M KC1 + 0,1 N NaOH esant 20 °C	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	9,2

▼C1

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF IR VLEESCHOUWER**

KOLTHOFF ir VLEESCHOUWER citratiniai buferiniai tirpalai

Sudėtis	pH
0,1 M monokalio citrato ir 0,1 N HC1, esant 18 °C (*)	
49,7 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato iki 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato iki 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato iki 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato iki 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato iki 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato iki 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato iki 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato iki 100 ml	3,6
0,1 M monokalio citrato ir 0,1 N NaOH, esant 18 °C (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	6,0

(*) Apsaugai nuo pelėsių augimo įdedamas nedidelis timolio arba panašios medžiagos kristalas.

▼C1

C. **SÖRENSEN**

SÖRENSEN boratiniai mišiniai

Sudėtis		Sörensen 18 °C	*Walbum*, pH, esant		
ml borakso	ml HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M borato + 0,1 N HC1					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 M borato + 0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

SÖRENSEN fosfatiniai mišiniai

Sudėtis	pH
0,0667 M monokalio fosfato + 0,0667 M dinatrio fosfato, esant 20 °C	
99,2 ml KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼C1

53,4 ml KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼C1

C.8. **TOKSIŠKUMAS SLIEKAMS**

DIRBTINIO DIRVOŽEMIO BANDYMAS

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Šiame laboratoriniame bandyme bandomoji medžiaga maišoma su dirbtiniu dirvožemiu, į kurį 14 parų dedami sliekai. Kai baigiasi šis laikas (ir neprivalomai po septynių parų), tiriamas medžiagos mirtinas poveikis sliekams. Bandyme pateiktas metodas, kaip daryti palyginus greitą medžiagų, kurios per odą ir virškinimo traktą veikia sliekus, poveikio patikrinimą

1.2. APIBRĖŽTIS IR VIENETAS

LC_{50} – koncentracija medžiagos, dėl kurios, kaip nustatyta, per bandymo laiką žūsta 50 % bandomųjų gyvūnų.

1.3. ETALONINĖ MEDŽIAGA

Periodiškai naudojama etaloninė medžiaga, kaip priemonė parodyti, kad bandymo sistemos jautrumas žymiai nepakito.

Etalonine medžiaga rekomenduojama naudoti analiziškai gryną chloracetamidą.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Dirvožemis yra nepastovi terpė, todėl šiame bandyme naudojamas tiksliai apibrėžtas dirbtinis priemolio dirvožemis. Suaugę *Eisenia foetida* rūšies sliekai (žr. priedėlio pastabą) laikomi apibrėžtos sudėties dirbtiniame dirvožemyje, apdorotame įvairios koncentracijos bandomąja medžiaga. Indų turinys po 14 parų (ir neprivalomai po septynių parų) nuo bandymo pradžios yra pasklaidomas ant padėklo, ir kiekvienai naudotai koncentracijai skaičiuojami likę gyvi sliekai.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Bandymas sudarytas taip, kad atkuriamumas bandymo substrato ir organizmo atžvilgiu būtų kiek įmanoma geresnis. Gaištamumas kontroliniuose bandiniuose bandymo pabaigoje turi būti ne didesnis kaip 10 %, kitaip bandymas yra netinkamas.

1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.6.1. *Medžiagos*

1.6.1.1. Bandymo substratas

Bandymo pagrindiniu substratu naudojamas apibrėžtas dirbtinis dirvožemis.

a) Pagrindinis substratas (procentinė sudėtis skaičiuojama sausos medžiagos masei)

— 10 % samanų durpių (pH reikšmė kiek įmanoma arčiau 5,5–6,0, be matomų augalų liekanų ir smulkiai maltų),

▼C1

— 20 % kaolinito molio; pageidautina, kad kaolinito jame būtų daugiau kaip 50 %,

— apie 69 % pramoninio kvarco smėlio (daugiausia tai turi būti smulkus smėlis, kurio daugiau kaip 50 % dalelių dydis būtų nuo 0,05 iki 0,2 mm). Jei medžiagos dispergavimas vandenyje nepakankamas, kiekvienam bandymo indui reikėtų turėti 10 g smėlio, kurį vėliau būtų galima maišyti su bandomąja medžiaga,

— apie 1 % kalcio karbonato ($CaCO_3$), smulkiai malto, chemiškai gryno, dedamo padidinti pH vertę iki 6,0 ± 0,5.

b) Bandymo substratas

Bandymo substratas susideda iš pagrindinio substrato, bandomosios medžiagos ir dejonizuoto vandens.

Vanduo jame sudaro maždaug nuo 25 % iki 42 % sauso pagrindinio substrato masės. Vandens kiekis substrate nustatomas džiovinant bandinį 105 °C temperatūroje iki pastoviosios masės. Pagrindinis kriterijus – dirbtinį dirvožemį reikia drėkinti tol, kol nėra stovinčio vandens. Būtina rūpestingai maišyti, kad bandomoji medžiaga tolygiai būtų pasiskirstyta substrate. Bandomosios medžiagos įterpimo į substratą būdas turi būti nurodytas ataskaitoje.

c) Kontrolinis substratas

Kontrolinį substratą sudaro pagrindinis substratas ir vanduo. Jei naudojamas priedas, papildomame kontroliniame bandinyje turi būti toks pat priedo kiekis.

1.6.1.2. Bandymo indai

Maždaug vieno litro talpos stiklinis indas (tinkamai uždengtas plastiko dangčiu, lėkštele ar plastiko plėvele su ventiliacijos angomis), užpildytas tokiu kiekiu drėgno bandymo substrato ar kontrolinio substrato, kuris atitiktų 500 g sauso substrato masę.

1.6.2. *Bandymo sąlygos*

Indai turi būti laikomi nuolat apšviestose klimato kamerose 20 ± 2 °C temperatūroje. Apšvieta turi būti nuo 400 iki 800 liuksų.

Bandymo trukmė – 14 parų, tačiau gaištamumą, pasirinktinai, galima vertinti po septynių parų nuo bandymo pradžios.

1.6.3. *Bandymo procedūra*

Bandomosios medžiagos koncentracijos vertės

Bandomosios medžiagos koncentracija skaičiuojama medžiagos mase sauso pagrindinio substrato masei (mg/kg).

Intervalo nustatymo bandymas

Norint turėti informaciją, kokias koncentracijas naudoti galutiniame bandyme, intervalo nustatymo bandyme gali būti nustatytas koncentracijų, dėl kurių gaištamumas kinta nuo 0 iki 100 %, intervalas.

▼C1

Medžiaga turi būti išbandyta tokios koncentracijos: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg medžiagos kilogramui bandymo substrato (sausos masės).

Jei turi būti atliekamas visas galutinis bandymas, tai intervalo nustatymo bandyme kiekvienai koncentracijai ir kontroliniam bandymui be medžiagos pakaktų po vieną bandymų partiją, kurioje būtų 10 sliekų.

Galutinis bandymas

Intervalo nustatymo rezultatai naudojami parinkti bent penkias geometrinę progresiją sudarančias koncentracijas, kurios apima tik gaištamumo intervalą nuo 0 iki 100 % ir skiriasi pastoviu daugikliu, ne didesniu kaip 1,8.

Bandymai, naudojant tokią koncentracijų seriją, turi leisti kiek įmanoma tiksliau įvertinti LC_{50} vertę ir jos pasikliovimo ribas.

Galutiniame bandyme kiekvienai koncentracijai ir kontroliniam bandymui be medžiagos imamos bent keturios bandymų partijos, kurių kiekvienoje būtų 10 sliekų. Šių lygiagrečių bandymų rezultatai pateikiami vidutinės vertės ir standartinio nuokrypio pavidalu.

Kai dvi gretimos koncentracijos, kurių santykis 1,8, duoda tik 0 % ir tik 100 % gaištamumą, šių dviejų verčių pakanka pažymėti intervalą, į kurį patenka LC_{50}.

Pagrindinio bandymo substrato ir bandomosios medžiagos maišymas

Bandymo substratas turi būti gaminamas, kai tai įmanoma, be jokių priedų, išskyrus vandenį. Prieš pat bandymo pradžią bandomosios medžiagos emulsija ar dispersija dejonizuotame vandenyje ar kitame tirpiklyje sumaišoma su pagrindiniu bandymo substratu arba tolygiai ant jo užpurškiama plonu chromatografiniu ar panašios rūšies purkštuvu.

Jei bandomoji medžiaga netirpsta vandenyje, ji gali būti ištirpinta kuo mažesniame tinkamo organinio tirpiklio tūryje (pvz., heksane, acetone ar chloroforme).

Bandomajai medžiagai tirpinti, disperguoti ar emulguoti galima naudoti tik lengvai garuojančias medžiagas. Prieš naudojant bandymo substratas turi būti vėdinamas. Išgaravusio vandens kiekis turi būti papildytas. Kontroliniame bandinyje turi būti toks pat kiekvieno naudoto priedo kiekis.

Jei bandomoji medžiaga netirpsta ir negali būti disperguota ar emulguota organiniuose tirpikliuose, 10 g smulkaus malto kvarco ir bandomosios medžiagos, kiek jos reikia 500 g sauso dirbtinio dirvožemio apdoroti, mišinys maišomas su 490 g sauso bandomojo substrato.

Kiekvienai bandymų partijai į stiklinį indą dedama šlapio bandymo substrato, atitinkančio 500 g sauso substrato, ir ant bandymo substrato viršaus dedama 10 sliekų, kurie prieš tai 24 valandas buvo laikomi panašiame šlapiame pagrindiniame substrate, po to greitai nuplauti vandeniu, vandens perteklių sugeriant filtriniu popieriumi.

▼C1

Indai uždengiami perforuotu plastikiniu dangčiu, lėkštele ar plėvele, kad substratas nedžiūtų, ir 14 parų laikomi bandymo sąlygomis.

Vertinimas turi būti atliekamas po 14 parų (ir pasirinktinai po septynių parų) nuo bandymo pradžios. Substratas paskleidžiamas ant stiklinės ar nerūdijančio plieno plokštės. Sliekai apžiūrimi ir nustatomas gyvųjų sliekų skaičius. Sliekai laikomi nugaišusiais, jei jie neatsako į švelnų mechaninį priekinio galo dirginimą.

Kai tikrinimas atliekamas po septynių parų, indas vėl užpildomas substratu, ir likę gyvi sliekai dedami ant to paties bandymo substrato viršaus.

1.6.4. *Bandomieji organizmai*

Bandomieji organizmai turi būti suaugę *Eisenia foetida* (žr. priedėlio pastabą) (bent dviejų mėnesių amžiaus su *clitellum*), drėgnų sliekų masė yra nuo 300 iki 600 mg. (Apie auginimo metodą žr. priedėlį.)

2. **DUOMENYS**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS IR VERTINIMAS

Ataskaitoje pateikiamos bandomosios medžiagos koncentracijos su nuoroda į atitinkamą procentinį kiekį nugaišusių sliekų.

Kai duomenys yra tinkami skaičiuoti, LC_{50} vertė ir pasikliovimo ribos ($p = 0,05$) turi būti nustatyti taikant standartinius metodus (Litchfield ir Wilcoxon, 1949, lygiaverčiam metodui). LC_{50} turi būti nurodyta mg bandomosios medžiagos vienam kilogramui bandymo substrato (sauso).

Tais atvejais, kai koncentracijos kreivė yra per stati, kad būtų galima skaičiuoti LC_{50}, pakanka grafinio šios vertės įverčio.

Kai dvi gretimos koncentracijos, kurių santykis 1,8, duoda tik 0 % ir tik 100 % gaištamumą, šių dviejų verčių pakanka pažymėti intervalą, į kurį patenka LC_{50}.

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje pateikiama, jei įmanoma, tokia informacija:

— tvirtinimas, kad bandymas buvo atliekamas pagal aukščiau minėtus kokybės kriterijus,

— atliktas bandymas (intervalo nustatymo bandymas ir (ar) galutinis bandymas),

— tikslus bandymo sąlygų aprašymas arba patvirtinimas, kad bandymas buvo atliktas pagal metodą; turi būti nurodyti visi nukrypimai,

— tikslus aprašymas, kaip bandomoji medžiaga buvo įmaišyta į pagrindinį bandymo substratą,

— informacija apie bandomuosius organizmus (rūšis, amžius, masės vidutinė vertė ir intervalas, laikymo ir auginimo sąlygos, tiekėjas),

▼C1

— metodas, taikytas nustatyti LC_{50},

— bandymo rezultatai, įskaitant visus naudotus duomenis,

— bandomųjų organizmų pastebėtų simptomų ar elgesio pokyčių aprašymas,

— gaištamumas kontroliniuose bandiniuose,

— LC_{50} ar didžiausia bandyta koncentracija, kurioje gaištamumas nulinis, ir mažiausia bandyta koncentracija, kurioje gaištamumas 100 %, 14 parų (pasirinktinai septynios paros) nuo bandymo pradžios,

— koncentracijos ir atsako kreivės brėžinys,

— rezultatai, gauti su etalonine medžiaga, šiame bandyme ar iš ankstesniųjų kokybės kontrolės tyrimų.

4. **NUORODOS**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 207, Decision of the Council C(81)30 final.

2) Edwards, C. A. and Lofty],. R., 1977, Biology of Earthworms, Chapman and Hall, London, p. 331.

3) Bouche. M. B., 1972, Lombriciens de France, Ecologie et Systematique, Institut National de la Recherche Agronomique, p. 671.

4) Litchfield, J. T. andWilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. I. Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, p. 99.

5) Commission of the European Communities, Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, 1983.

6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt fur land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitatstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden“, in: Rudolph/Boje, Okotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼C1

Priedėlis

Sliekų auginimas ir laikymas prieš bandymus

Norint auginti gyvūnus, į auginimo dėžę su šviežiai paruoštu substratu dedama nuo 30 iki 50 suaugusių sliekų, kurie išimami po 14 parų. Šiuos gyvūnus galima naudoti kitoms auginimo partijoms. Iš kokonų gauti sliekai bandymuose naudojami, kai subręsta (nurodytomis sąlygomis po dviejų ar trijų mėnesių).

Laikymo ir auginimo sąlygos

Klimato kamera	: temperatūra 20 ± 2 °C, geriau, jei nuolat apšviesta (apšvieta nuo 400 iki 800 liuksų).
Auginimo dėžės	: tinkami negilūs 10–20 1 tūrio indai.
Substratas	: *Eisenia foetida* gali būti veisiami įvairių gyvulių išmatose. Rekomenduojama auginimo terpe naudoti mišinį, kurį sudaro 50 % pagal tūrį durpės ir 50 % karvių ar arklių mėšlas. Terpės pH vertė turi būti nuo 6 iki 7 (reguliuojama kalcio karbonatu), savitasis joninis laidis mažas (mažesnis nei 6 mohm ar druskos 0,5 % koncentracijos tirpalo). Substratas turi būti drėgnas, bet ne per šlapias. Be aukščiau pateikto metodo galima naudoti kitus sėkmingus būdus.
Pastaba. Eisenia foetida	yra dviejų veislių, kurias kai kurie taksonomijos specialistai išskyrė į rūšis (Bouche, 1972). Šios veislės morfologiškai yra panašios, tačiau viena jų – *Eisenia foetida foetida* – ant segmentų turi tipiškus skersus dryžius ar juostas, o kita – *Eisenia foetida andrei* – to neturi ir yra margos rausvos spalvos. Jei įmanoma, turi būti naudojama *Eisenia foetida andrei*. Galima naudoti ir kitas rūšis, jei yra reikiamos metodikos.

▼C1

C.9. **BIOLOGINIS SKAIDYMAS**

ZAHN-WELLENS BANDYMAS

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Metodo tikslas yra įvertinti vandenyje tirpių, nelakių organinių medžiagų galimą biologinį suskaidymą, kai jas statiniame bandyme veikia palyginti didelės koncentracijos mikroorganizmai.

Ant suspenduotų kietųjų dalelių gali vykti fizikocheminė adsorbcija, ir į tai turi būti atsižvelgta aiškinant rezultatus (žr. 3.2).

Bandomosios medžiagos naudojamos tokios koncentracijos, kad atitiktų DOC vertes intervale nuo 50 iki 400 mg/litre ar COD vertes nuo 100 iki 1 000 mg/litre (DOC = ištirpusi organinė anglis; COD = cheminis deguonies suvartojimas). Šios palyginti didelės koncentracijos turi analizinio patikimumo pranašumą. Junginiai, kurie turi toksinių savybių, gali sulėtinti arba inhibuoti skaidymo procesą.

Bandomosios medžiagos biologiniam suskaidymui įvertinti šiame bandyme taikomas ištirpusios organinės anglies koncentracijos arba cheminio deguonies poreikio matavimas.

Lygiagrečiai taikant specifinį analizės metodą gali būti įmanoma įvertinti medžiagos pirminį biologinį skaidymą (pirminės cheminės sandaros išnykimas).

Metodas tinka tik toms organinėms bandomosioms medžiagoms, kurios bandyme naudojamomis koncentracijomis:

— tirpios vandenyje bandymo sąlygomis,

— garų slėgis bandymo sąlygomis yra labai mažas,

— neinhibuoja bakterijų,

— bandymo sistemoje adsorbuojamos tik ribotu laipsniu,

— iš bandomojo tirpalo nepradingsta dėl putojimo.

Norint paaiškinti gautus rezultatus, ypač kai rezultatai yra žemi arba ribiniai, naudinga būtų turėti informacijos apie bandomosios medžiagos pagrindinių komponentų santykinę dalį.

Kai reikia paaiškinti žemus rezultatus ir pasirinkti tinkamas bandomąsias koncentracijas, pageidautina turėti informacijos apie medžiagos toksiškumą mikroorganizmams.

▼C1

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Bandymo pabaigoje pasiektas skaidymo lygis ataskaitoje pateikiamas kaip „Biologinis skaidumas Zahn-Wellens bandyme“:

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

čia:

D_T = biologinis skaidymas (%) laiku T,

C_A = DOC (ar COD) vertės bandomajame mišinyje po trijų valandų nuo bandymo pradžios (mg/l) (DOC = ištirpusi organinė anglis, COD = cheminis deguonies suvartojimas),

C_T = DOC ar COD vertės bandomajame mišinyje bandinio ėmimo metu (mg/l),

C_B = DOC ar COD vertė tuščiajame bandinyje bandinio ėmimo metu (mg/l),

C_{BA} = DOC ar COD vertė tuščiajame bandinyje, išmatuota po trijų valandų nuo bandymo pradžios (mg/l).

Skaidymo laipsnis apvalinamas iki artimiausio sveikojo procentų skaičiaus.

Skaidymo procentinė vertė nurodoma kaip bandomosios medžiagos DOC (ar COD) pašalinimo procentinė vertė.

Skaidymo vertės, išmatuotos po trijų valandų, ir apskaičiuotos, bet geriau išmatuotos, pradinės vertės skirtumas gali suteikti naudingos informacijos apie medžiagos šalinimą (žr. 3.2. Rezultatų aiškinimas).

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Kai kuriais atvejais, kai tiriamos naujos medžiagos, etaloninės medžiagos gali būti naudingos, tačiau specifinės etaloninės medžiagos vis dar negali būti rekomenduotos.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Aktyvusis dumblas, mineralinė mitybinė terpė ir bandomoji medžiaga, kaip vienintelis anglies šaltinis vandeniniame tirpale, dedami kartu į vieno–keturių litrų tūrio stiklinį indą su maišikliu ir aeratoriumi. Mišinys ne ilgiau kaip 28 paras maišomas ir aeruojamas 20–25 °C temperatūroje išsklaidytoje šviesoje arba tamsioje patalpoje. Skaidymo procesas kontroliuojamas nustatant DOC (ar COD) vertes filtruotame tirpale kasdien ar kitokiais reguliariais tinkamais laiko tarpais. Po kiekvieno matavimo nustatytos DOC (ar COD) pašalinimo vertės ir vertės, gautos po trijų valandų nuo bandymo pradžios, santykis reiškiamas procentine biologinio skaidymo verte ir yra naudojamas kaip tam momentui nustatytas skaidymo laipsnio matas. Rezultatas brėžiamas kaip kitimas laike ir gaunama biologinio skaidymo kreivė.

Kai taikomas specifinis analizės metodas, galima nustatyti pradinės medžiagos koncentracijos pokyčius dėl jos molekulių biologinio skaidymo (pirminis biologinis skaidumas).

▼C1

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Tarplaboratorinio lyginimo bandymas parodė, kad šio metodo atkuriamumas yra tinkamas.

Metodo jautrumas labai priklauso nuo tuščiojo bandinio kintamumo ir, kiek mažiau, nuo ištirpusios organinės anglies nustatymo preciziškumo ir bandomosios medžiagos kiekio skystyje.

1.6. BANDYMO METODIKOS APRAŠYMAS

1.6.1. *Pasirengimas*

1.6.1.1. Reagentai

Bandymo vanduo – geriamasis vanduo, kuriame organinės anglies kiekis < 5 mg/litre. Bendra kalcio ir magnio jonų koncentracija neturi būti didesnė kaip 2,7 mmol/litre; priešingu atveju, reikia atitinkamai skiesti dejonizuotu arba distiliuotu vandeniu.

Sieros rūgštis, analizinis reagentas (A.R.):	50 g/l
Natrio hidroksido tirpalas A.R.:	40 g/l
Mineralinis mitybinis tirpalas: viename litre dejonizuoto vandens ištirpinkite:	
amonio chlorido, NH_4Cl, A.R.:	38,5 g
natrio dihidrofosfato, $NaH_2PO_4x2H_2O$, A.R.:	33,4 g,
kalio dihidrofosfato, KH_2PO_4, A.R.:	8,5 g,
dikalio monohidrofosfato, K_2HPO_4, A.R.:	21,75 g.

Mišinys naudojamas ir kaip mitybinė, ir kaip buferuojanti terpė.

1.6.1.2. Aparatūra

Nuo vieno iki keturių litrų talpos stikliniai indai (pvz., cilindriniai indai).

Maišymo įtaisas su stikliniu ar metaliniu maišikliu ant tinkamo ilgio veleno (maišiklis turi suktis maždaug 5–10 cm virš indo dugno). Vietoj jo galima naudoti magnetinį maišiklį su 7–10 cm ilgio magnetu.

Stiklinis vamzdis, kurio vidinis skersmuo 2–4 mm, orui tiekti. Vamzdžio anga turi būti maždaug 1 cm aukštyje virš indo dugno.

Centrifuga (apie 3 550 g).

pH-metras.

Ištirpusio deguonies matuoklis.

Popieriniai filtrai.

▼C1

Membraninio filtravimo aparatas.

Membraniniai filtrai, akučių dydis 0,45 μm. Membraniniai filtrai tinka, jei užtikrinama, kad filtravimo pakopoje jie neišskiria anglies ir nesugeria medžiagos.

Analizės įranga organinės anglies kiekiui ir cheminiam deguonies suvartojimui nustatyti.

1.6.1.3. Sėjimo kultūros ruošimas

Aktyvusis dumblas iš biologinio valymo įrenginio yra plaunamas (kelis kartus), centrifuguojant arba nusodinant iš bandymo vandens (žr. anksčiau).

Aktyvusis dumblas turi būti atitinkamos būsenos. Tokio dumblo yra tinkamai veikiančiame nuotekų valymo įrenginyje. Norint gauti kiek įmanoma daugiau įvairių bakterijų rūšių ar štamų, gali būti geriau maišyti skirtingų šaltinių sėjimo kultūras (pvz., skirtingų valymo įrenginių, dirvožemio ekstraktų, upės vandens ir t. t.). Mišinys turi būti apdorojamas, kaip aprašyta anksčiau.

Kaip tikrinti aktyviojo dumblo aktyvumą, žr. „Veikimo tikrinimas“, toliau.

1.6.1.4. Bandomųjų tirpalų ruošimas

Į bandymo indą įpilkite 500 ml bandymo vandens, 2,5 ml/litre mineralinio mitybinio tirpalo ir tiek aktyviojo dumblo, kad galutiniame mišinyje sausosios medžiagos būtų nuo 0,2 iki 1,0 g/litre. Įpilkite pakankamą kiekį pradinio bandomosios medžiagos tirpalo, kad DOC koncentracija galutiniame mišinyje būtų nuo 50 iki 400 mg/litre. Atitinkamos COD vertės yra nuo 100 iki 1 000 mg/litre. Praskieskite bandymo vandeniu iki bendrojo tūrio nuo vieno iki keturių litrų. Tai, kokį bendrąjį tūrį pasirinkti, priklauso nuo bandinių skaičiaus, kurie bus imami DOC ar COD nustatyti, ir nuo analizės metodikai reikalingo tūrio.

Paprastai galima laikyti, kad pakanka dviejų litrų tūrio. Kiekvienai bandymų serijai lygiagrečiai ruošiamas bent vienas kontrolinis indas (su tuščiuoju bandiniu); jame yra tik aktyviojo dumblo ir mineralinio mitybinio tirpalo, praskiestų bandymo vandeniu iki to paties tūrio, kaip ir induose su bandomąja medžiaga.

1.6.2. *Bandymo procedūra*

Išsklaidytoje šviesoje ar tamsioje patalpoje 20–25 °C temperatūroje laikomų bandymo indų turinys maišomas magnetinėmis maišyklėmis ar sraigtiniais maišytuvais. Aeruojama suslėgtuoju oru, valomu leidžiant per medvilnės filtrą ir, jei būtina, per plovimo kolbą. Reikia užtikrinti, kad dumblas nenusistovėtų, o deguonies koncentracija būtų ne mažesnė kaip 2 mg/litre.

pH vertė turi būti tikrinama vienodais laiko tarpais (pvz., kasdien) ir, jei būtina, nustatoma 7–8 pH vertė.

▼C1

Garavimo nuostoliai reikiamais kiekiais kompensuojami dejonizuotu ar distiliuotu vandeniu prieš pat kiekvieną bandinio ėmimą. Gerai būtų pažymėti skysčio lygį ant indo sienelės prieš bandymo pradžią. Naujos žymės daromos po kiekvieno bandinio ėmimo (neaeruojant ir nemaišant). Norint aptikti bandomosios medžiagos adsorbciją aktyviuoju dumblu, pirmieji bandiniai visuomet imami po trijų valandų nuo bandymo pradžios.

Bandomosios medžiagos šalinimas sekamas, darant kasdien ar kitais vienodais laiko tarpais DOC ar COD nustatymą. Bandiniai iš bandymo ir tuščiojo bandymo indų filtruojami per kruopščiai išplautą popieriaus filtrą. Pirmieji bandomojo tirpalo filtrato 5 ml išpilami. Sunkiai filtruojamas dumblas gali būti prieš tai pašalintas 10 minučių centrifugavimu. DOC ir COD nustatymas daromas bent po du kartus. Bandymo trukmė ne daugiau kaip 28 paros.

Pastaba. Jei bandiniai lieka drumsti, jie filtruojami per membraninius filtrus. Membraniniai filtrai neturi išskirti ar adsorbuoti jokių organinių medžiagų.

Aktyviojo dumblo veikimo tikrinimas

Norint patikrinti funkcinę aktyviojo dumblo gebą, lygiagrečiai kiekvienai bandymų serijai turi būti atliekamas bandymas su žinoma medžiaga. Buvo nustatyta, kad šiam tikslui tinka dietilenglikolis.

Adaptavimas

Jei analizė atliekama palyginti dažnai (pvz., kasdien), adaptavimą galima aiškiai atpažinti iš skaidymo kreivės (žr. 2 paveikslą). Todėl bandymas neturi būti pradedamas prieš pat savaitgalį.

Jei adaptavimas įvyksta laikotarpio pabaigoje, bandymą galima pratęsti, kol skaidymas bus baigtas.

Pastaba. Jei reikia daugiau žinių apie adaptuoto dumblo elgseną, tas pats aktyvusis dumblas dar kartą naudojamas su ta pačia bandomąja medžiaga pagal tokią metodiką:

Išjunkite maišytuvą ir aeratorių ir leiskite dumblui nusistovėti. Skystį virš dumblo nusiurbkite, įpilkite ne daugiau kaip du litrus bandymo vandens, 15 minučių maišykite ir leiskite vėl nusistovėti. Skystį virš dumblo nusiurbkite dar kartą, likusį dumblą naudokite bandymui su ta pačia medžiaga pagal 1.6.1.4 ir 1.6.2 pakartoti. Vietoj nusodinimo, aktyvųjį dumblą galima atskirti centrifugavimu.

Adaptuotas dumblas gali būti sumaišomas su šviežiu dumblu, kad sausos medžiagos koncentracija būtų nuo 0,2 iki 1 g/litre.

▼C1

Analizės priemonės

Paprastai bandiniai filtruojami per kruopščiai išplautą filtrinį popierių (plaukite dejonizuotu vandeniu).

Bandiniai, kurie lieka drumsti, filtruojami per membraninį filtrą (0,45 μm).

DOC koncentracija bandinių filtratuose (pirmieji 5 ml išpilami) nustatoma du kartus naudojant TOC nustatymo aparatūrą. Jei filtrato negalima analizuoti tą pačią dieną, iki kitos dienos jis turi būti laikomas šaldytuve. Ilgiau laikyti nerekomenduojama.

COD koncentracija bandinio filtratuose nustatoma su COD analizės įranga, taikant toliau 2 nuorodoje aprašytą metodiką.

2. **DUOMENYS IR VERTINIMAS**

DOC ir (ar) COD koncentracija bandiniuose, gautuose pagal 1.6.2, nustatoma bent po du kartus. Skaidymas laiku T apskaičiuojamas pagal formulę (su apibrėžtimis), pateiktą 1.2 aukščiau.

Skaidymo laipsnis apvalinamas iki artimiausio sveikojo procentų skaičiaus. Bandymo pabaigoje pasiekto skaidymo vertė ataskaitoje pateikiama kaip „Biologinis skaidumas Zahn-Wellens bandyme“.

Pastaba. Jei medžiaga visiškai suskaidoma dar nesibaigus bandymo laikui ir rezultatą patvirtina kitą dieną atlikta dar viena analizė, bandymą galima baigti.

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje pateikiama, jei įmanoma, tokia informacija:

— pradinė medžiagos koncentracija,

— visa kita informacija ir bandymų rezultatai, susiję su bandomąja medžiaga, etalonine medžiaga, jei buvo naudota, ir tuščiuoju bandymu,

— koncentracija po trijų valandų,

— biologinio skaidymo kreivė su aprašymu,

— data ir vieta, iš kurios buvo imti bandomieji organizmai, adaptavimo būsena, naudota koncentracija ir t. t.,

— mokslinis bet kokių bandymo metodikos keitimų pagrindimas.

3.2. DUOMENŲ AIŠKINIMAS

Dienas ar savaites vykstantis laipsniškas DOC (COD) šalinimas rodo, kad medžiaga biologiškai skaidoma.

▼C1

Tačiau kai kuriais atvejais reikšmės gali turėti fizikocheminė adsorbcija, ir tai matyti, kai nuo bandymo pradžios per pirmąsias tris valandas vyksta dalinis ar visiškas pašalinimas, o kontrolinio ir bandomojo skysčių virš dumblo skirtumas išlieka netikėtai mažas.

Jei reikia atskirti biologinį skaidymą (ar dalinį biologinį skaidymą) ir adsorbciją, būtina atlikti tolesnius bandymus.

Tai galima daryti įvairiais būdais, tačiau įtikinamiausias būdas yra pamatiniame bandyme (geriau, kad tai būtų respirometrinis bandymas) kaip sėjimo kultūrą naudoti skystį virš dumblo ar dumblą.

Bandomosios medžiagos, kurių neadsorbcinio DOC (COD) šalinimo vertės bandyme yra didelės, turi būti laikomos potencialiai biologiškai skaidomomis. Dalinis neadsorbcinis šalinimas rodo, kad cheminė medžiaga bent kažkiek yra biologiškai skaidoma. Mažos ar nulinės DOC (COD) šalinimo vertės gali būti dėl mikroorganizmų inhibavimo bandomąja medžiaga, tai dar gali parodyti dumblo irimas ir jo kiekio mažėjimas, dėl ko skystis virš dumblo drumsčiasi. Bandymas turi būti pakartotas naudojant mažesnę bandomosios medžiagos koncentraciją.

Naudojant specifinį junginio analizės metodą ar bandomąsias medžiagas su žymėtais ^{14}C atomais, gali būti pasiektas didesnis jautrumas. Jei bandomasis junginys turi ^{14}C, $^{14}CO_2$ surinkimas patvirtintų, kad biologinis skaidymas įvyko.

Kai duomenys pateikiami kaip pirminio biologinio skaidymo rezultatai, turi būti paaiškinta, jei tai įmanoma, kaip pakito cheminė sandara, kad neliko pradinės bandomosios medžiagos atsako.

Turi būti pateiktas analizės metodo tinkamumo patvirtinimas ir tuščiojo bandinio terpėje nustatyta skaidymo vertė.

4. **NUORODOS**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 B, Decision of the Council C(81) 30 final.

2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC (OL L 251, 1984 9 19, p. 1).

▼C1

Priedėlis

VERTINIMO PAVYZDYS

Organinis junginys:	4-Etoksibenzoinė rūgštis
Teorinė bandomoji koncentracija:	600 mg/l
Teorinis DOC kiekis:	390 mg/l
Sėjimo kultūra	Nuotekų valymo įrenginys…
Koncentracija:	1 gramas sausos medžiagos/litre
Adaptavimo būsena:	Neadaptuotas
Analizė:	DOC nustatymas
Bandinio kiekis:	3 ml
Kontrolinė medžiaga:	Dietilenglikolis
Junginio toksiškumas:	Nėra toksiškumo požymių, kai jo mažiau kaip 1 000 mg/l Taikytas bandymas: fermentavimo mėgintuvėlių bandymas

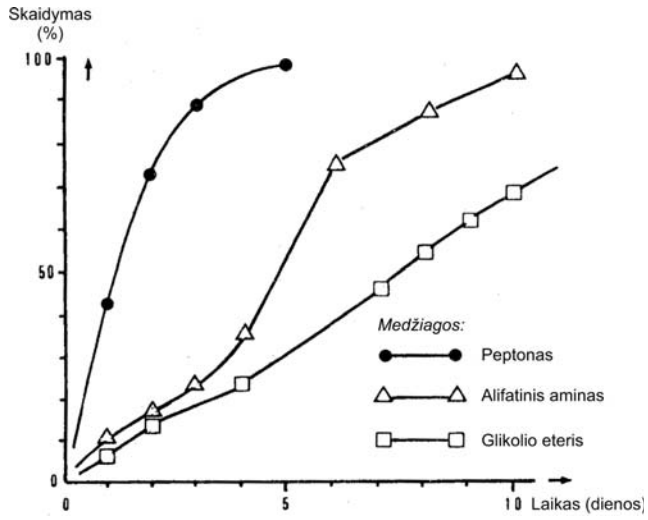
Bandymo trukmė	Kontrolinė medžiaga				Bandomoji medžiaga		
	Tuščiojo bandinio DOC ([1]) mg/l	DOC ([1]) mg/l	DOC grynasis kiekis mg/l	Skaidymas %	DOC ([1]) mg/l	DOC grynasis kiekis mg/l	Skaidymas %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 valandos	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 para	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 paros	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 paros	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 paros	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 paros	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 paros	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 paros	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 parų	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

([1]) Trijų matavimų vidutinė vertė.

▼C1

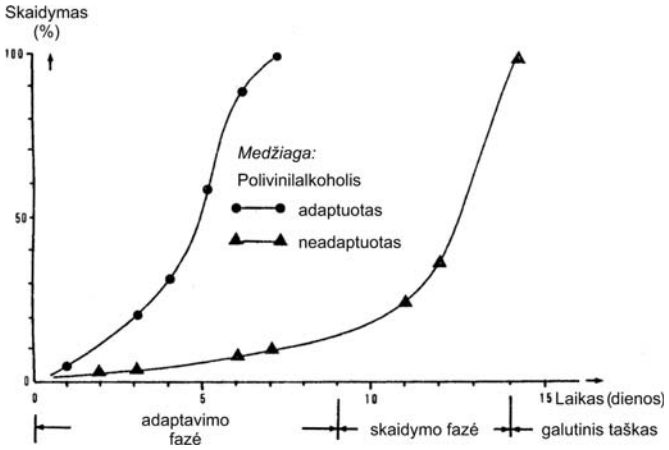
1 paveikslas

Biologinio skaidymo kreivių pavyzdžiai



2 paveikslas

Dumblo adaptavimo pavyzdžiai



▼M4

C.10. **AEROBINIO NUOTEKŲ TVARKYMO MODELIAVIMO BANDYMAS: C.10-A: VEIKLIOJO DUMBLO AERATORIAI. C.10-B: BIOLOGINĖS PLĖVELĖS**

C.10-A: veikliojo dumblo aeratoriai

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka OECD bandymo gaires (TG) 303 (2001) (OECD bandymų gairės Nr. 303). XX a. šeštajame dešimtmetyje buvo suprasta, kad pradėtos naudoti naujos paviršinio aktyvumo medžiagos sukelia pernelyg didelę putodarą nuotekų valymo įrenginiuose ir upėse. Šios medžiagos nebuvo nuodugniai pašalinamos taikant aerobinį valymą ir tam tikrais atvejais jos apribodavo organinės medžiagos šalinimą. Todėl buvo atliekami įvairūs tyrimai siekiant nustatyti, kaip paviršinio aktyvumo medžiagas būtų įmanoma pašalinti iš nuotekų, ir ar pramonės pagamintos naujos cheminės medžiagos atitinka nuotekų valymo reikalavimus. Siekiant šių tikslų taikyti pavyzdiniai įrenginiai, atitinkantys dviejų pagrindinių tipų aerobinį biologinį nuotekų valymą (valymas veikliuoju dumblu ir perkoliacija arba filtravimas). Būtų buvę nepatogu ir labai brangu platinti kiekvieną naują cheminę medžiagą ir stebėti didelius valymo įrenginius net vietiniu mastu.

PRADINIAI SVARSTYMAI

Veikliojo dumblo aeratoriai

2. Pateikiamas veikliojo dumblo pavyzdinių įrenginių, kurių dydis yra 300–2 000 ml aprašymas. Kai kurie įrenginiai ganėtinai panašūs į tikrus įrenginius, t. y. jie turi dumblo nusodintuvus, kai dumblas pumpuojamas atgal į aeracijos rezervuarą, o kituose įrenginiuose nėra nusodintuvo, pvz., Swisher (1). Aparatų dydis turi būti kruopščiai pasirenkamas, nes, pirma, aparatas turi būti ganėtinai didelis, kad būtų tinkamas mechaniniam veikimui, ir pakankamai erdvus, kad iš jo būtų galima imti ėminius nepadarant jokio poveikio aparato eksploatavimui, nors, kita vertus, aparatas netūrėtų būti toks didelis, jog jam reikėtų numatyti daug erdvės ir medžiagų.

3. Plačiausiai ir veiksmingiausiai naudojami dviejų tipų aparatai, t. y. Husmano įrenginiai (2) ir akytųjų indų įrenginiai (3) (4); pirmasis naudojamas tiriant paviršinio aktyvumo medžiagas, kurios aprašytos šiame bandymo metode. Kiti įrenginiai taip pat buvo gana plačiai naudojami, pvz., Eckenfelder (5). Atliekant šį modeliavimo bandymą tenka skirti gana daug lėšų ir gerokai pasistengti, todėl tuo pat metu buvo nagrinėti paprastesni ir pigesni atrankos bandymai (jie pateikiami šio priedo (6) C.4–F skyriuje). Naudojant įvairias paviršinio aktyvumo medžiagas ir kitas chemines medžiagas įrodyta, kad atrankos bandymų reikalavimus atitikusios medžiagos (lengvai biologiškai skaidžios) taip pat buvo suskaidytos atliekant modeliavimo bandymą. Atrankos bandymų reikalavimų neatitikusios kai kurios medžiagos atitiko būdingojo biologinio skaidumo bandymo reikalavimus (šio priedo C.12 (7) ir C.19 (8) skyriai), tačiau tik dalis iš šios grupės medžiagų buvo suskaidytos atliekant modeliavimo bandymą, nors būdingojo biologinio skaidumo bandymo reikalavimų neatitikusios cheminės medžiagos nebuvo suskaidytos atliekant modeliavimo bandymus (9) (10) (11).

4. Tam tikrais tikslais pakanka vienodomis darbo sąlygomis atliktų modeliavimo bandymų; rezultatai pateikiami kaip procentinė pašalintos cheminės bandomosios cheminės medžiagos arba ištirpusios organinės anglies dalis. Šio bandymo aprašymas pateiktas šiame bandymo metode. Tačiau šiame tekste pateikiama keletas variantų, priešingai negu ankstesnėje šio skyriaus versijoje, kurioje aprašytas sintetinių nuotekų valymas tik vieno tipo aparatūra ir šiam tikslui pasirenkant bandymo įrenginio ir kontrolinio įrenginio

▼M4

mikrobų populiacijos suvienodinimo procedūrą bei naudojant ganėtinai apytikslį dumblo nuostolių metodą. Aprašomas alternatyvus aparatūros tipas, sugerties režimas, nuotekos ir dumblo nuostolių pašalinimas. Šis tekstas nuosekliai atitinka standartą ISO 11 733 (12), kuris nuodugniai patikrintas jį rengiant, tačiau metodas nebuvo patikrintas atliekant tarplaboratorinio lyginimo bandymą.

5. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracija kitais tikslais nuotekose turi būti žinoma tiksliau ir todėl privaloma rinktis išsamesnį metodą. Pvz., dumblo nuostolių norma turi būti tiksliau kontroliuojama kiekvieną dieną ir bandymo atlikimo laikotarpiu bei įrenginiai naudojami pasirenkant kelias nuostolių normas. Siekiant užtikrinti visa apimantį metodą, atliekant bandymus taip pat turėtų būti naudojamos dvi arba trys skirtingos temperatūros. Šį metodą yra aprašęs Birch (13) (14) ir jo santrauka pateikta 6 priedėlyje. Tačiau dabartinės žinios nėra pakankamos siekiant nustatyti, kuris kinetinis modelis valant nuotekas taikytinas cheminių medžiagų biologiniam skaidumui ir apskritai vandens aplinkoje. 6 priedėlyje kaip pavyzdys nurodytas Mono kinetikos taikymas galioja tik 1 mg/l arba didesnės koncentracijos cheminėms medžiagos, tačiau kai kurių nuomone net šis teiginys turi būti pagrindžiamas. Bandymai naudojant koncentracijas, visapusiškiau atitinkančias nustatomąsias nuotekose, nurodyti 7 priedėlyje, tačiau jie ir pateiktieji 6 priedėlyje yra įtraukti į priedėlius, tačiau jie nėra skelbiami kaip atskirieji bandymo metodai.

Filtrai

6. Kur kas mažiau dėmesio skiriama pavyzdiniams laistomiesiems reaktoriams; turbūt todėl, kad jie yra gerokai griozdiškesni ir ne tokie kompaktiški, palyginti su veikliojo dumblo įrenginio modeliais. Gerikte ir kt. sukūrė laistomuosius reaktorius ir naudojo juos taikydami bandymo įrenginio ir kontrolinio įrenginio mikrobų populiacijos suvienodinimo procedūrą (15). Šie reaktoriai buvo ganėtinai dideli (aukštis 2 m; talpa 60 l) ir kiekvienam reikėjo ne mažiau negu 2 l/h nuotekų. Bauman ir kt. (16) laistomuosius reaktorius modeliavo poliesterio minkštos masės strypelius įkišdami į 1 m vamzdžius (vidinis vamzdžio skersmuo 14 mm); prieš įkišant į vamzdžius šiuos strypelius pastarieji koncentruotame veikliajame dumble būdavo palaikomi ne trumpiau negu 30 min. Bandomoji cheminė medžiaga, kuri buvo vienintelis anglies šaltinis mineralinių druskų tirpale, tiekta vamzdžiu žemyn ir biologinis skaidymas vertintas nuotekose matuojant ištirpusią organinę anglį (toliau – DOC) ir CO_2 kiekį išsiskiriančiose dujose.

7. Biologinių filtrų veikimas modeliuotas kitais būdais (15); mažu kampu į horizontalę pakreiptų besisukančių vamzdžių vidiniais paviršiais leista srūti nuotekoms (apie 250 ml/h) su bandomąja chemine medžiaga ir be šios medžiagos bei surinktame ištakyje nustatytas DOC kiekis ir (arba) konkrečios bandomosios cheminės medžiagos kiekis.

BANDYMO METODO ESMĖ

8. Taikant šį metodą nustatomas pašalinamas vandenyje ištirpusių organinių cheminių medžiagų kiekis vykstant pirminiam biologiniam skaidymui ir (arba) visiškam biologiniam skaidymui, kurį nuolat naudojamose bandymo sistemose, modeliuojančiose aktyviojo dumblo procesus, užtikrina aerobiniai mikroorganizmai. Lengvai skaidoma organinė terpė ir organinė bandomoji cheminė medžiaga yra anglies ir energijos šaltiniai mikroorganizmams.

9. Naudojami du nuolatos vienodomis sąlygomis, kurios pasirenkamos atsižvelgiant į bandymo tikslą, vienu metu veikiantys bandymo įrenginiai (veikliojo dumblo įrenginiai arba akytieji indai). Paprastai vidutinė hidraulinė išbuvimo trukmė yra 6 val., o vidutinis dumblo amžius (dumblo išbuvimo trukmė) yra 6–10 dienų. Dumblas naudojamas vienu iš dviejų metodų: tik į vieną iš įrenginių įleidžiamą organinę terpę paprastai įleidžiama bandomosios cheminės medžiagos, kurios koncentracija yra nuo10 mg/l ištirpusios organinės anglies (DOC) iki 20 mg/l DOC. Antrasis įrenginys naudojamas kaip kontrolinis įrenginys siekiant nustatyti organinės terpės biologinį skaidymą.

▼M4

10. Dažnai imamuose ištakio ėminiuose visų pirma turėtų būti nustatomas DOC kiekis arba cheminis deguonies suvartojimas (COD) ir atliekant specialią analizę įvertinama bandomosios cheminės medžiagos koncentracija (jeigu reikia) ištakyje iš įrenginio, į kurį buvo leidžiama bandomoji cheminė medžiaga. DOC ir COD koncentracijų skirtumas ištakyje iš bandomojo ir kontrolinio įrenginių laikomas atsiradusiu dėl bandomosios cheminės medžiagos arba jos organinių metabolitų. Šis skirtumas lyginamas su įterpiant bandomąją medžiagą intakyje užtikrinta DOC arba COD koncentracija, kad būtų nustatytas bandomosios cheminės medžiagos pašalinimas.

11. Biologinį skaidymą paprastai galima atskirti nuo bioadsorbcijos ir šiuo tikslu nuodugniai išanalizuojant šalinimo–laiko kreivę bei galima paprastai patvirtinti taikant lengvo biologinio skaidymo, kuriam pasirenkama aklimatizuota sėjimo kultūra iš įrenginio, į kurį buvo įterpta bandomosios cheminės medžiagos.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

12. Bandomosios cheminės medžiagos grynumas, tirpumas vandenyje, lakumas ir sugerties charakteristikos turėtų būti žinomos siekiant teisingai aiškinti rezultatus. Su lakiosiomis ir netirpiomis cheminėmis medžiagomis paprastai neįmanoma atlikti bandymų, jeigu nesiimama specialių atsargumo priemonių (žr. 5 priedėlį). Taip pat turėtų būti žinoma cheminė struktūra ar bent jau empirinė formulė siekiant apskaičiuoti teorines vertes ir (arba) patikrinti išmatuotas parametrų vertes, pvz., teorinį deguonies poreikį (toliau – ThOD), ištirpusią organinę anglį (DOC) ir cheminį deguonies suvartojimą (COD).

13. Informacija apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą mikroorganizmams (žr. 4 priedėlį) gali praversti renkantis atitinkamas atliekant bandymą taikomas koncentracijas ir gali būti svarbi aiškinant mažas biologinio skaidumo vertes.

ATITIKTIES LYGIS

14. Šį pradinį modeliavimo (patvirtinimo) bandymą taikant pirminio biologinio skaidymo paviršinio aktyvumo medžiagoms turi būti pašalinama daugiau negu 80 % konkrečios cheminės medžiagos, kad paviršinio aktyvumo medžiagą būtų leidžiama pateikti rinkai. Jeigu neužtikrinama 80 % vertė, galima atlikti šį modeliavimo (patvirtinimo) bandymą ir paviršinio aktyvumo medžiagą rinkai galima pateikti tik tuo atveju, jeigu pašalinama daugiau negu 90 % konkrečios cheminės medžiagos. Dėl cheminių medžiagų apskritai nekeliamas atitikties ir (arba) neatitikties klausimas ir užtikrinamą procentinę pašalinimo dalį galima naudoti apytiksliai apskaičiuojant galimą koncentraciją aplinkoje, taikytiną įvertinant cheminių medžiagų keliamą pavojų. Rezultatai dažnai pateikiami pagal modelį „viskas ar nieko“. Atlikus tam tikrą grynųjų cheminių medžiagų tyrimų skaičių nustatyta, kad daugiau negu trijų ketvirčių atvejais buvo pašalinta > 90 % DOC ir 80 % atvejų pašalinta daugiau negu 90 % cheminių medžiagų, kurioms nebuvo būdingas bent kiekis didesnis biologinis skaidumas.

15. Atliekant šį bandymą nuotekose viso labo yra tik kelios cheminės medžiagos (pvz., paviršinio aktyvumo medžiagos), kurių koncentracijos (apie 10 mg C/l) naudojamos atliekant bandymą. Kai kurios cheminės medžiagos, jeigu jų koncentracijos atitinka nurodytąsias vertes, gali veikti kaip inhibitoriai, tačiau kitų cheminių medžiagų šalinimo kinetika gali būti skirtinga esant mažoms koncentracijoms. Skaidymą įmanoma įvertinti tiksliau, jeigu būtų naudojami modifikuoti metodai, kiek įmanoma mažesnės bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ir surinktus duomenis būtų galima naudoti apskaičiuojant kinetines konstantas. Tačiau būtinų eksperimentinių metodų patikimumas kol kas nėra iki galo validuotas ir taip pat neparengti biologinio skaidymo reakcijas apibūdinantys kinetiniai modeliai (žr. 7 priedėlį).

▼M4

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

16. Siekiant užtikrinti, kad bandymo procedūra būtų taikoma pagal reikalavimus, tikslinga bandymus su cheminėmis medžiagomis, kurių ypatybės yra žinomos, retkarčiais atlikti kartu su bandomųjų cheminių medžiagų tyrimu. Šioms cheminėms medžiagoms priskiriama adipo rūgštis, 2-fenilfenolis, 1-naftoliai, difeno rūgštis, 1-naftalenkarboksirūgštis ir t. t. (9) (10) (11).

BANDYMO REZULTATŲ ATKURIAMUMAS

17. Parengta kur kas mažiau, palyginti su ataskaitomis apie lengvo biologinio skaidumo bandymus, tyrimų ataskaitų apie modeliavimo bandymus. Kartotinių ėminių (paimtų vienu metu) tyrimų rezultatų atkuriamumas yra aukštas (10–15 %), jeigu bandymas atliekamas su cheminėmis medžiagomis, kurios suskaidomos 80 % ar daugiau procentų, tačiau kur kas mažiau suskaidomų cheminių medžiagų rezultatų kintamumas yra didesnis. Per 9 savaites, leidžiamas atliekant bandymą, skirtingais atvejais taip pat buvo nustatyti tam tikrų ribinių cheminių medžiagų ganėtinai nesugretinami rezultatai (pvz., 10 %, 90 %).

18. Naudojant dviejų tipų aparatus buvo nustatyti mažai besiskiriantys rezultatai, tačiau tam tikros cheminės medžiagos išsamiau ir nuosekliau suskaidytos buitinėse nuotekose negu OECD sintetinėse nuotekose.

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

Bandymo sistema

19. Vienos bandomosios cheminės medžiagos bandymo sistemą sudaro bandymo įrenginys ir kontrolinis įrenginys; tačiau atliekant tik specialias analizes (pirminis biologinis skaidymas) pakanka vien bandymo įrenginio. Vieną kontrolinį įrenginį galima naudoti su keliais bandymo įrenginiais, jeigu bandymai atliekami su ta pačia ar skirtingomis bandomosiomis medžiagomis. Jeigu naudojamas bandymo įrenginio ir kontrolinio įrenginio mikrobų populiacijos suvienodinimas (3 priedėlis) kiekvienas bandymo įrenginys privalo turėti atskirą kontrolės įrenginį. Galima naudoti aktyviojo dumblo įrenginio modelį, Husmano įrenginį, (1 priedėlio 1 pav.) arba akytąjį indą (1 priedėlio 2 pav.). Abiem atvejais būtini pakankamo dydžio laikymo indai, kuriuose būtų kaupiamas intakiai ir ištakiai, bei intakio dozavimo siurbliai (intakis maišomas su bandomosios cheminės medžiagos tirpalu arba tiekiamas atskirai).

20. Kiekvieną aktyviojo dumblo įrenginį sudaro žinomos talpos aeracinis rezervuaras, kurio talpa yra apie 3 litrai veikliojo dumblo, ir maždaug 1,5 litro talpos skirtuvas (antrinis nusodintuvas); talpą galima šiek tiek pakeisti, jeigu reguliuojamas skirtuvo aukštis. Leidžiama naudoti skirtingo dydžio indus, jeigu juos ketinama naudoti taikant palyginamojo dydžio hidraulines apkrovas. Jeigu bandymo patalpoje neįmanoma išlaikyti pageidaujamo intervalo temperatūrą, rekomenduojama naudoti indus su vandeniu užpildyta ertme, jeigu vandens temperatūrą įmanoma reguliuoti. Pneumatiniu siurbliu ar dozavimo siurbliu veiklusis dumblas reguliariais intervalais nuolatos ar su pertrūkiais iš skirtuvo recirkuliuojamas į aeracinį rezervuarą.

21. Akytojo indo sistemą sudaro vidinis akytasis cilindras kūgio formos dugnu, įdėtas į šiek tiek didesnį tokios pačios formos indą, pagamintą iš nelaidžios plastikinės medžiagos. Akytajam indui tinkama medžiaga būtų akytasis polietilenas, kurio didžiausias poros dydis neviršija 90 μm, o medžiaga ne storesnė negu 2 mm. Dumblas iš valomos organinės terpės išskiriamas vykstant skirtuminiam perėjimui per akytąją sienelę. Ištakiai surenkami žiedo pavidalo ertmėje, iš kurios jie srūva į kaupiamąjį indą. Nusodinimo procesas nevyksta, todėl dumblas nėra grąžinamas. Visą sistemą galima

▼M4

sumontuoti vandens vonioje, kurioje vandens temperatūrą įmanoma reguliuoti termostatinėmis priemonėmis. Akytieji indai užsikemša ir pradiniuose etapuose per jų kraštus gali tekėti skystis. Šiuo atveju akytasis įdėklas pakeičiamas švariu įdėklu, tačiau pirmiau dumblas siurbiamas iš indo į švarią talpyklą bei tada pakeičiamas užsikimšęs įdėklas. Nušluosčius nepralaidų išorinį cilindrą įterpiamas švarus įdėklas ir dumblas grąžinamas į indą. Prie užsikimšusio įdėklo šonų prilipęs visas dumblas taip pat rūpestingai nugramdomas ir perkeliamas. Užsikimšę indai valomi plona vandens čiurkšle, kad būtų pašalinamas likęs dumblas, ir mirkant natrio hipochlorito tirpale, o tada vandenyje ir galiausiai kruopščiai skalaujami vandeniu.

22. Dumblą aeruojant abiejų sistemų aeraciniuose rezervuaruose būtina taikyti tinkamus metodus, pvz., akyto stiklo antgalį (difuzoriaus akmenis) ir suslėgtąjį orą. Jeigu reikia, oras turi būti valomas jį leidžiant per tinkamą filtrą ir kondicionuojamas. Sistema turi tekėti pakankamas oro kiekis, kad būtų išlaikomos aerobinės sąlygos ir kad atliekant bandymą dumblo dribsniai visą laiką būtų suspenduoti.

Filtravimo įtaisas ar centrifuga

23. Ėminių filtravimo įtaisas su būtino akytumo (nominalusis apertūros skersmuo 0,45 μm) membraniniais filtrais, sugeriančiais tirpiąsias chemines medžiagas ir išskiriančiais kuo mažesnį organinės anglies kiekį. Jeigu naudojami organinę anglį išskiriantys filtrai, jie kruopščiai plaunami karštu vandeniu, kad būtų pašalinta išplaunamoji organinė anglis. Antraip leidžiama naudoti centrifugą, tinkančią užtikrinti 40 000 m/s^2.

Analizės įranga

24. Įrenginiai, būtini nustatyti:

— DOC (ištirpusią organinę anglį) ir TOC (bendrąją organinę anglį) arba COD (cheminį deguonies suvartojimą),

— konkrečią cheminę medžiagą, jeigu reikia,

— suspenduotas medžiagas, pH, deguonies koncentraciją vandenyje,

— temperatūrą, rūgštingumą ir šarmingumą,

— amonio, nitritų ir nitratų kiekį, jeigu bandymas atliekamas nitrifikacijos sąlygomis.

Vanduo

25. Vandentiekio vanduo, kuriame mažiau negu 3 mg/l DOC. Nustatomas šarmingumas, jeigu nėra žinomas.

26. Dejonizuotas vanduo, kuriame mažiau negu 2 mg/l DOC.

Organinė terpė

27. Kaip organinę terpę leidžiama naudoti sintetines nuotekas, buitines nuotekas ar abiejų mišinį. Įrodyta (žr. (11) (14)), kad naudojant tik buitines nuotekas pašalinama didesnė DOC procentinė dalis ir kad šiuo atveju net įmanoma šalinti tam tikras chemines medžiagas ir jas biologiškai skaidyti, nors šios cheminės medžiagos nėra biologiškai skaidomos, jeigu naudojamos OECD sintetinės nuotekos. Taip pat jeigu nuolat ar su pertrūkiais pridedama buitinių nuotekų, veikiųjį dumblą dažnai pavyksta stabilizuoti, įskaitant esminę ypatybę tinkamai nusistovėti. Vadinasi, rekomenduojama naudoti buitines nuotekas. Išmatuojamos kiekvienos organinės terpės naujos partijos DOC arba COD vertės. Turėtų būti žinomas organinės terpės rūgštingumas arba šarmingumas. Jeigu rūgštingumas ar šarmingumas yra per mažas, į organinę terpę gali tekti įterpti tinkamo buferinio tirpalo (natrio hidrokarbonato arba kalio dihidrofosfato), kad atliekant bandymą aeracijos rezervuare pH vertė būtų maždaug 7,5 ± 0,5. Kiekvienu pavieniu atveju nustatomas įterptinas buferinio tirpalo kiekis ir pasirenkamas jo įterpimo laikas. Jeigu mišiniai naudojami nuolat ar su pertrūkiais, turi būti užtikrinama beveik pastovi mišinio DOC vertė (arba COD vertė), pvz., šiuo tikslu naudojant skiedimą vandeniu.

▼M4

Sintetinės nuotekos

28. Kiekviename vandentiekio vandens litre ištirpinama: 160 mg peptono, 110 mg mėsos ekstrakto, 30 mg karbamido, 28 mg bevandenio kalio dihidrofosfato (K_2HPO_4), 7 mg natrio chlorido (NaCl), 4 mg kalcio chlorido dihidrato ($CaCl_2.2H_2O$), 2 mg magnio sulfato heptahidrato ($Mg_2SO_4.7H_20$). Šios OECD sintetinės nuotekos yra pavyzdinės ir jas naudojant užtikrinama vidutinė 100 mg/l DOC koncentracija intakyje. Antraip leidžiama naudoti kitokią sudėtį, kai užtikrinama beveik tokia pati DOC koncentracija, labiau atitinkanti tikrųjų nuotekų vertę. Jeigu būtinas mažesnės koncentracijos intakis, sintetinės nuotekos skiedžiamos, pvz., 1:1 santykiu, vandentiekio vandeniu, kad būtų užtikrinta maždaug 50 mg/l koncentracija. Naudojant mažesnės koncentracijos intakį būtų skatinamas greitesnis nitrifikuojančių organizmų augimas ir šis keitimas turėtų būti naudojamas tuo atveju, jeigu turi būti tiriamas nitrifikuojančių nuotekų įrenginių modeliavimas. Koncentruotų šių sintetinių nuotekų galima pasiruošti iš distiliuoto vandens ir jas laikyti vieną savaitę maždaug 1 °C temperatūroje. Jeigu reikia, skiedžiama distiliuotu vandeniu. (Ši terpė neatitinka reikalavimų, pvz., azoto koncentracija yra labai didelė, palyginti maža anglies koncentracija, tačiau kol kas geresnė priemonė nėra pasiūlyta, t. y. kaip buferinio skysčio įterpti daugiau fosfato ir papildomą peptono kiekį.)

Buitinės nuotekos

29. Naudojamos šviežios nusistovėjusios nuotekos, kiekvieną dieną rinktos iš valymo įrenginių, į kuriuos daugiausiai patenka buitinės nuotekos. Jos turėtų būti renkamos iki pirminio nusodinimo ir iš pirminio nusodinimo rezervuaro nuleidimo kanalo arba iš veikliojo dumblo įrenginio tiekimo bei turi būti beveik be stambiųjų dalelių. Nuotekas galima naudoti jas palaikius kelias dienas (tačiau apskritai jos neturėtų būti laikomos ilgiau negu septynias dienas) maždaug 4 °C temperatūroje, jeigu įrodoma, kad laikant DOC vertė (arba COD vertė) nėra kiek daugiau sumažėjusi (t. y. mažiau negu 20 %). Siekiant apriboti sistemos trukdžius kiekvienos naujos partijos DOC vertė (arba COD vertė) prieš pradedant naudoti turėtų būti koreguojama atsižvelgiant į atitinkamą pastovią vertę, pvz., skiedžiant vandentiekio vandeniu.

Veiklusis dumblas

30. Veiklusis dumblas sėjimo kultūrai įterpti renkamas iš nuotekų valymo įrenginio aeracijos rezervuaro arba iš laboratorinio veikliojo dumblo įrenginio, kuriuo valomos tik buitinės nuotekos.

Pradiniai bandomosios cheminės medžiagos tirpalai

31. Cheminių medžiagų, kurios yra atitinkamo tirpumo, reikiamos koncentracijos pradiniai tirpalai pasiruošiami (pvz., 1–5 g/l) iš dejonizuoto vandens ar iš sintetinių nuotekų mineralinės dalies. (Netirpiosios ir lakiosios cheminės medžiagos aprašytos 5 priedėlyje). Nustatoma pradinių tirpalų DOC vertė ir bendrosios organinės anglies (TOC) vertė ir pakartojami kiekvienos naujos partijos matavimai. Jeigu DOC ir TOC vertės skirtumas viršija 20 %, patikrinamas bandomosios cheminės medžiagos tirpumas vandenyje. Bandomosios cheminės medžiagos DOC vertė arba koncentracijos vertė, išmatuota taikant specialią pradinio tirpalo analizę, lyginama su vardine verte siekiant nustatyti, ar atsistatymas yra ganėtinai geras (paprastai galima tikėtis > 90 %). Įvertinama, visų pirma dispersijų atžvilgiu, ar DOC galima ar negalima naudoti kaip analizės parametrą, arba įmanoma naudoti tik bandomajai cheminei medžiagai būdingą analizės metodą. Dispersijoms būtina centrifuguoti ėminius. Specialiu analizės metodu išmatuojama kiekvienos naujos partijos DOC, COD vertė arba bandomosios cheminės medžiagos kiekis.

▼M4

32. Nustatoma pradinio tirpalo pH vertė. Jeigu nustatomos kraštutinės vertės, jos patvirtina, kad bandymo sistemos veikliojo dumblo pH vertei galėjo būti padarytas poveikis pridėjus cheminės medžiagos. Šiuo atveju pradinis tirpalas neutralizuojamas mažu neorganinės rūgšties ar bazės kiekiu siekiant užtikrinti, kad pH vertė būtų 7 ± 0,5, tačiau privaloma rūpintis, jog nebūtų nusodinama bandomoji cheminė medžiaga.

PROCEDŪRA

33. Aprašyta procedūra taikoma veikliojo dumblo įrenginiams; ją teko šiek tiek pritaikyti akytojo indo sistemai.

Sėjimo kultūros ruošimas

34. Prieš pradedant bandymą į bandymo sistemą įterpiama veikliojo dumblo arba mažos mikroorganizmų koncentracijos sėjimo kultūros. Aeruojama sėjimo kultūra kambario temperatūroje laikoma tol, kol pradedama naudoti, ir ją būtina naudoti per 24 val. Pirmuoju atveju iš veiksmingai eksploatuojamo nuotekų biologinio valdymo įrenginio arba laboratorinio valymo įrenginio, kuriam tiekiamos daugiausiai buitinės nuotekos, paimamas veikliojo dumblo mėginys. Jeigu turi būti modeliuojamos nitrifikavimo sąlygos, dumblas imamas iš nuotekų valymo įrenginio su nitrifikacijos procesu. Nustatoma suspenduotų medžiagų koncentracija ir, jeigu reikia, dumblas sutankinamas taip, kad į bandymo sistemą būtų įterpiamas tik būtinasis dumblo kiekis. Užtikrinama, kad sausosios medžiagos koncentracija būtų apie 2,5 g/l.

35. Antruoju atveju kaip sėjimo kultūra naudojamas 2 ml/l–10 ml/l koncentracijos ištakis iš buitinių nuotekų biologinio valymo įrenginio. Norint naudoti kiek įmanoma daugiau skirtingų rūšių bakterijų gali būti tikslinga pridėti iš kitų įvairių šaltinių, pvz., paviršinio vandens, paimtos sėjimo kultūros. Šiuo atveju veikliojo dumblo dribsnių susidarymas ir jų kiekio didėjimas vyksta bandomojoje sistemoje.

Organinės terpės dozavimas

36. Užtikrinama, kad intakio ir ištakio talpyklos bei intakio indų ir ištakio indų jungiamieji vamzdeliai būtų kruopščiai išvalyti, kad iš pat pradžių ir atliekant bandymą būtų užkirstas kelias augti mikroorganizmams. Bandymo sistemos sumontuojamos patalpoje, kurioje įmanoma reguliuoti temperatūrą (paprastai 20–25 °C), arba naudojami bandymo įrenginiai su vandeniu užpildyta ertme. Pasiruošiamas pakankamas kiekis būtinos organinės terpės (27–29 pastraipos). Pirmiausiai organinės terpės pripildomas aeracinis rezervuaras ir skirtuvas bei įterpiama sėjimo kultūra (34, 35 pastraipos). Pradedama aeracija, kad dumblas būtų suspenduojamas, prisotinamas deguonies, ir imamasi dozuoti intakį bei regeneruoti nusodintąjį dumblą. Iš laikymo indų paimtos organinės terpės įdedama į bandymo ir kontrolinių įrenginių aeracijos rezervuarus (20, 21 pastraipos) ir iš panašių laikymo indų paimami atitinkami ištakių kiekiai. Norint užtikrinti įprastą 6 val. hidraulinę išbuvimo trukmę organinė terpė pumpuojama 0,5 l/val sparta. Siekiant užtikrinti šią spartą, matuojamas kiekvieną dieną įterpiamos organinės terpės kiekis ir šiuo tikslu daromi įrašai apie laikymo induose sumažėjusios terpės kiekį. Gali tekti taikyti kitus įterpimo būdus siekiant nustatyti su pertrūkiais atliekamo cheminių medžiagų išleidimo ir „didelio vienkartinio“ cheminių medžiagų kiekio poveikį.

37. Jeigu ruošiamą organinę terpę ketinama naudoti ilgiau negu vieną dieną, privaloma rinktis aušinimą 4 °C temperatūroje arba kitus tinkamus išsaugojimo metodus siekiant užtikrinti, kad už bandymo įrenginių ribų neaugtų mikrobai ir nevyktų biologinio skaidymo procesas (29 pastraipa). Jeigu naudojamos sintetinės nuotekos, koncentruotą pradinį tirpalą (pvz., 10 kartų viršijantį įprastą koncentraciją, 28 pastraipa) leidžiama pasiruošti ir laikyti maždaug 4 °C temperatūroje. Prieš naudojant šį pradinį tirpalą galima pagal reikalavimus maišyti su atitinkamu vandentiekio vandens kiekiu; jį leidžiama pumpuoti tiesiogiai, tačiau atitinkamas vandentiekio vandens kiekis turi būti tiekiamas atskirai.

▼M4

Bandomosios cheminės medžiagos dozavimas

38. Į intakio laikymo indą įpilamas atitinkamas bandomosios cheminės medžiagos pradinio tirpalo kiekis (31 pastraipa) arba naudojant atskirą siurblį šis tirpalas pumpuojamas tiesiogiai į aeracijos rezervuarą. Įprasta vidutinė bandymo koncentracija intakyje turėtų būti 10–20 mg/l DOC, o didžiausia koncentracijos vertė neturėtų viršyti 50 mg/l. Jeigu bandomosios cheminės medžiagos tirpumas vandenyje yra mažas arba jeigu numatomas galimas toksinis poveikis, koncentracija mažinama iki 5 mg/l DOC arba dar iki mažesnės vertės, tačiau tik tuo atveju, kai specialus analizės metodas yra prieinamas ir kai jis taikomas (naudojant specialius dozavimo metodus leidžiama įterpti mažai vandenyje tirpių ištirpusių bandomųjų cheminių medžiagų, žr. 5 priedėlį).

39. Bandomąją cheminę medžiagą imama įterpti po laikotarpio, kai sistema yra stabilizuojama ir veiksmingai šalina (apie 80 %) organinės terpės DOC. Prieš pradedant įterpinėti bandomąją cheminę medžiagą privaloma patikrinti, ar visi įrenginiai veikia vienodai veiksmingai; jeigu jie veikia skirtingai, šiuo atveju paprastai rekomenduojama sumaišyti skirtingą dumblą ir į kiekvieną įrenginį įdėti vienodą šio dumblo kiekį. Jeigu kaip sėjimo kultūra naudojama (maždaug) 2,5 g/l (sausoji masė) veikliojo dumblo, bandymo pradžioje galima įterpti bandomosios cheminės medžiagos, nes iš pradžių pridedant kaskart vis didesnius kiekius yra užtikrinama, kad veiklusis dumblas tinkamiau prisitaikytų prie bandomosios cheminės medžiagos. Kad ir kokiu būdu būtų pridedama bandomosios cheminės medžiagos, laikymo inde (-uose) rekomenduojama reguliariais intervalais matuoti atitinkamą srautą ir (arba) kiekius.

Veikliojo dumblo tvarkymas

40. Atliekant bandymą veikliojo dumblo kietųjų dalelių koncentracija nepaisant naudojamos sėjimo kultūros paprastai stabilizuojasi 1–3 g/l sausosios masės intervalo ribose, tačiau šiuo atveju svarbi organinės terpės kokybė ir koncentracija bei koncentracija priklauso nuo naudojimo sąlygų, esamų mikroorganizmų pobūdžio ir bandomosios cheminės medžiagos poveikio.

41. Suspenduotų kietųjų medžiagų kiekis aeracijos rezervuare nustatomas ne rečiau negu kartą per savaitę ir perteklinis dumblas yra šalinamas siekiant išlaikyti 1–3 g/l (sausosios masės) koncentraciją arba koreguojama vidutinė pastovi dumblo amžiaus vertė (paprastai 6–10 dienų). Jeigu, pvz., pasirenkama 8 dienų dumblo išbuvimo trukmė, kiekvieną dieną iš aeracijos rezervuaro išimama ir pašalinama 1/8 veikliojo dumblo kiekio dalis. Ši operacija atliekama kasdien arba geriausiai būtų naudoti automatinį su pertrūkiais veikiantį eksploatavimo siurblį. Išlaikant pastovią ar griežtai apibrėžtas ribas atitinkančią suspenduotų medžiagų koncentraciją nepavyksta užtikrinti pastovios dumblo išbuvimo trukmės (toliau – DST), kuri laikytina eksploataciniu kintamuoju, nuo kurio priklauso bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos nuotakyje vertė.

42. Atliekant bandymą bet koks prie aeracijos rezervuaro ir skirtuvo sienelių prilipęs dumblas ne rečiau negu kartą per dieną šalinamas taip, kad dumblas vėl būtų suspenduojamas. Reguliariai tikrinami ir valomi visi vamzdžiai ir vamzdynas siekiant užtikrinti, kad nesusidarytų biologinė plėvelė. Skirtuve nusistovėjęs dumblas recirkuliuojamas į aeracijos rezervuarą; šiuo tikslu rekomenduojama naudoti trūkųjį pumpavimą. Akytojo indo sistemoje recirkualiavimas nenaudojamas, tačiau šiuo atveju užtikrinama, kad švarūs vidiniai indai būtų įstatomi pirmiau negu gerokai padidėja kiekis inde (21 pastraipa).

43. Husmano įrenginiuose gali sutrikti dumblo nusodinimo ir šalinimo procesai. Šias triktis galima pašalinti naudojant vieną ar kelias toliau aprašytas procedūras; jos vienu metu taikomos bandymo ir kontroliniuose įrenginiuose:

— reguliariai, pvz., kiekvieną savaitę, galima pridėti šviežio dumblo ar dribsniklio (pvz., 2 ml/indas su 50 g/l $FeCl_3$), tačiau užtikrinama, kad nevyktų bandomosios cheminės medžiagos reakcija su $FeCl_3$ arba kad ji nebūtų nusodinama,

▼M4

— pneumatinį siurblį galima pakeisti peristaltiniu siurbliu siekiant sukurti dumblo recirkuliacijos srautą, kurio dydis beveik lygus intakio srautui, naudotinam nusodintame dumble sukuriant anaerobinę zoną (pneumatinio siurblio geometrinės ypatybės apriboja būtiniausią grąžinamo dumblo srautą, kad jis būtų maždaug 12 kartų didesnis negu intakio srautas),

— dumblą iš skirtuvo trūkiuoju būdu galima pumpuoti į aeracijos rezervuarą (pvz., 5 min. kas 2,5 val. ir recirkuliuoti 1 l/val–1,5 l/val.),

— siekiant pašalinti putojimo sukeltus nuostolius galima naudoti mažiausios koncentracijos netoksišką priešputį (pvz., silikoninę alyvą),

— orą per skirtuve esantį dumblą galima pūsti trumpais stipriais pliūpsniais (pvz., 10 sek. kartą per valandą),

— organinę terpę tolygiais tarpsniais galima įvedinėti į aeracijos rezervuarą (pvz., 3–10 min. kartą per valandą).

Ėminių ėmimas ir analizė

44. Reguliariais intervalais matuojama aeracijos rezervuarų veikliajame dumble ištirpusio deguonies koncentracija, temperatūra ir pH vertė. Užtikrinama, kad visada būtų pakankamas deguonies kiekis (> 2 mg/l) ir kad temperatūros vertė atitiktų privalomojo intervalo ribas (paprastai 20 °C – 25 °C). Į aeracijos indą ar į intakį įterpiant nedidelius neorganinės bazės arba rūgšties kiekius arba didinant organinės terpės buferinę talpą (žr. 27 pastraipą) užtikrinama, kad pH vertė būtų 7,5 ± 0,5. Vykstant nitrifikacijos procesui susidaro rūgštis, oksiduojant 1 mg N sukuriamas maždaug 7 mg CO_3^- ekvivalentas. Matavimo dažnumas priklauso nuo matuotino parametro ir sistemos stabilumo bei matuojama gali būti kasdien ar kartą per savaitę.

45. Išmatuojama intakių į kontrolinius ir bandymo indus DOC arba COD vertė. Taikant specialią analizę išmatuojama bandomosios cheminės medžiagos koncentracija bandomajame intakyje arba ji apytiksliai apskaičiuojama naudojant pradinio tirpalo koncentraciją (31 pastraipa), išmatuojamas naudotas kiekis ir į bandymo įrenginį įleistas nuotekų kiekis. Rekomenduojama apskaičiuoti bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją siekiant sumažinti koncentracijos duomenų kintamumą.

46. Iš surinkto ištakio (pvz., 24 val. jungtinis kiekio) imami tinkami ėminiai ir filtruojami per membraną (poros dydis 0,45 μm) arba 15 minučių centrifuguojami užtikrinant maždaug 40 000 m/s^2. Leidžiama centrifuguoti, jeigu filtravimą sunku atlikti. Nustatoma DOC arba COD vertė siekiant išmatuoti visišką biologinį suskaidymą ir, jeigu būtina, naudojant bandomajai cheminei medžiagai būdingą analizės metodą išmatuojamas pirminis biologinis suskaidymas.

47. Taikant COD vertę gali sunkiai sektis atlikti analizę, kai naudojamos mažos koncentracijos, todėl rekomenduojama tik tuo atveju, jeigu pasirenkama ganėtinai didelė bandymo koncentracija (apie 30 mg/l). Taip pat, jeigu naudojamos lengvai adsorbuojamos cheminės medžiagos, rekomenduojama, kad dumblo adsorbuojamos cheminės medžiagos kiekis būtų matuojamas naudojant šiai bandomajai medžiagai būdingą analizės metodą.

48. Ėminių ėmimo dažnumas priklauso nuo numatomos bandymo trukmės. Rekomenduojamas dažnumas – trys kartai per savaitę. Jeigu įrenginiai eksploatuojami veiksmingai, laukiama nuo vienos iki ne daugiau negu 6 savaičių po bandomosios cheminės medžiagos įterpimo, kol pasibaigus pritaikymui nusistovės stabili būsena. Siekiant įvertinti bandymo rezultatus visų pirmiausiai būtina nustatyti 15 validuotų kreivės plokščiosios dalies verčių (59 pastraipa); ši procedūra paprastai trunka 3 savaites. Bandymą galima užbaigti, jeigu užtikrinamas pakankamas šalinimo mastas (pvz., > 90 %), ir jeigu turimos minėtos 15 verčių, kurios atitinka per 3 savaites kiekvieną dieną atliktą analizę. Bandymo trukmė paprastai neturi būti ilgesnė negu 12 savaičių po bandomosios cheminės medžiagos įterpimo.

▼M4

49. Jeigu dumble vyksta nitrifikacijos procesas ir jeigu turi būti tiriamas bandomosios cheminės medžiagos poveikis nitrifikacijai, bent vieną kartą per savaitę analizuojami iš bandymo ir kontrolinių įrenginių ištakio paimti ėminiai siekiant nustatyti amonio ir (arba) nitritų bei nitratų kiekį.

50. Visos analizės turėtų būti atliekamos kai tik įmanoma, ypač azoto kiekio nustatymas. Jeigu analizių atlikimas turi būti atidedamas, sklidinuose sandariai užkimštuose buteliuose ir tamsoje ėminiai laikomi apie 40 °C temperatūroje. Jeigu ėminiai turi būti laikomi ilgiau negu 48 val., jie saugomi užšaldyti, parūgštinti (pvz., 10 ml/l 400 g/l sieros rūgšties tirpalo) arba pridedant tinkamos toksiškos cheminės medžiagos (pvz., 20 ml/l 10 g/l gyvsidabrio (II) chlorido tirpalo). Pasirūpinama, kad pasirinkus išsaugojimo metodą nebūtų daromas poveikis analizės rezultatams.

Bandymo įrenginio ir kontrolinio įrenginio mikrobų populiacijos suvienodinimo procedūra

51. Jeigu turi būti suvienodinama bandymo įrenginio ir kontrolinio įrenginio mikrobų populiacija (3 priedėlis), tarp bandymo įrenginio ir jo kontrolinio įrenginio aeracijos rezervuarų kiekvieną dieną sukeičiamas vienodas veikliojo dumblo kiekis (150 ml–1 500 ml dumblo aeracijos rezervuarams, kuriuose yra 3 litrai skysčio). Jeigu didelį bandomosios cheminės medžiagos kiekį sugeria dumblas, šiuo atveju keičiamas tik skirtuvuose nusistojęs skystis. Apskaičiuojant bandymo rezultatus (55 pastraipa) abiem atvejais naudojamas pataisos faktorius.

DUOMENYS IR ATASKAITŲ TEIKIMAS

Rezultatų apdorojimas

52. Kiekvieno pasirinkto įvertinimo laiko bandomosios cheminės medžiagos pašalinta procentinė DOC arba COD dalis apskaičiuojama pagal šią lygtį:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

kur:

D_t = pašalinta procentinė DOC arba COD dalis t laiko momentu

C_s = su bandoma chemine medžiaga siejama intakio DOC arba COD vertė, visų pirmiausiai įvertinta remiantis pradiniu tirpalu (mg/l)

E = t laiko momentu bandomajame ištakyje išmatuota DOC arba DOC vertė (mg/l)

E_o = t laiko momentu kontroliniame ištakyje išmatuota DOC arba COD vertė (mg/l)

53. Atliekant bandymą DOC arba COD šalinimo mastas iš kontrolinio įrenginio organinės terpės praverčia vertinant veikliojo dumblo biologinio skaidymo veiksmingumą. Pašalinama procentinė dalis apskaičiuojama pagal šią lygtį:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

kur:

D_B = iš kontrolinio įrenginio organinės terpės t laiko momentu pašalinta procentinė DOC arba COD dalis

C_M = kontrolinio ištakio organinės terpės DOC arba COD vertė (mg/l)

▼M4

Arba su organine terpe susijusi pašalinta DOC arba COD dalis ir bandomoji cheminė medžiaga bandymo įrenginyje apskaičiuojama pagal šią lygtį:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

kur:

D_T = bendra procentinė iš bandomojo intakio pašalinta DOC arba COOD dalis

C_T = bendro bandomojo intakio DOC ar COD vertė arba apskaičiuota atsižvelgiant į pradinius tirpalus (mg/l)

54. Pašalintas bandomosios cheminės medžiagos kiekis, jeigu matuojama naudojant specialų analizės metodą kiekvieno įvertinimo metu, apskaičiuojamas pagal šią lygtį:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

kur:

D_{ST} = procentinė bandomosios cheminės medžiagos pradinio pašalinimo dalis t laiko momentu

S_i = išmatuota arba apytiksliai apskaičiuota bandomosios cheminės medžiagos koncentracija bandomajame intakyje (mg/l)

S_e = išmatuota bandomosios cheminės medžiagos koncentracija bandomajame ištakyje laiko momentu t (mg/l)

55. Jeigu naudojama bandymo įrenginio ir kontrolinio įrenginio mikrobų populiacijos suvienodinimo procedūra, bandomosios cheminės medžiagos skiedimas aeracijos rezervuare kompensuojamas taikant dumblo keitimo procedūrą ir pataisos faktorių (žr. 3 priedėlį). Jeigu naudota 6 val. vidutinė hidraulinė išbuvimo trukmė ir jeigu aeracijos rezervuare esančio veikliojo dumblo pakeista pusė kiekio, siekiant apibrėžti tikrąjį bandomosios cheminės medžiagos šalinimo mastą Dtc nustatytos kasdieninės išmetimo vertės (Dt, 52 pastraipa) turi būti tikslinamos pagal lygtį:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Tyrimo rezultatų išraiška

56. Brėžiamas šalinamos procentinės dalies D_t (arba D_{tc}) ir D_{st}, jeigu turima, priklausomybės nuo laiko grafikas (žr. 2 priedėlį). Atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos (*per se* arba kaip DOC) šalinimo kreivės formą galima daryti tam tikras su šalinimo procesu susijusias išvadas.

Adsorbavimas

57. Jeigu pradėjus bandymą nustatomas didelio kiekio DOC šalinimas iš bandomosios cheminės medžiagos, šiuo atveju tikėtina, kad bandomoji cheminė medžiaga šalinama ją absorbuojant veikliojo dumblo kietosioms medžiagoms. Šį šalinimą įmanoma įrodyti nustatant adsorbuojamos bandomosios medžiagos kiekį ir šiuo tikslu atliekant specialią analizę. Neįprasta, jeigu atliekant bandymą iš adsorbuojamų cheminių medžiagų būtų šalinamas didelis DOC kiekis; paprastai didelis kiekis šalinamas iš pradžių, o vėliau jis laipsniškai mažėja ir prilygsta pusiausvyros vertei. Tačiau jeigu adsorbuojant bandomąją cheminę medžiagą buvo sukeltas vienoks ar kitoks mikrobų populiacijos aklimatizavimas, šalinimas DOC kiekis iš bandomosios cheminės medžiagos vėliau turėtų didėti ir atitikti aukštą kreivės plokščiosios srities vertę.

▼M4

Vėlavimo tarpsnis

58. Kaip ir atliekant statinius bandymus, darant daugelio bandomųjų cheminių medžiagų atrankos bandymus būtinas vėlavimo tarpsnis, kol visiškai užbaigiamas biologinis skaidymas. Vėlinimo tarpsnyje skaidančios bakterijos aklimatizuojasi arba prisitaiko ir bandomoji cheminė medžiaga šiame etape beveik nešalinama; tada prasideda pradinis šių bakterijų augimas. Laikoma, kad šis etapas yra pasibaigęs, o skaidymo etapas yra prasidėjęs, jeigu pašalinta maždaug 10 % pradinio bandomosios cheminės medžiagos kiekio (pasibaigus adsorbcijai, jeigu ji vyksta). Vėlavimo tarpsnis dažnai būna labai kintantis, todėl jį sunkiai sekasi atkurti.

Kreivės plokščiosios dalies tarpsnis

59. Atliekant nepertraukiamą bandymą šalinimo kreivės plokščiosios dalies tarpsnis apibrėžiamas kaip didžiausio skaidymo tarpsnis. Kreivės plokščiosios dalies tarpsnis neturėtų būti trumpesnis negu 3 savaitės ir per jį turi būti išmatuota apie 15 galiojančių verčių.

Vidutinis bandomosios cheminės medžiagos šalinimo laipsnis

60. Vidutinė vertė apskaičiuojama naudojant kreivės plokščiosios dalies tarpsnio bandomosios cheminės medžiagos šalinimo vertes (D_t). Suapvalinus iki artimiausio sveikojo skaičiaus (1 %) nustatomas bandomosios cheminės medžiagos šalinimo laipsnis. Taip pat rekomenduojama apskaičiuoti vidutinės vertės 95 % pasikliovimo intervalą.

Organinės terpės šalinimas

61. Brėžiama iš kontrolinio įrenginio (D_B) organinės terpės šalinamos DOC arba COD procentinės dalies priklausomybės nuo laiko kreivė. Vidutinis šalinimo laipsnis nurodomas taip pat kaip bandomosios medžiagos šalinimo laipsnis (60 pastraipa).

Biologinio skaidymo požymiai

62. Jeigu veiklusis dumblas didesnio bandomosios cheminės medžiagos kiekio neadsorbuoja ir šalinimo kreivė yra būdinga biologinio skaidymo kreivė su vėlinimu, skaidymo etapą ir kreivės plokščiosios dalies tarpsnį (58, 59 pastraipos), išmatuotą šalinimą galima patikimai laikyti biologiniu skaidymu. Jeigu iš pradžių šalinamas didelis kiekis, modeliavimo bandymas neturi skirtis biologinio ir abiotinio šalinimo procesų atžvilgiais. Šiais atvejais ir kitais atvejais, jeigu kyla kokių nors dvejonių dėl biologinio skaidymo (pvz., jeigu vyksta išpūtimas), analizuojamos adsorbuotos bandomosios cheminės medžiagos ar atliekami papildomi statiniai biologinio skaidymo bandymai remiantis biologinius procesus aiškiai apibūdinančiais parametrais. Šie bandymai – tai deguonies suvartojimo metodai (šio priedo (6) C.4 D, E ir F skyrius) arba bandymas matuojant susidariusio anglies dioksido kiekį (šio priedo (6) C.4 C skyrius) ar ISO viršutinės erdvės tyrimo metodas (18) naudojant modeliavimo bandymo iš anksto apdorotą sėjimo kultūrą. Jeigu išmatuojamas pašalintas DOC kiekis ir pašalintas konkrečios cheminės medžiagos kiekis ir jeigu nustatomas didelis pašalinamos procentinės dalies skirtumas (pirmoji vertė mažesnė negu pastaroji), šiuo atveju galima daryti prielaidą, kad ištakiuose yra tarpinių organinių produktų, kurie kur kas sunkiau skaidomi negu pradinė cheminė medžiaga.

Bandymo rezultatų validumas

63. Informacija apie įprastą sėjimo kultūros biologinį skaidymą gaunama tuo atveju, jeigu nustatomas kontrolinio įrenginio organinės terpės šalinimo laipsnis (53 pastraipa). Bandymas laikomas galiojančiu, jeigu DOC arba COD šalinimo laipsnis kontroliniame (-iuose) įrenginyje (-iuose) yra > 80 % po dviejų savaičių ir nebuvo pastebėta jokių neįprastų ypatybių.

▼M4

64. Jeigu buvo naudota lengvai biologiškai skaidoma (etaloninė) cheminė medžiaga, biologinio skaidymo laipsnis (D_t, 52 pastraipa) turėtų būti > 90 %.

65. Jeigu bandymas atliekamas nitrifikacijos sąlygomis, vidutinė ištakių koncentracija turėtų būti < 1 mg/l amoniako-N ir < 2 mg/l nitritų-N.

66. Jeigu šių kriterijų (63–65 pastraipos) nėra laikomasi, bandymas kartojamas naudojant iš kito šaltinio paimtą sėjimo kultūrą, išbandoma etaloninė cheminė medžiaga ir persvarstomos visos bandymo procedūros.

Bandymo ataskaita

67. Į bandymo ataskaitą turi būti įtraukiama:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— tapatybės nustatymo duomenys,

— fizinis pobūdis ir, jeigu reikia, fizinės bei cheminės savybės.

Bandymo sąlygos:

— bandymo sistemos tipas; bet kokie netirpių ir lakiųjų cheminių medžiagų bandymo pakeitimai,

— organinės terpės tipas,

— pramoninių nuotekų dalis nuotekose ir jų pobūdis, jeigu žinoma,

— sėjimo kultūra, pobūdis ir ėminių ėmimo vieta (-os), koncentracija ir išankstinis apdorojimas, jeigu taikytas,

— bandomosios cheminės medžiagos pradinis tirpalas: DOC ir TOC kiekis; paruošimo būdas, jeigu suspensija; naudota bandymo koncentracija; priežastys, jeigu kraštinis intervalas yra 10–20 g/l DOC; įterpimo metodas; pirmo įdėjimo data; bet kokie pokyčiai,

— vidutinis dumblo amžius ir vidutinė hidraulinė išbuvimo trukmė; dumblo nuostolių nustatymo metodas; dumblo išsipūtimo mažinimo metodai, dumblo nuostoliai ir t. t.,

— naudoti analizės metodai; bandymo temperatūra,

— dumblo pūtimosi savybės, dumblo indeksas (DI), veikliojo mišinio drumzlinumas (VMD),

— bet kokie nuokrypiai nuo standartinių procedūrų ir visos aplinkybės, dėl kurių gali būti daromas poveikis rezultatams.

Bandymo rezultatai:

— visi išmatuoti duomenys (DOC, COD, speciali analizė, pH, temperatūra, deguonies koncentracija, suspenduotos medžiagos, N cheminės medžiagos, jeigu reikia,

— visos apskaičiuotosios D_t (arba D_{tc}), D_B, D_{St} vertės, pateiktos lentelėje ir šalinimo kreivės,

— informacija apie vėlinimo ir kreivės plokščiosios dalies tarpsnius, bandymo trukmę, bandomosios cheminės medžiagos šalinimo ir kontrolinio įrenginio organinės terpės šalinimo laipsnį bei statistinė informacija ir pareiškimai apie biologinį skaidymą bei bandymo validumas,

— rezultatų aptarimas.

▼**M4**

LITERATŪRA

1. Swisher RD (1987). „Surfactant Biodegradation“, 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.

2. German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698–706.

3. Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

4. Painter HA and King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909–915.

5. Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

6. Chapter C.4 of this Annex, Determination of „Ready“ Biodegradability.

7. Šio priedo C.12 skyrius, Biologinis skaidymas, Modifikuotas SCAS bandymas.

8. Šio priedo C.19 skyrius. Dirvožemio ir nuotekų dumblo adsorbcijos koeficiento (K_{OC}) nustatymas naudojant didelio našumo skysčių chromatografiją (HPLC).

9. Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157–173.

10. Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45–55.

11. Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113–138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

12. ISO 11733 (1995; revised 2004). Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium - activated sludge simulation test.

13. Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33–48.

14. Birch RR (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340–343.

15. Gerike P, Fischer WK and Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753–758.

16. Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214–220.

17. Her Majesty’s Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pp. 91–98 ISBN 011 751661 9.

18. ISO 14593 (1998). Water Quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.

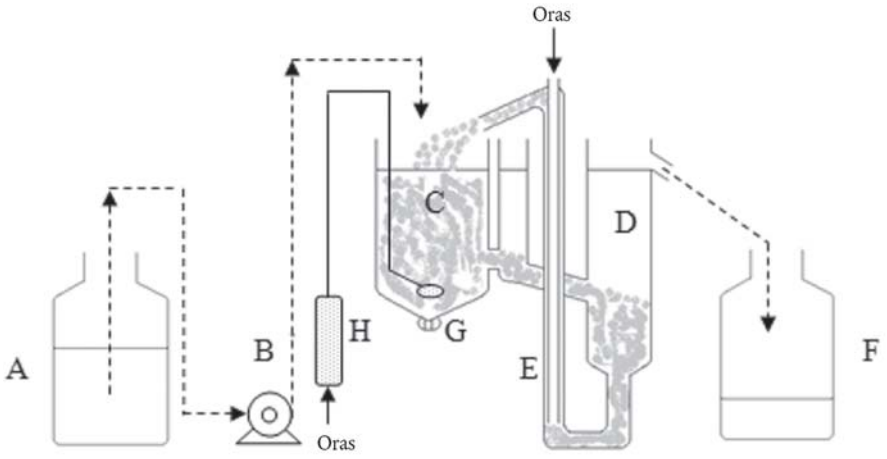
▼M4

1 priedėlis

1 paveikslas

Biologinio skaidumo įvertinimo įranga

Husmano įrenginys



A. Laikymo indas

B. Dozavimo siurblys

C. Aeracijos rezervuaras (3 l talpos)

D. Nusodintuvas

E. Pneumatinis siurblys

F. Surinkimo indas

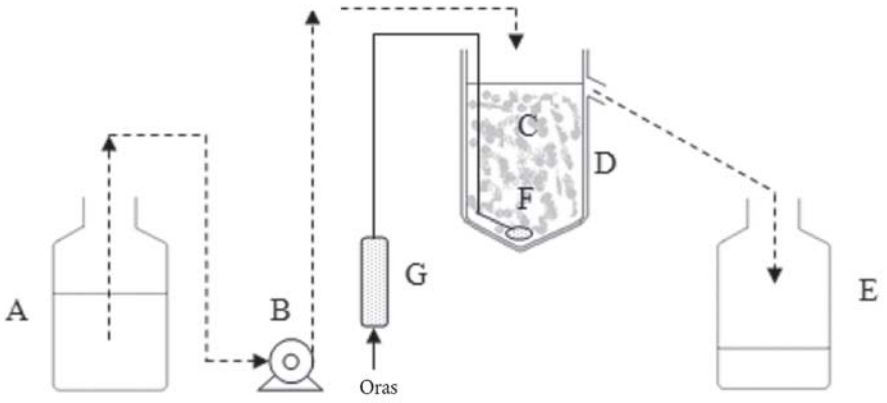
G. Aeratorius

H. Oro srauto matuoklis

2 paveikslas

Biologinio skaidumo įvertinimo įranga

Akytasis indas



A. Laikymo indas

B. Dozavimo siurblys

C. Akytasis aeravimo rezervuaras

D. Išorinis nelaidus indas

E. Surinkimo indas

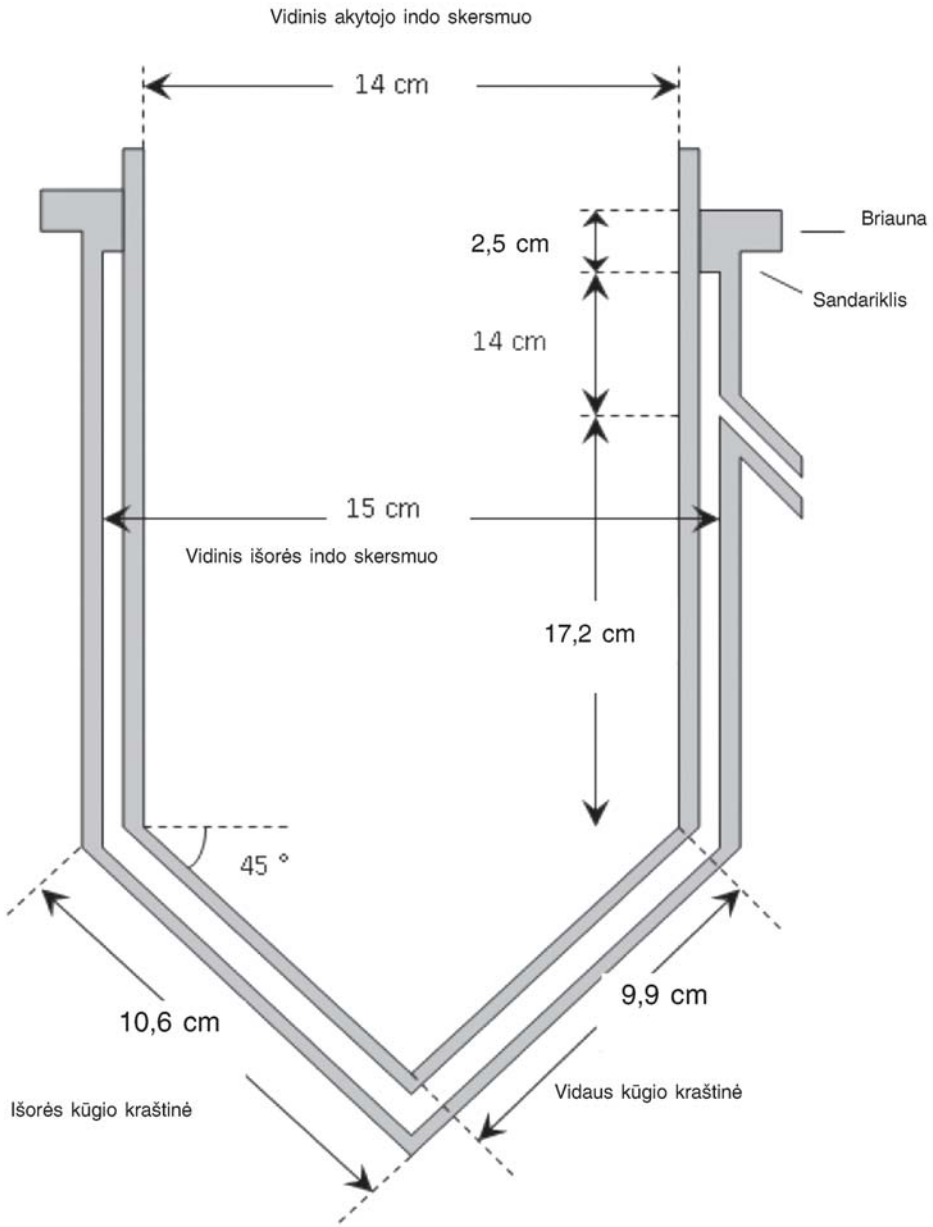
F. Oro sklaidytuvas

G. Oro srauto matuoklis

▼**M4**

3 paveikslas

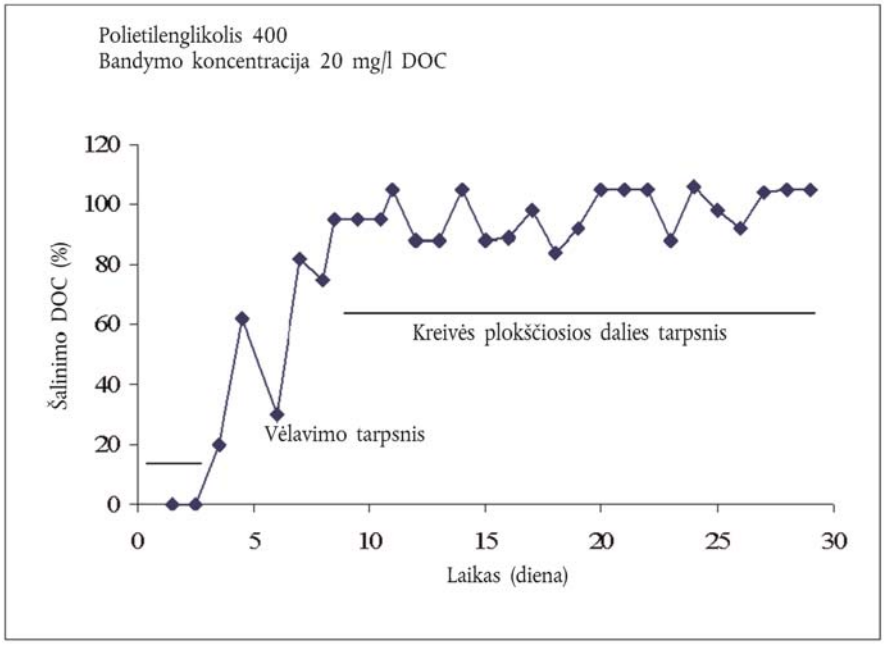
3 litrų talpos akytojo indo aeravimo rezervuaro dalys



▼**M4**

2 priedėlis

Šalinimo kreivės pavyzdys



▼M4

3 priedėlis

[INFORMACINIS PRIEDAS]

BANDYMO ĮRENGINIŲ MIKROBŲ POPULIACIJOS SUVIENODINIMAS

Siekiant pamėginti suvienodinti bandymo įrenginio, kuriam tiekiamos nuotekos ir bandomoji cheminė medžiaga, bei kontrolinio įrenginio, kuriam tiekiamos tik nuotekos, mikrobų populiaciją pradėta taikyti kasdieninė dumblo apkeitimo procedūra (1). Ši procedūra vadinama mikrobų populiacijos suvienodinimo procedūra, o metodas – suvienodintos mikrobų populiacijos įrenginių metodas. Mikrobų populiacijos suvienodinimo procedūra iš pradžių buvo atliekama naudojant Husmano veikliojo dumblo įrenginius, tačiau ji taip pat naudota akytųjų indų įrenginiuose (2) (3). Įrenginių, kuriuose naudota mikrobų populiacijos suvienodinimo procedūra, ir įrenginių, kuriuose ji nebuvo taikoma, Husmano įrenginys ar akytasis indas, rezultatai skyrėsi ne per daugiausiai, todėl neverta gaišti laiko ir eikvoti energiją bei įrenginiuose taikyti minėtą procedūrą.

Naudojant dumblo apkeitimą galima sudaryti gana didelio šalinimo regimybę, nes dalis bandomosios cheminės medžiagos yra perkeliama ir bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertės bandymo ir kontroliniuose ištakiuose beveik suvienodėja. Todėl būtina naudoti pataisos faktorius, kurie pasirenkami atsižvelgiant į pakeistąją dalį ir vidutinę hidraulinio išbuvimo trukmę. Išsamesnė informacija apie apskaičiavimą paskelbta (1).

Patikslintosios DOC ar COD šalinimo laipsnio vertės apskaičiuojamos pagal šią bendrąją formulę:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

kur:

D_{tc} = patikslintoji DOC ar COD šalinimo procentinė dalis

D_t = apskaičiuotoji DOC ar COD šalinimo procentinė dalis

a = veikliojo dumblo įrenginių pakeičiamosios frakcijos tūris

r = vidutinė hidraulinė išbuvimo trukmė (h)

Jeigu, pvz., aeracijos rezervuaro pusė tūrio yra pakeičiama (a = 0,5) ir vidutinė hidraulinė išbuvimo trukmė yra 6 val. pataisos apskaičiavimo formulė:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

LITERATŪRA

1. Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131–1135.

2. Painter HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113–138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

3. Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

4 priedėlis

VEIKLIOJO DUMBLO SLOPINIMO ĮVERTINIMAS

Procesas naudojant bandomąsias chemines medžiagas

1. Atliekant modeliavimo bandymą cheminė medžiaga (ar nuotekos) gali būti biologiškai neskaidoma ar pašalinama ir net gal slopinti dumblo mikroorganizmų veiklą. Kitos cheminės medžiagos biologiškai skaidomos, jeigu jų maža koncentracija, tačiau būdamos didelės koncentracijos jos sukuria slopinamąjį poveikį (hormezė). Slopinamąjį poveikį galima nustatyti ankstyvajame etape arba apibrėžti atliekant toksiškumo bandymą, kuriam naudojama panaši ar tapati sėjimo kultūra, pasirinkta modeliavimo bandymui (1). Galima rinktis deguonies suvartojimo slopinimo metodą (šio 2 priedėlio C.11 skyrius), ISO 8 192 (3)) arba dumblo organizmų augimo slopinimo metodą (ISO 15 522 (4)).

2. Atliekant modeliavimo bandymą bet koks slopinimas būtų akivaizdžiai įrodomas nustačius, kad ištirpusios organinės anglies (DOC) arba cheminio deguonies suvartojimo (COD) skirtumas bandymo indo ištakyje ir kontrolinio indo ištakyje yra didesnis negu DCO, kuri įterpta kaip bandomoji cheminė medžiaga. Kitu būdu išreikšta procentinė DOC šalinimo iš organinės terpės vykstant poveikiui dalis (ir biocheminis deguonies suvartojimas BOD, cheminis deguonies suvartojimas COD ir (arba) NH^{+}_{4}) būtų sumažinama įterpus bandomosios cheminės medžiagos. Jeigu tai nustatoma, bandymas turėtų būti pakartojamas bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją mažinant tol, kol būtų užtikrinamas toks lygis, kad slopinimas būtų panaikinamas, ir turbūt koncentracija būtų toliau mažinama, kol bandomojo cheminė medžiaga būtų biologiškai suskaidyta. Tačiau jeigu bandomoji cheminė medžiaga (ar nuotekos) procesą neigiamai veikia pasirinkus visas bandomąsias koncentracijas, galima daryti prielaidą, kad cheminę medžiagą būsią sunku, o gal ir neįmanoma skaidyti biologinėmis priemonėmis, tačiau galbūt būtų verta pakartoti bandymą naudojant iš kito šaltinio gautą veiklųjį dumblą ir (arba) dumblui taikyti kelių etapų aklimatizavimo procesą.

3. Priešingai, jeigu atliekant modeliavimo bandymą bandomoji cheminė medžiaga biocheminėmis priemonėmis pašalinama pirmame etape, jos koncentracija turėtų būti didinama, jeigu privaloma nustatyti, ar cheminė medžiaga gali sukelti slopinamąjį poveikį.

4. Primintina, kad mėginant nustatyti slopinimo laipsnį veikliojo dumblo populiacija gali pakisti, todėl mikroorganizmai ilgainiui galėtų įgyti atsparumą slopinančiosios cheminės medžiagos poveikiui.

5. Slopinimo laipsnio apskaičiavimas:

   BOD (biocheminio deguonies suvartojimo), DOC, COD šalinimo R_o iš bandymo ir kontrolės įrenginių bendroji procentinė dalis apskaičiuojama pagal lygtį:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\ \%$$

   kur:

   I = bandymo ar kontrolinių ėminių indų intakio BOD, DOC, COD koncentracija (mg/l)

   E = atitinkamos ištakio koncentracijos (mg/l)

   I ir E vertės DOC vertės atžvilgiu turi būti tikslinamos atsižvelgiant į bandymo įrenginiuose naudojamą bandomąją cheminę medžiagą, antraip slopinimo procentinės dalies apskaičiavimas nebūtų tikslus.

▼**M4**

Dėl naudojamos cheminės medžiagos atsirandančio slopinimo laipsnį galima apskaičiuoti pagal šią lygtį:

$$\% \text{ slopinimo} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

kur:

R_c = procentinė pašalinimo dalis kontrolinių ėminių induose

R_t = procentinė pašalinimo dalis bandymo induose

LITERATŪRA

1. Reynolds L *et al*. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

2. Šio priedo C.11 skyrius. Biologinis skaidymas. Veikliojo dumblo respiracijos slopinimo bandymas.

3. ISO 8192 (2007) Water quality - Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.

4. ISO 15522 (1999) Water Quality - Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

5 priedėlis

Mažai vandenyje tirpios bandomosios cheminės medžiagos ir lakiosios cheminės medžiagos

Mažai vandenyje tirpios cheminės medžiagos

Apie mažai vandenyje tirpių ir netirpių cheminių medžiagų naudojimą atliekant bandymus, kuriais modeliuojamas nuotekų valymas, kol kas tėra paskelbtos kelios ataskaitos (1) (2) (3).

Nėra sukurto bendro bandomosios cheminės medžiagos paskleidimo metodo, kuris būtų taikomas visoms netirpioms cheminėms medžiagoms. Du iš standarte ISO 10 634 (4) aprašytų keturių metodų, atrodo, būtų tinkami paskleisti bandomąsias chemines medžiagas, jeigu bandomosios cheminės medžiagos tiriamos modeliavimo metodais; taikant paskleidimo metodus naudojami emulsikliai ir (arba) ultragarso energija. Turėtų būti nustatomas sukurto paskleidimo stabilumas; jis vertinamas ne trumpesniu negu 24 val. laikotarpiu. Tinkamai stabilizuotos dispersijos laikomos nuolat maišomoje talpykloje (38 pastraipa); tada tam tikromis dozėmis į aeracinį rezervuarą tiekiamos atskirai nuo buitinių (ar sintetinių) nuotekų.

Jeigu dispersijos yra stabilios, šiuo atveju ištiriama, kaip galima nustatyti dispersinės formos bandomąją cheminę medžiagą. Kažin ar DOC vertė būtų tinkama, todėl privaloma parengti bandomajai cheminei medžiagai tinkamą specialų analizės metodą, kurį būtų galima taikyti ištakiams, ištakių medžiagoms ir veikliajam dumblui. Bandomosios cheminės medžiagos pokytis modeliuojant veikliojo dumblo procesą turėtų būti apibrėžiamas skystosios ir kietosios medžiagos fazėje. Vadinasi, turėtų būti apskaičiuojamas „masės balansas“ siekiant nustatyti, ar bandomoji cheminė medžiaga buvo biologiškai suskaidyta. Tačiau šiuo atveju būtų patvirtinamas tik pirminis biologinis skaidymas. Visišką biologinį suskaidymą turėtų būti mėginama įrodyti atliekant respirometrinį lengvo biologinio skaidumo bandymą (šio priedo (5) C, F arba D C.4 skyrius) ir šiuo tikslu naudoti dumblą su sėjimo kultūra, kuris atliekant modeliavimo bandymą veikiamas bandomąją chemine medžiaga.

Lakiosios cheminės medžiagos

Nesiliauja svarstymas ir ginčai dėl nuotekų apdorojimo modeliavimo taikymo lakiosioms cheminėms medžiagoms. Panašiai kaip dėl mažai vandenyje tirpių bandomųjų cheminių medžiagų, tėra paskelbtos tik kelios ataskaitos, kuriose aprašyti modeliavimo bandymai naudojant lakiąsias chemines medžiagas. Įprasto tipo maišymo įrenginys pritaikomas užsandarinant aeracijos rezervuarus ir nusodintuvus, srauto matuokliais matuojant ir reguliuojant oro srautą bei per gaudykles tekančias išėjimo dujas, kad būtų surinkta lakioji organinė medžiaga. Tam tikrais atvejais naudojamas vakuuminis siurblys, kuriuo išėjimo dujos ištraukiamos per „šaltąją“ gaudyklę arba analizinė gaudyklė su „Tenax“ ir dujų chromatografijos analizėms skirtu silikageliu. Gaudyklėje esanti bandomoji cheminė medžiaga gali būtų nustatoma analizės metodu.

Bandymas atliekamas dviem etapais. Įrenginiai iš pradžių naudojami be dumblo, tačiau su sintetinėmis nuotekomis ir bandomąja chemine medžiaga, kuri pumpuojama į aeracijos rezervuarą. Penkias dienas imami intakio, ištakio ir išėjimo dujų ėminiai ir analizuojami bandomosios cheminės medžiagos atžvilgiu. Naudojant gautus duomenis galima apskaičiuoti procentinę iš sistemos pašalintos bandomosios cheminės medžiagos dalį (R_{vs}).

Tada naudojimo sąlygomis, tapačiomis atliekant šalinimo tyrimą, atliekamas įprastas biologinis bandymas (su dumblu). Taip pat matuojamos DOC arba COD vertės siekiant patikrinti, ar įrenginiai veikia pagal reikalavimus. Pirmame bymo etape atliekamos vienkartinės analizės siekiant intakyje, ištakyje ir išėjimo dujose nustatyti bandomosios cheminės medžiagos kiekį; po aklimatizavimo analizės atliekamos dažniau. Tada naudojantis nuostovios būsenos duomenis galima vėl apskaičiuoti skystojo etapo metu taikant visus procesus (R_T) (fizinius ir biologinius) pašalintos bandomosios cheminės medžiagos procentinę dalį ir iš sistemos pašalintą proporcingą dalį (R_V).

▼M4

Apskaičiavimas:

a) Atliekant ne biologinį bandymą iš sistemos pašalintą procentinę bandomosios cheminės medžiagos dalį (R_{VP}) galima apskaičiuoti pagal šią lygtį:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

kur:

R_{VP} = bandomosios cheminės medžiagos pašalinimas dėl lakiųjų junginių šalinimo (%),

S_{VP} = gaudyklėje surinktas bandomosios cheminės medžiagos kiekis, išreikštas skystosios fazės koncentracijos ekvivalentu,

S_{IP} = bandomosios cheminės medžiagos koncentracija intakyje (mg/l).

b) Atliekant biologinį bandymą procentinę iš sistemos pašalintos bandomosios cheminės medžiagos dalį (R_V) galima apskaičiuoti pagal šią lygtį:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

kur:

R_V = bandomosios cheminės medžiagos pašalinimas dėl lakiųjų junginių šalinimo (%) atliekant biologinį bandymą,

S_V = atliekant biologinį bandymą gaudyklėje surinktas bandomosios cheminės medžiagos kiekis, išreikštas skystosios fazės skystojo intakio koncentracijos ekvivalentu (mg/l),

S_I = bandomosios cheminės medžiagos koncentracija intakyje (mg/l).

c) Atliekant biologinį bandymą ir taikant visus procesus pašalinta procentinė bandomosios cheminės medžiagos dalis (R_T) apskaičiuojama pagal šią lygtį:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

kur:

S_E = bandomosios cheminės medžiagos koncentracija (skystame) ištakyje (mg/l).

d) Vadinasi, vykstant biologiniam skaidymui ir adsorbcijai pašalinta procentinė dalis (R_{BA}) apskaičiuojama pagal šią lygtį:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Turėtų būti atliekami atskiri bandymai siekiant nustatyti, ar bandomoji cheminė medžiaga yra adsorbuojama; jeigu adsorbuojama, šiuo atveju galima taikyti tolesnį koregavimą.

e) Palyginus iš biologinio (R_v) bandymo sistemų ir nebiologinio bandymo (R_{vp}) sistemų pašalintos bandomosios cheminės medžiagos proporcijas galima nustatyti bendrąjį poveikį, kurį biologinis valymas padarė bandomąją cheminę medžiagą išleidžiant į atmosferą.

Pavyzdys:

Benzenas

Dumblo išbuvimo trukmė = 4 dienos

Sintetinių nuotekų išbuvimo trukmė = 8 val.

$S_{IP} = S_I = 150$ mg/l

$S_{VP} = 150$ mg/l ($S_{EP} = 0$)

$S_V = 22{,}5$ mg/l

$S_E = 50$ µg/l

▼**M4**

Vadinasi,

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % ir R_{BA} = 85 %.

Daroma prielaida, kad dumblas neabsorbuoja benzeno.

LITERATŪRA

1. Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939–854.

2. Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

3. Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

4. 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.

5. Šio priedo C.4 skyrius. Lengvo biologinio skaidumo nustatymas.

▼M4

6 priedėlis

Dumblo išbuvimo trukmės (SRT) poveikis cheminių medžagų apdorojamumui

ĮVADAS

1. Naudojant aprašytą metodą įvertinama, ar bandomas chemine medžiagas (paprastai dėl savo sudėties laikomas biologiškai skaidžiomis, tačiau ne lengvai skaidžiomis) įmanoma biologiškai suskaidyti laikantis tų reikalavimų, kurie taikomi nuotekų valymo įrenginiams. Rezultatai pateikiami kaip procentinė pašalinimo ir biologinio suskaidymo vertė. Atsižvelgiant į veikliojo dumblo įrenginių naudojimo sąlygas ir intakio pasirinkimą galima taikyti įvairias bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ištakyje vertes. Atliekant bandymus taikoma tik viena nominalioji dumblo dribsnių koncentracija arba viena nominalioji dumblo išbuvimo trukmė (SRT) ir pasirinkus aprašytus dumblo nuostolių režimus SRT vertė gali gerokai skirtis atliekant bandymą (kiekvieną kitą dieną ir vieną dieną).

2. Pasirinkus šį variantą (1) (2) SRT kontroliuojama nustatant kur kas mažesnes ribines vertes per kiekvieną 24 val. laikotarpį (būtent taip nutinka pasirinkus didelį mastą), todėl ištakiuose nusistovi pastovesnė koncentracija. Rekomenduojama naudoti buitines nuotekas, nes šiuo atveju užtikrinama tolygesnė ir didesnė procentinė pašalinimo dalis. Taip pat nustatomas tam tikro SRT verčių skaičiaus poveikis ir atliekant nuodugnesnius tyrimus galima apibūdinti temperatūros intervalų poveikį ištakio koncentracijai.

3. Apskritai kol kas nėra susitarta, kokius kinetinius modelius taikyti, kai valant nuotekas biologiškai skaidomos cheminės medžiagos. Nuspręsta (1) (2), kad renkant duomenis taikytinas bakterijų augimo ir substrato naudojimo Mono kinetikos modelis, nes šis metodas skirtas taikyti tik toms cheminėms medžiagoms, kurių pagaminami dideli kiekiai ir todėl sukuriama didesnė negu 1 mg/l koncentracija. Supaprastinto modelio tinkamumas ir padarytos prielaidos buvo pagrįstos naudojant alkoholio etoksilatus, kuriems būdingas kintančio laipsnio pirminis biologinis skaidumas.

Pastaba. Šis metodas variantas didesniąja dalimi atitinka šio bandymo metodo C.10-A aprašymą ir toliau pateikiama tik ta informacija, kuri neatitinka teksto.

BANDYMO METODO ESMĖ

4. Veikliojo dumblo akytieji indai, naudojami siekiant palengvinti (beveik) nenutrūkstamąjį mišriojo skysčio nuostolių susidarymą, siekiant labai tiksliai kontroliuoti dumblo išbuvimo trukmę (SRT arba θ_s), taikomi nenaudojant bandymo įrenginio ir kontrolinio įrenginio mikrobų populiacijos suvienodinimo procedūros ir pasirenkant SRT verčių bei, jeigu reikia, temperatūros verčių intervalą. Išbuvimo trukmė paprastai būna 2–10 dienų ir pasirenkama 5–20 °C temperatūra. Nuotekos (pirmenybė teikiama buitinėms nuotekoms) ir bandomosios cheminės medžiagos tirpalas į įrenginį atskirai tiekiami tokiais kiekiais, kad būtų užtikrinama privaloma nuotekų išbuvimo trukmė (3–6 val.) ir reikiama bandomosios cheminės medžiagos koncentracija intakyje. Siekiant užsitikrinti galimybę palyginti, tuo pačiu metu eksploatuojami kontroliniai įrenginiai, kuriems bandomoji cheminė medžiaga nėra tiekiama.

5. Leidžiama naudoti kitų tipų įrenginius, tačiau būtina ypač stengtis tinkamai kontroliuoti SRT. Pvz., pasirinkus įrenginius su įrengtu nusodintuvu, gali tekti taikyti leidžiamąją kietųjų medžiagų nuostolių, kurių randasi iš įrenginio ištekant ištakiui, nuokrypą. Be to, turėtų būti imamasi specialių atsargumo priemonių siekiant išvengti paklaidų, kurių gali įsivelti kintant nusodintuve esančio dumblo kiekiui.

▼M4

6. Kiekvienas įrenginys naudojamas apibrėžus jo eksploatavimo sąlygų rinkinį ir, kai užtikrinama pusiausvyra, vidutinės pastovios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ištakiuose ir, jeigu reikia, DOC koncentracijos nusistovi maždaug per tris savaites. Įvertinama ne tik procentinė pašalintos bandomosios cheminės medžiagos ir, jeigu reikia, DOC procentinė dalis, tačiau taip pat brėžiamas įrenginio eksploatavimo sąlygų ir koncentracijos ištakyje santykio grafikas. Remiantis minėtais dalykais galima apskaičiuoti pradines kinetines konstantas ir sąlygas, kurias pasirinkus būtų įmanoma numatyti bandomosios cheminės medžiagos apdorojimo sąlygas.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

7. Taikomos C.10 A skyriaus 12 ir 13 pastraipos.

ATITIKTIES LYGIS

8. Taikomos C.10 A skyriaus 14 ir 15 pastraipos.

ETALONINĖ BANDOMOJI CHEMINĖ MEDŽIAGA

9. Taikoma C.10 A skyriaus 16 pastraipa.

BANDYMO REZULTATŲ ATKURIAMUMAS

10. Taikomos C.10 A skyriaus 17 ir 18 pastraipos.

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

11. Tinkamas įrenginys būtų modifikuota akytojo indo sistema (6.1 priedėlis). Ją sudaro iš akytojo propileno (jo storis 3,2 mm; poros dydis maždaug 90 μm) pagamintas vidaus indas (arba įdėklas); jį gaminant naudota sandūrinė suvirinimo siūlė. (Šis įrenginys yra kur kas tvirtesnis negu aprašytasis šio skyriaus C.10 A 21 pastraipoje). Įdėklas įstatomas į nelaidų polietileninį išorinį indą, sudarytą iš dviejų dalių: apskrito dugno, kuriame išgręžtos angos dviem oro linijoms ir dumblo išleidimo linijai prijungti, bei ant šio pagrindo užsukto viršutinio cilindro, turinčio išėjimo angą, įrengtą taip, kad būtų užtikrinama žinoma akytojo indo tūrio vertė (3 l). Vienoje iš oro linijų yra difuzoriaus akmenys, o kita linija yra atviru galu ir į inde esančius akmenis nukreipta statmenu kampu. Šia sistema sukuriama būtina turbulencija siekiant užtikrinti, kad indo turinys būtų visiškai sumaišomas ir kad ištirpusio deguonies koncentracijų vertės būtų didesnės negu 2 mg/l.

12. Reikiamas įrenginių skaičius reguliuojamoje temperatūroje (intervalas 5–20 °C (± 1 °C) laikomas vandens voniose ar pastovios temperatūros patalpose. Būtina naudoti siurblius, kuriais į aeracijos rezervuarus būtų leidžiamas bandomosios cheminės medžiagos tirpalas ir nusistojusios nuotekos (leidimo norma atitinkamai 0–1,0 ml/min ir 0–25 ml/min), o trečiuoju siurbliu iš aeracijos rezervuarų šalinamas perteklinis dumblas. Labai mažas būtinasis perteklinio dumblo srautas sukuriamas naudojant siurblį, nustatytą veikti didesne sparta, ir įjungiamą veikti su pertrūkiais (trūkųjį veikimą užtikrina laikmačio jungiklis, įsijungiantis ir veikiantis 10 sekundžių per min.); siurblio tiekimo intervalas yra 3 ml/min., todėl užtikrinama 0,5 ml/min. šalinimo norma.

Filtravimo įtaisas ar centrifuga

13. Taikoma C10 A skyriaus 23 pastraipa.

Analizės įranga

14. Taikoma C.10 A skyriaus 24 pastraipa.

Vanduo

▼M4

15. Taikomos C.10 A skyriaus 25 ir 26 pastraipos.

Organinė terpė

16. Taikoma C.10 A skyriaus 27 pastraipa.

Sintetinės nuotekos

17. Taikoma C.10 A skyriaus 28 pastraipa.

Buitinės nuotekos

18. Taikoma C.10 A skyriaus 29 pastraipa.

Veiklusis dumblas

19. Taikoma C10 A skyriaus 30 pastraipa.

Pradiniai bandomosios cheminės medžiagos tirpalai

20. Taikomos C.10 A skyriaus 31 ir 32 pastraipos.

BANDYMO EIGA

Sėjimo kultūros ruošimas

21. Taikoma tik C.10 A skyriaus 34 pastraipa – naudojamas veiklusis dumblas (apie 2,5 g/l).

Bandymo įrenginių skaičius

22. Norint atlikti paprastą bandymą, t. y. išmatuoti procentinę pašalinamą dalį, pakanka vieno SRT, tačiau siekiant gauti duomenis, reikalingus apskaičiuojant pradines kinetines konstantas, būtina turėti 4 ar 5 SRT vertes. Paprastai pasirenkamos 2–10 dienų vertės. Praktinėms reikmėms bandymą patogu vienu metu atlikti su 4 ar 5 SRT vertėmis; vykdant išsamesnius tyrimus naudojamos tos pačios SRT vertės ar turbūt skirtingų verčių intervalas, kai pasirenkamos kitos temperatūros vertės (5–20 °C). Pirminiam biologiniam skaidumui (pagrindinis naudojimas) paprastai reikalingas tik vienas įrenginys, kuriame taikomas tam tikrų sąlygų rinkinys. Tačiau visiškam biologiniam skaidumui būtinas kontrolinis įrenginys, kuriame naudojamos kiekvieno rinkinio sąlygos ir kuriam tiekiamos nuotekos, o ne bandomoji cheminė medžiaga. Jeigu daroma prielaida bandomąją cheminę medžiagą esant naudojamose nuotekose, vertinant pirminį biologinį skaidumą privaloma naudoti kontrolinius įrenginius ir atitinkamai tikslinti apskaičiavimus.

Organinės terpės ir bandomosios cheminės medžiagos dozavimas

23. C.10 A skyriaus 36–39 pastraipos yra taikomos, tačiau atkreiptinas dėmesys, kad bandomosios cheminės medžiagos tirpalas dozuojamas atskirai ir kad pasirenkami skirtingi dumblo šalinimo laipsniai. Be to, stebimi ir, jeigu reikia, ± 10 % tikslumu reguliuojami intakių, ištakių srautai ir dumblo šalinimo dažnumas, pvz., du kartus per dieną. Jeigu pasirinkus buitines nuotekas kyla sunkumų taikant analizės metodus, atliekamas bandymas naudojant sintetines nuotekos, tačiau šiuo atveju turi būti užtikrina, kad taikant skirtingą terpę būtų gaunami palyginami kinetiniai duomenys.

Veikliojo dumblo įrenginių tvarkymas

24. Taikomos C.10 A skyriaus 40–43 pastraipos, tačiau SRT vertė kontroliuojama tik „tolygiu“ dumblo šalinimu.

Ėminių ėmimas ir analizė

25. Taikomos C.10 A skyriaus 44–50 pastraipos, išskyrus bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertę ir DOC vertę, kurios nustatymas nėra privalomas; COD vertė neturėtų būti naudojama.

▼M4

DUOMENYS IR ATASKAITŲ TEIKIMAS

Rezultatų apdorojimas

26. Taikomos C.10 A skyriaus 52–54 pastraipos.

Tyrimo rezultatų išraiška

27. Taikomos C.10 A skyriaus 56–62 pastraipos.

Kinetinių konstantų apskaičiavimas

28. Laikytina, kad veikiau vertėtų nurodyti vidutinę stabilios būsenos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ištakyje vertę ir apibūdinti, kaip ji kinta atsižvelgiant į įrenginio eksploatavimo sąlygas, negu nurodyti procentinę pirminio biologinio skaidumo dalį. Šį reikalavimą galima įvykdyti pasinaudojus 6.2 priedėlio (6) lygtimi, kurią pritaikius galima apskaičiuoti K_S, μ_m ir θ_{SC} vertes ir kritinę dumblo išbuvimo trukmę.

(Antraip apytiksles K_S ir μm vertes galima nustatyti naudojant nesudėtingą kompiuterinę programą, kad pagal 2 lygtį (6.2 priedėlis) apskaičiuota teorinė kreivė būtų suderinama su gautomis eksperimentinėmis vertėmis. Nors joks nurodytas tirpalas nebus unikalus, tačiau galima apskaičiuoti apytiksles K_{Sr} ir μ_m vertes).

Rezultatų kintamumas

29. Įprastas dalykas, kad nustatomos pavienių cheminių medžiagų skirtingos kinetinių parametrų vertės. Paprastai laikoma, kad dumblo ruošimo sąlygos bei pagrindinės bandymo sąlygos (nurodytos 5 pastraipoje ir atliekant kitus bandymus) daro didelį poveikį nustatomoms vertėms. Vieną iš šio kintamumo atžvilgių aptaria Grady ir kt. (4), kuris pasiūlė, kad terminai „esamas“ ir „būdingas“ turėtų būti taikomi dviem ekstremaliosioms sąlygoms, apibūdinančioms tas fiziologinės būklės ribas, kuriomis atliekant bandymą įmanoma apibūdinti sėjimo kultūrą. Jeigu atliekant bandymą nenumatoma galimybė būklei kisti, šiuo atveju kinetinių parametrų vertės atitinka aplinkos sąlygas, kuriomis mikroorganizmai buvo paimti; šios vertės vadinamos „esamomis“ arba užtikrinamomis šiuo metu. Savo ruožtu, jeigu atliekant bandymą nustatomos tokios sąlygos, kad būtų sudaryta galimybė sukurti baltymų sintezės sistemą ir taip užtikrinta didžiausia galima augimo norma, apskaičiuoti kinetiniai parametrai vadinami „būdingais“ ir jie priklauso tik nuo substrato pobūdžio bei sėjimo kultūros bakterijų tipo. Rekomendacinės esamosios vertės apskaičiuojamos išlaikant mažą substrato koncentracijos ir atitinkamų mikroorganizmų (S_o/X_o) santykį, pvz., 0,0025, ir būdingosios vertės nustatomos taikant didelį santykį, pvz., bent jau 20. Abiem atvejais S_o vertė turėtų būti lygi atitinkamai Ks vertei ar ją viršyti, pusinės soties konstanta.

30. Kintamumas ir kiti biologinio skaidumo kinetiniai parametrai buvo aptarti neseniai surengtame SETAC seminare (5). Remiantis šiais tyrimais, pateikiant jų ataskaitas ir rengiant jų projektus ateityje bus galima aiškiau suprasti nuotekų valymo įrenginiuose galiojančius kinetinius parametrus siekiant patikimiau aiškinti turimus duomenis bei siūlyti tinkamesnius būsimų bandymų metodų projektus.

LITERATŪRA

1. Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33–48.

2. Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340–343.

3. Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411–422.

▼M4

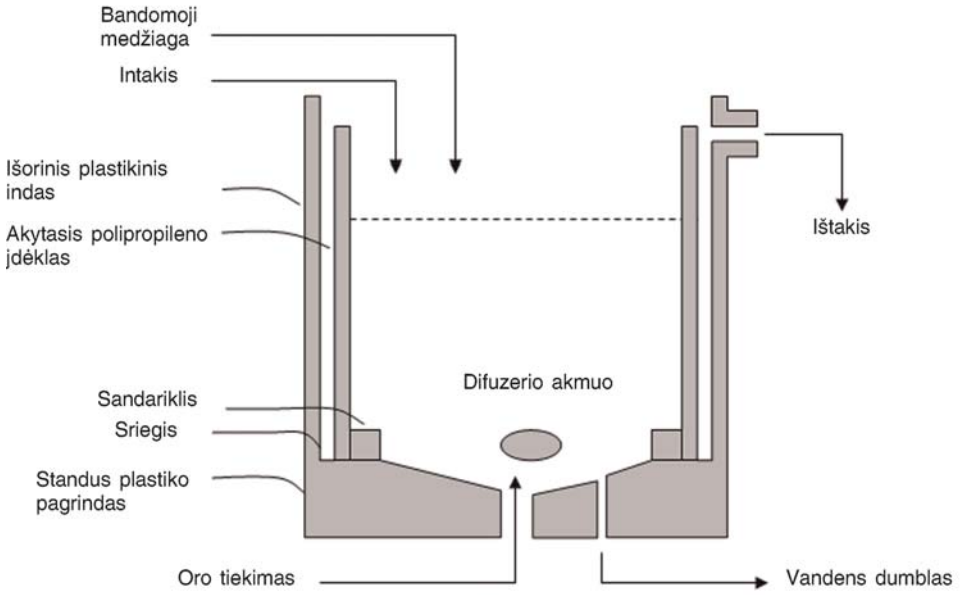
4. Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742–748.

5. Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4–6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

6.1 priedėlis

Akytasis indas su SRT kontrole



▼M4

6.2 priedėlis

Kinetinių konstantų apskaičiavimas

1. Padarius prielaidą, kad taikoma Mono kinetika ir atsižvelgiant į veikliųjų kietųjų medžiagų bei substrato masių balansą veikliojo dumblo sistemoje (1) galima sudaryti šias nuostovios būsenos išraiškas:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

arba

$$S_l = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

kur:

S_1 = substrato koncentracija ištakyje, (mg/l)

K_S = pusinės soties konstanta, kuriai esant koncentracija $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = savitoji augimo sparta (d^{-1})

μ_m = didžiausia $\mu_m(d^{-1})$ vertė

K_d = savitoji veikliųjų kietųjų medžiagų irimo sparta (d^{-1})

θ_S = vidutinė dumblo išbuvimo trukmė, SRT (d)

Išnagrinėjus šią lygtį daromos šios išvados:

i) ištakio koncentracija nėra susijusi su intakio koncentracija (S_0); vadinasi, procentinė biologinio skaidymo vertė skiriasi atsižvelgiant į intakio koncentraciją, S_0;

ii) vienintelis įrenginio kontrolinis parametras, darantis poveikį S_1, yra dumblo išbuvimo trukmė, θ_S;

iii) jeigu intakyje koncentracijos vertė yra S_0, kritinė dumblo išbuvimo trukmė būtų:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

kur:

θ_{SC} = kritinė dumblo išbuvimo trukmė; jeigu ji būtų trumpesnė, šiuo atveju atitinkami mikroorganizmai būtų pašalinami iš įrenginio.

iv) kiti lygties (2) parametrai siejami su kinetiniais augimo parametrais, todėl temperatūros vertė, tikėtina, darys poveikį ištakio substrato lygiui ir kritiniam dumblo amžiui, t. y. dumblo išlaikymo trukmė, būtina užtikrinant tam tikrą valymo laipsnį ilgėja, jeigu pasirenkama žemesnė temperatūra.

2. Atsižvelgiant į akytojo indo sistemos kietųjų medžiagų masės balansą ir darant prielaidą, kad kietųjų medžiagų koncentracija įrenginio ištakyje X_2, palyginti su koncentracija aeracijos rezervuare, yra maža, X_1, dumblo išbuvimo trukmė

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼M4

ir

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

kur:

V = aeracijos rezervuaro tūris (l)

X_1 = kietųjų medžiagų koncentracija aeracijos rezervuare (mg/l)

X_2 = kietųjų medžiagų koncentracija ištakyje (mg/l)

Q_0 = ištakio srautas (l/d)

Q_1 = perteklinio dumblo srautas (l/d)

Vadinasi, iš anksto pasirinktą bet kokią dumblo išbuvimo trukmę įmanoma kontroliuoti reguliuojant perteklinio dumblo srautą Q_1.

Išvados

3. Pagrindinis bandymo tikslas – leisti susidaryti ištakio koncentracijai ir, vadinasi, taip numatyti bandomosios cheminės medžiagos lygius priimančiuosiuose vandenyse.

4. Brėžiant S_1 kreivę, kai atsižvelgiama į θ_S, kartais įmanoma nesunkiai įvertinti kritinę dumblo išbuvimo trukmę, pvz., 3 kreivė 1 pvz., Jeigu šito padaryti neįmanoma, θ_{SC} galima apskaičiuoti, kartu su apytikrėmis μ_m ir K_S vertėmis, kai S_1 kreivė brėžiama atsižvelgiant į $S_1 \bullet \theta_S$.

Pertvarkius 1 lygtį gaunama

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Jeigu K_d vertė yra maža, šiuo atveju $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$ ir [5] virsta:

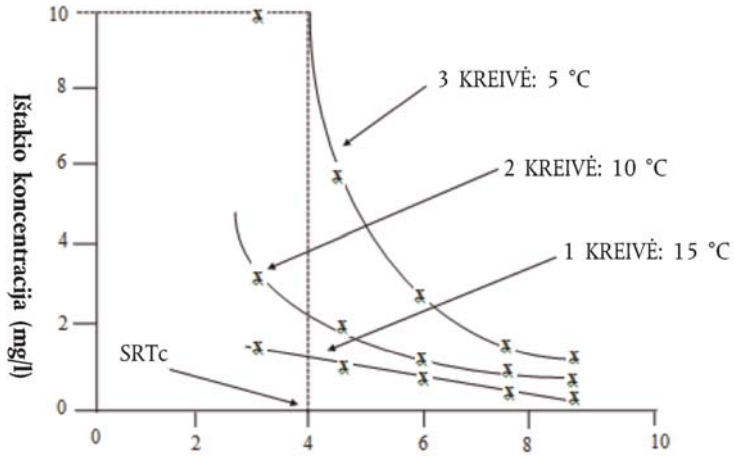
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Vadinasi, brėžiamas grafikas turėtų būti tiesi linija (žr. 2 pav.), kurios krypties koeficientas $1/\mu_m$, ir atkarpa K_S/μ_m; taip pat $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

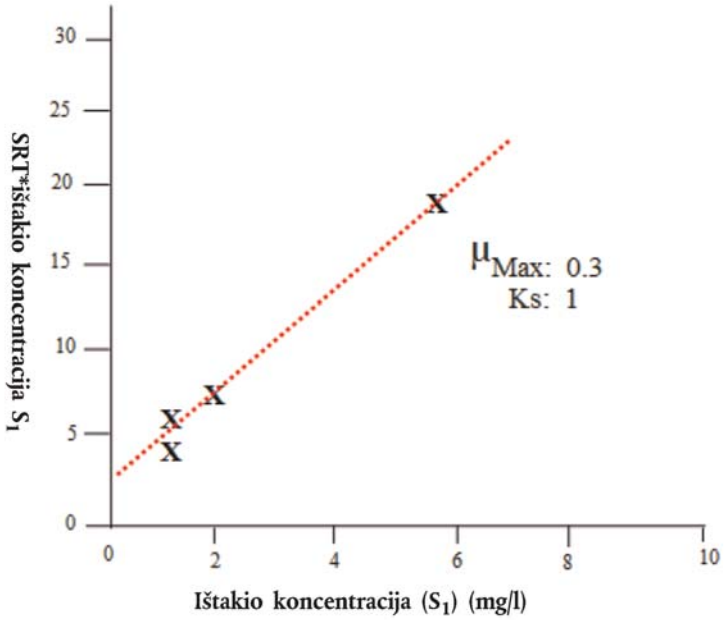
1 paveikslas

Trys temperatūros vertės; penkios SRT vertės



2 paveikslas

Regresijos tiesė SRT S_1 atsižvelgiant į S_1, kai T = 5 °C



Žodynėlis

ištakio koncentracija

kreivė

▼M4

7 priedėlis

BANDYMAS ESANT MAŽAM (μg/l) KONCENTRACIJOS INTERVALUI

1. Daug cheminių medžiagų vandens aplinkoje, net nuotekose, būna labai mažos koncentracijos (μg/l). Kadangi jų koncentracijos mažos, todėl šios cheminės medžiagos, ko gero, nėra augimą sukeliantys pirminiai substratai ir veikiau tikėtina, kad jos būsiančios suskaidytos kaip neaugantys antriniai substratai, veikiantys kartu su gamtoje pasitaikančiomis organinėmis medžiagomis. Vadinasi, šių cheminių medžiagų skaidymas neatitinka 6 priedėlyje aprašyto modelio. Aprašyta daug modelių, kuriuos būtų galima taikyti, ir atsižvelgiant į nuotekų valymo sistemose pasirenkamas sąlygas vienu metu galima taikyti daugiau negu vieną modelį. Siekiant išspręsti šį klausimą privaloma atlikti kur kas daugiau mokslinių tyrimų.

2. Kol kas galima taikyti pagrindinėje teksto dalyje (C.10 A skyriuje) aprašytą procedūrą, tačiau tik pirminio biologinio skaidumo atžvilgiu, ir šiuo tikslu naudoti tinkamas mažas koncentracijas (< 100 μg/l) ir patvirtintas analizės procedūras. Procentinę biologinę skaidymo vertę galima apskaičiuoti (žr. Bandymo metodo 54 pastraipą), jeigu atsižvelgiama į abiotinius procesus (adsorbciją, lakumą ir t. t.). Pavyzdžiu laikytinas Niholmo ir jo kolegų (1)(2) atliktas tyrimas naudojant 4 val. ciklą pildymo ir išleidimo sistemoje. Jie pateikė 5 cheminių medžiagų, įterpiamų į sintetines nuotekas (5–100 μg/l), pseudopirmojo laipsnio konstantas. (Nustatant visišką biologinį skaidymą galima naudoti ^{14}C pažymėtąsias bandomąsias chemines medžiagas). Minėtas aprašymas nepatenka į šio bandymo metodo taikymo sritį, nes kol kas nėra parengtų suderintų procedūrų, nors į standarte ISO 14 592 (3) pasiūlytą metodą įtrauktos ^{14}C paženklintųjų cheminių medžiagų naudojimo gairės.

SCAS bandymas

3. Vėliau buvo pasiūlytas paprastesnis dviejų etapų bandymas (4) (5) (6); po pusiau nepertraukiamo veikimo aktyviojo dumblo (SCAS) metodo atliekami trumpalaikiai kinetiniai bandymai su mėginiais, paimtais iš SCAS įrenginių. SCAS sistema naudojama žinant šalinamo dumblo kiekį (priešingai negu originaliame C.12 bandymo metode) ir į ją tiekiamos modifikuotos OECD sintetinės nuotekos arba buitinės nuotekos. Sintetinės nuotekos buvo modifikuotos (dėl kintančios pH vertės ir per mažos dumblo nusėdimo gebos) į jas įterpiant fosfato buferio, mielių ekstrakto, geležies (III) chlorido ir mikroelementų druskų bei jų COD vertė padidinta maždaug 750 mg/l (šiuo tikslu padidinta peptono ir mėsos ekstrakto koncentracija). Įrenginiai naudoti 24 val. ciklu: 23 val. aeracija, dumblo šalinimas, nusodinimas, nusistojusio skysčio (ištakio šalinimas), tada sintetinių nuotekų ir bandomosios cheminės medžiagos įterpimas, ne didesnės negu 100 μg/l koncentracijos (t. y. maždaug tokia pati koncentracija kaip naudotoji atliekant trumpalaikį bandymą). Kartą per savaitę 10 % bendro dumblo kiekio pakeičiama šviežiu dumblu siekiant išlaikyti subalansuotą mikrobų populiaciją.

4. Pradėjus aeraciją ir ją užbaigus matuojamos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ir bandymas tęsiamas tol, kol užtikrinamas tolygus bandomosios cheminės medžiagos šalinimas; šis procesas trunka nuo vienos savaitės iki kelių mėnesių.

Trumpalaikis bandymas

5. Trumpalaikis bandymas (pvz., 8 val.) atliekamas siekiant nustatyti veikliajame dumble, kurio kilmė yra žinoma, tačiau skirtinga, esančios bandomosios cheminės medžiagos irimo pseudopirmojo laipsnio kinetinę konstantą. Dumblo ėminiai paimami iš SCAS reaktorių – aeracijos laikotarpio pabaigoje, kai organinio substrato koncentracija maža – atliekant aklimatizacijos eksperimentą (3, 4 pastraipos). Dumblą taip pat galima paimti ir palyginti iš gretimo SCAS įrenginio, kuriame nenaudota bandomoji cheminė medžiaga. Įterpiami dviejų ar daugiau koncentracijų (koncentracijos intervalas 1–50 μg/l) dumblo ir bandomosios cheminės medžiagos mišiniai yra aeruojami

▼M4

nepridedant sintetinių nuotekų arba kito organinio substrato. Ne ilgesnį negu 24 val. laikotarpį reguliariais intervalais nustatomas tirpale likusios bandomosios cheminės medžiagos kiekis, pvz., kas valandą (šiuo atžvilgiu paisoma cheminės medžiagos skaidomumo). Prieš atliekant būtiną analizę ėminiai yra centrifuguojami.

Apskaičiavimai

6. Naudojant SCAS įrenginius gauti duomenys taikomi apskaičiuojant bandomosios cheminės medžiagos procentinę šalinimo dalį (54 pastraipa). Taip pat vidutinę greičio konstantą K_1 (normalizuotą suspenduotų medžiagų koncentraciją) galima apskaičiuoti pagal šią lygtį:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln\frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

kur:

t = aeracijos trukmė (23 val.)

C_e = koncentracija aeracijos laikotarpio pabaigoje (μg/l)

C_i = koncentracija aeracijos laikotarpio pradžioje (μg/l)

SS = veikliojo dumblo suspenduotų medžiagų koncentracija (g/l)

7. Atliekant trumpalaikį bandymą brėžiama likusios log % koncentracijos priklausomybė nuo trukmės ir linijos pradinės dalies (10–50 % skaidymas) statumas yra tapatus K_1. Konstanta normalizuojama dumblo kietųjų medžiagų koncentracijos atžvilgiu ir šiuo tikslu kreivės krypties koeficientas dalinamas iš dumblo kietųjų medžiagų koncentracijos. Į pateikiamą rezultatą taip pat turi būti įtraukta informacija apie bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas ir suspenduotas medžiagas, dumblo išbuvimo trukmę, dumblo įkrovą, šaltinį ir duomenys (jeigu turima) apie bandomosios cheminės medžiagos pradinį poveikį.

Rezultatų kintamumas

8. Kintamumas ir kiti biologinio skaidumo kinetiniai parametrai buvo aptarti neseniai surengtame SETAC seminare (7). Remiantis šiais tyrimais, pateikiant jų ataskaitas ir rengiant jų projektus ateityje bus galima aiškiau suprasti nuotekų valymo įrenginiuose galiojančius kinetinius parametrus siekiant patikimiau aiškinti turimus duomenis bei siūlyti tinkamesnius būsimų bandymų metodų projektus.

LITERATŪRA

1. Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339–353.

2. Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505–1510.

3. ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼M4

4. Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and μg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851–864.

5. Berg UT and Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (μg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711–735.

6. Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

7. Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4–6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

C. 10-B. Biologinės plėvelės

ĮVADAS

1. Modeliavimo bandymai paprastai atliekami su cheminėmis medžiagomis, kurios neatitiko lengvo biologinio skaidomumo atrankos bandymo (šio priedo (9) C.4 A–F skyrius), tačiau kurios atitiko būdingojo biologinio skaidumo bandymo reikalavimus. Visų pirma modeliavimo bandymai taip pat taikomi bet kokiai cheminei medžiagai, apie kurią būtina gauti daugiau informacijos, ypač tas chemines medžiagas, kurių gaminami dideli kiekiai, o šiaip atliekamas veikliojo dumblo bandymas (C.10 A). Tačiau tam tikromis aplinkybėmis būtina speciali informacija apie cheminės medžiagos elgseną, kai ši medžiaga naudojama valant nuotekas, jeigu taikoma biologinė plėvelė, būtent laistomieji reaktoriai, pasukamieji nardinamieji reaktoriai, kybantieji sluoksniai.

2. Gerike ir kt. (1) naudojo didelius, bandomųjų matmenų laistomuosius reaktorius, kuriuos naudojant taikyta bandymo įrenginio ir kontrolinio įrenginio mikrobų populiacijos suvienodinimo procedūra. Šie reaktoriai užima daug vietos ir jiems reikia palyginti didelių nuotekų ar sintetinių nuotekų kiekių. Truesdale ir kt. (2) aprašo mažesnius filtrus (6 pėd. × 6 col. skersmens), į kuriuos tiekiamos nuotekos be paviršinio aktyvumo medžiagos, tačiau kuriems vis tiek būtina tiekti gana didelius kiekius. Reikalingas ne trumpesnis negu 14 savaičių laikotarpis, kol susiformuoja „brandi“ biologinė plėvelė, ir būtinas papildomas 4–8 savaičių laikotarpis po bandomosios paviršinio aktyvumo medžiagos įterpimo, kad galėtų vykti aklimatizavimo procesas.

3. Baumann ir kt. (3) sukūrė kur kas mažesnį filtrą, kuriame naudojami poliesterio minkštos masės strypeliai, iš anksto panardinami į veiklųjį dumblą, atstojantį biologinės plėvelės formavimąsi skatinančią inertinę terpę. Naudota bandomoji cheminė medžiaga, kuri buvo vienintelis anglies šaltinis, ir biologinis skaidumas įvertinamas išmatavus ištirpusios organinės anglies (DOC) vertę intakyje ir ištakyje bei atsižvelgiantį į CO_2 kiekį išėjimo dujose.

4. Visiškai skirtingo požiūrio laikėsi Gloyna *ir kiti.* (4), kuris išrado sukamąjį vamzdinį reaktorių. Ant pasukamojo vamzdžio vidinio paviršiaus žinomame plote buvo išauginta biologinė plėvelė; šiuo tikslu per nedideliu kampu į horizontalę pakreipto vamzdžio viršutinę dalį buvo leidžiamas intakis. Naudojant reaktorių buvo tiriamas paviršinio aktyvumo medžiagų biologinis skaidumas (5) ir nustatinėjamas tinkamiausias biologinės plėvelės storis bei per plėvelę vykstanti difuzija (6). Kiti autoriai toliau tobulino reaktorių, įskaitant jo modifikavimą, kad būtų įmanoma nustatyti CO_2 kiekį išėjimo dujose.

5. Sukamąjį vamzdinį reaktorių Analitikų nuolatinis komitetas (Jungtinė Karalystė) patvirtino kaip standartinį metodą, taikytiną įvertinant cheminių medžiagų biologinį skaidumą (7), nuotekų apdorojamumą ir jų toksiškumą (8). Toliau aprašytiems metodams būdingas paprastumas, glaustumas, atkuriamumas ir juos taikant naudojamas palyginti nedidelis organinės terpės kiekis.

BANDYMO METODO ESMĖ

6. Ant iš lėto besisukančio pakreipto vamzdžio vidinio paviršiaus pilamos sintetinės ar buitinės nuotekos ir bandomoji cheminė medžiaga (pilamas jų mišinys ar jos pilamos atskirai). Ant vidinio paviršiaus išauginamas į biologinio filtro terpėje naudojamuosius mikroorganizmus panašių mikroorganizmų sluoksnis. Pasirenkamos tokios reaktoriaus eksploatavimo sąlygos, kad būtų užtikrinamas reikiamas organinės medžiagos šalinimas ir, jeigu reikia, amonio oksidavimas.

▼M4

7. Ištakis iš vamzdžio yra surenkamas ir arba nusodinamas, ir (arba) filtruojamas; tada taikant specialų metodą atliekama ištirpusios organinės anglies (DOC) ir bandomosios cheminės medžiagos analizė. Tuo pačiu metu ir tomis pačiomis sąlygomis, siekiant turėti galimybę palyginti, eksploatuojami kontroliniai įrenginiai, kuriems bandomoji cheminė medžiaga nėra tiekiama. DOC koncentracijų skirtumas ištakyje iš bandomojo ir kontrolinio įrenginių laikomas atsiradusiu dėl bandomosios cheminės medžiagos arba jos organinių metabolitų. Šis skirtumas lyginamas su įterpiamos bandomosios cheminės medžiagos koncentracija (kaip DOC) siekiant apskaičiuoti pašalinamą bandomosios cheminės medžiagos kiekį.

8. Biologinį skaidymą nuo bioadsorbcijos paprastai įmanoma atskirti nuodugniai išnagrinėjus šalinimo ir laiko kreivę. Patvirtinimą paprastai galima užsitikrinti atliekant lengvo biologinio skaidymo bandymą (deguonies suvartojimo arba anglies dioksido susidarymo); šiuo atveju naudojama aklimatizuota sėjimo kultūra, bandymo pabaigoje paimta iš reaktorių, į kuriuos tiekiama bandomoji cheminė medžiaga.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

9. Bandomosios cheminės medžiagos grynumas, tirpumas vandenyje, lakumas ir sugerties charakteristikos turėtų būti žinomos siekiant teisingai aiškinti rezultatus.

10. Su lakiosiomis ir mažai tirpiomis cheminėmis medžiagomis paprastai neįmanoma atlikti bandymų, jeigu nesiimama specialių atsargumo priemonių (žr. C.10 skyriaus 5 priedėlį). Taip pat turėtų būti žinoma cheminė struktūra ar bent jau empirinė formulė siekiant apskaičiuoti teorines vertes ir (arba) patikrinti išmatuotas parametrų vertes, pvz., teorinį deguonies poreikį (toliau – ThOD), ištirpusią organinę anglį (DOC).

11. Informacija apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą mikroorganizmams (žr. C,10 A skyriaus 4 priedėlį) gali praversti renkantis atitinkamas atliekant bandymą taikomas koncentracijas ir gali būti svarbi aiškinant mažas biologinio skaidumo vertes.

ATITIKTIES LYGIAI

12. Iš pradžių buvo reikalauta, kad paviršinio aktyvumo medžiagų pirminis biologinis skaidumas būtų 80 % ar didesnis, ir šiuo atveju cheminę medžiagą būdavo leidžiama pateikti rinkai. Jeigu neužtikrinama 80 % vertė, galima atlikti šį modeliavimo (patvirtinimo) bandymą ir paviršinio aktyvumo medžiagą rinkai galima pateikti tik tuo atveju, jeigu pašalinama daugiau negu 90 % konkrečios cheminės medžiagos. Dėl cheminių medžiagų apskritai nekeliamas atitikties ir (arba) neatitikties klausimas ir užtikrinamą procentinę pašalinimo dalį galima naudoti apytiksliai apskaičiuojant galimą koncentraciją aplinkoje, taikytiną įvertinant cheminių medžiagų keliamą pavojų. Atlikus grynųjų cheminių medžiagų tam tikrą skaičių tyrimų nustatyta, kad daugiau negu trimis ketvirčiais atvejų buvo pašalinta > 90 % DOC ir 80 % pašalinta daugiau negu 90 % cheminių medžiagų atveju, kurioms nebuvo būdingas bent kiekis didesnis biologinis skaidumas.

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

13. Siekiant užtikrinti, kad bandymo procedūra būtų taikoma pagal reikalavimus, tikslinga retkarčiais atlikti bandymus su etaloninėmis cheminėmis medžiagomis, kurių ypatybės yra žinomos. Šioms cheminėms medžiagoms priskiriama adipo rūgštis, 2-fenilfenolis, 1-naftoliai, difeno rūgštis, 1-naftalenkarboksirūgštis.

BANDYMO REZULTATŲ ATKURIAMUMAS

14. Laboratorija Jungtinėje Karalystėje nustatė, kad santykinis standartinis nuokrypis atliekant bandymus turi būti 3,5 % ir 5 % tarp bandymų (7).

▼M4

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Įrenginys

Sukamieji vamzdiniai reaktoriai

15. Įrenginį sudaro (žr. 8 priedėlio 1 ir 2 pav.) akrilo vamzdžių grupė (kiekvieno ilgis 30,5 cm ir 5 cm vidinis skersmuo), paremta guma apjuostais ratais, įtaisytais į metalinį atraminį rėmą. Kiekvienas vamzdis turi išorinę briauną (apie 0,5 cm storio), kad jis nenuslystų nuo ratų, vidaus paviršius išklotas šiurkščia iš labai plonų minkštojo plieno pluošto siūlelių pagaminta kempine ir viršutinėje (tiekimo) dalyje yra 0,5 cm storio skystį sulaikanti vidinė briauna. Vamzdžiai į horizontalę pakreipti maždaug vieno laipsnio kampu, kad bandomąją terpę leidžiant į švarų vamzdį būtų užtikrinama reikiama sąlyčio trukmė. Gumos juosta apjuosti ratai sukami lėtaeigiu, keičiamo sukių dažnio varikliu. Vamzdžių temperatūra kontroliuojama įrenginį sumontuojant pastoviosios temperatūros patalpoje.

16. Kiekvieną reaktoriaus vamzdį įdėjus į šiek tiek didesnį užtaisytu galu vamzdį ir užtikrinus, kad jungtys nebūtų laidžios dujoms, šiuo atveju šarminiame tirpale galima surinkti išėjimo CO_2 ir tada išmatuoti jų kiekį (6).

17. Organinės terpės, į kurią įterpta bandomosios cheminės medžiagos, jeigu taikoma, kiekvienam vamzdžiui tiekimo atsarga 24 val. yra 20 l laikymo inde (A) (žr. 2 pav.). Jeigu reikia, atskirai galima įterpti bandomosios cheminės medžiagos tirpalo. Netoli kiekvieno laikymo indo dugno yra anga, tinkamu vamzdeliu, pvz., iš silikoninio kaučiuko, per peristaltinį siurblį (B) yra sujungta su stikliniu arba akrilo tiekimo vamzdeliu, kuris 2–4 cm įkištas į pakreipto vamzdžio (C) viršutinę (tiekimo) dalį. Ištakiui leidžiama lašėti iš apatinės pakreiptojo vamzdžio dalies; ištakis surenkamas kitame laikymo inde (D). Prieš atliekant analizę laukiama, kol ištakis nusistovi, arba jis filtruojamas.

Filtravimo įtaisas–centrifuga

18. Ėminių filtravimo įtaisas su būtino akytumo (nominalusis apertūros skersmuo 0,45 μm) membraniniais filtrais, adsorbuojančiais organines chemines medžiagas arba išskiriančiais kuo mažesnį organinės anglies kiekį. Jeigu naudojami organinę anglį išskiriantys filtrai, jie kruopščiai plaunami karštu vandeniu, kad būtų pašalinta išplaunamoji organinė anglis. Antraip leidžiama naudoti centrifugą, tinkančią užtikrinti 40 000 m/s^2.

19. Analizės įranga, naudojama nustatyti:

— DOC ir (arba) bendrąją organinę anglį (TOC) arba cheminį deguonies suvartojimą (COD),

— konkrečią cheminę medžiagą (HPLC, GC ir t. t.), jeigu reikia,

— pH, temperatūrą, rūgštingumą, šarmingumą,

— amonio, nitritų ir nitratų kiekį, jeigu bandymas atliekamas nitrifikacijos sąlygomis.

Vanduo

20. Vandentiekio vanduo, kuriame mažiau negu 3 mg/l DOC.

21. Distiliuotas ar dejonizuotas vanduo, kuriame mažiau negu 2 mg/l DOC.

▼M4

Organinė terpė

22. Kaip organinę terpę leidžiama naudoti sintetines nuotekas, buitines nuotekas ar abiejų mišinį. Įrodyta, kad naudojant tik buitines nuotekas pašalinama didesnė procentinė DOC dalis (veikliojo dumblo įrenginiuose) ir kad šiuo atveju net įmanoma biologiškai skaidyti tam tikras chemines medžiagas, nors šios cheminės medžiagos nėra biologiškai skaidomos, jeigu naudojamos OECD sintetinės nuotekos. Vadinasi, rekomenduojama naudoti buitines nuotekas. Išmatuojamos kiekvienos organinės terpės naujos partijos DOC (arba COD) vertės. Turėtų būti žinoma organinės terpės rūgštingumo arba šarmingumo vertė. Jeigu rūgštingumo ar šarmingumo vertė yra per maža, į organinę terpę gali tekti įleisti tinkamo buferinio tirpalo (natrio hidrokarbonato arba kalio dihidrofosfato), kad atliekant bandymą pH vertė reaktoriuje būtų maždaug 7,5 ± 0,5. Įterptinas buferinio tirpalo kiekis nustatomas ir jo įterpimo laikas pasirenkamas kiekvienu pavieniu atveju.

Sintetinės nuotekos

23. Kiekviename vandentiekio vandens litre ištirpinama: 160 mg peptono, 110 mg mėsos ekstrakto, 30 mg karbamido, 28 mg bevandenio kalio dihidrofosfato (K_2HPO_4), 7 mg natrio chlorido (NaCl), 4 mg kalcio chlorido dihidrato ($CaCl_2.2H_2O$), 2 mg magnio sulfato heptahidrato ($Mg_2SO_4.7H_20$). Šios OECD sintetinės nuotekos yra pavyzdinės ir jas naudojant užtikrinama vidutinė 100 mg/l DOC koncentracija intakyje. Antraip leidžiama naudoti kitokias sudėtis, kai užtikrinama beveik tokia pati DOC koncentracija, kuri labiau atitinka tikrųjų nuotekų vertę. Koncentruotų šių sintetinių nuotekų galima pasiruošti iš distiliuoto vandens ir jas laikyti vieną savaitę maždaug 1 °C temperatūroje. Jeigu reikia, skiedžiama vandentiekio vandeniu. (Ši terpė neatitinka reikalavimų, pvz., azoto koncentracija yra labai didelė, palyginti maža anglies koncentracija, tačiau kol kas geresnė priemonė nėra pasiūlyta, t. y. kaip buferinio skysčio įterpti daugiau fosfato ir papildomą peptono kiekį).

Buitinės nuotekos

24. Naudojamos šviežios nusistovėjusios nuotekos, kiekvieną dieną rinktos iš valymo įrenginių, į kuriuos daugiausiai patenka buitinės nuotekos. Jos turėtų būti renkamos iki pirminio nusodinimo ir iš pirminio nusodinimo rezervuaro nuleidimo kanalo arba iš veikliojo dumblo įrenginio tiekimo bei turi būti beveik be stambiųjų dalelių. Nuotekas galima naudoti jas palaikius kelias dienas maždaug 4 °C temperatūroje, jeigu įrodoma, kad laikant DOC vertė (arba COD vertė) nėra kiek daugiau sumažėjusi (t. y. mažiau negu 20 %). Siekiant apriboti sistemos trukdžius kiekvienos naujos partijos DOC vertė (arba COD vertė) prieš pradedant naudoti turėtų būti reguliuojama atsižvelgiant į atitinkamą pastovią vertę, pvz., skiedžiant vandentiekio vandeniu.

Tepalas

25. Glicerolio arba alyvuogių aliejumi leidžiama tepti peristaltinio siurblio velenėlius: abu aliejus leidžiama naudoti su silikoninio kaučiuko vamzdeliais.

Pradiniai bandomosios cheminės medžiagos tirpalai

26. Atitinkamo tirpumo cheminių medžiagų pradiniai tirpalai pasiruošiami reikiamos koncentracijos (pvz., 1–5 g/l) iš dejonizuoto vandens ar iš sintetinių nuotekų mineralinės dalies. Dėl netirpiųjų cheminių medžiagų žr. C.10 A skyriaus 5 priedėlį. Šis metodas nepritaikytas lakiosioms cheminėms medžiagoms, jeigu vamzdiniai reaktoriai nėra modifikuoti (16 pastraipa). Nustatomos pradinių tirpalų DOC ir TOC vertės ir pakartojami kiekvienos naujos partijos matavimai. Jeigu DOC ir TOC vertės skirtumas viršija 20 %, patikrinamas bandomosios cheminės medžiagos tirpumas vandenyje. Bandomosios cheminės medžiagos DOC vertė arba koncentracijos vertė, išmatuota

▼M4

taikant specialią pradinio tirpalo analizę, lyginama su nominaliąja verte siekiant nustatyti, ar atsistatymas yra ganėtinai geras (paprastai galima tikėtis > 90 %). Įvertinama, visų pirma dispersijų atžvilgiu, ar DOC galima ar negalima naudoti kaip analizės parametro, arba įmanoma naudoti tik bandomajai cheminei medžiagai būdingą analizės metodą. Iš dispersijų paimti mėginiai turi būti centrifuguojami. Naudojant specialų analizės metodą išmatuojama kiekvienos naujos partijos DOC, COD vertė arba bandomosios cheminės medžiagos kiekis.

27. Nustatoma pradinio tirpalo pH vertė. Jeigu nustatomos kraštutinės vertės, jos patvirtina, kad bandymo sistemos veikliojo dumblo pH vertei galėjo būti padarytas poveikis pridėjus cheminės medžiagos. Šiuo atveju pradinis tirpalas neutralizuojamas mažu neorganinės rūgšties ar bazės kiekiu siekiant užtikrinti, kad pH vertė būtų 7 ± 0,5, tačiau privaloma rūpintis, jog nebūtų nusodinama bandomoji cheminė medžiaga.

PROCEDŪRA

Organinės terpės paruošimas dozavimui

28. Užtikrinama, kad intakio ir ištakio talpyklos bei intakio indų ir ištakio indų jungiamieji vamzdeliai būtų kruopščiai išvalyti, kad iš pat pradžių ir atliekant bandymą būtų užkirstas kelias augti mikroorganizmams.

29. Iš kietųjų medžiagų arba iš koncentruoto pradinio tirpalo kiekvieną dieną pasiruošiama sintetinių nuotekų (23 pastraipa); jos ruošiamos tinkamai skiedžiant vandentiekio vandenį. Išmatuojamas būtinasis kiekis cilindre ir pridedama į švarų intakio indą. Taip pat, jeigu reikia, į sintetines nuotekas prieš skiedimą įdedamas reikiamas kiekis bandomosios cheminės medžiagos pradinio tirpalo arba etaloninės cheminės medžiagos. Bandomosios cheminės medžiagos atskirą atskiestą tirpalą leidžiama pasiruošti atskiroje talpykloje ir į pakreiptuosius vamzdžius šį tirpalą tiekti skirtingu dozavimo siurbliu, jeigu taip ruoštis tirpalą yra patogiau arba jeigu būtina išvengti bandomosios cheminės medžiagos nuostolių.

30. Antraip (šiam būdui teikiama pirmenybė) naudojamos kiekvieną dieną šviežiai surinktos, jeigu įmanoma, nusistovėjusios buitinės nuotekos (24 pastraipa).

Sukamųjų vamzdinių reaktorių naudojimas

31. Vienai bandomajai cheminei medžiagai ištirti reikalingi du tapatūs vamzdiniai reaktoriai, kurie sumontuojami pastovios temperatūros (paprastai 22 ± 2 °C) patalpoje.

32. Peristaltiniai siurbliai sureguliuojami taip, kad į 18 ± 2 sūk./min. sukamus pakreiptus vamzdžius būtų tiekiama 250 ± 25 ml/h organinės terpės (be bandomosios medžiagos). Atliekant bandymą siurblio vamzdžiai iš pradžių ir paskui reguliariai sutepami tepalu (25 pastraipa) norint užtikrinti tinkamą veikimą ir prailginti vamzdyno eksploatavimo trukmę.

33. Vamzdžių pokrypis į horizontalę sureguliuojamas taip, kad tiekiamos medžiagos išbuvimo trukmė švariame vamzdyje būtų 125 ± 12,5 sek. Išbuvimo trukmė apskaičiuojama į mitybinę terpę pridedant nebiologinio žymeklio (pvz., NaCL, inertinio dažiklio): trukmė, per kurią sukuriama didžiausia koncentracija ištakyje, laikoma vidutine išbuvimo trukme (jeigu naudojama storiausia plėvelė, šiuo atveju išbuvimo trukmė gali pailgėti ne daugiau negu 30 min.).

34. Nustatyta, kad taikant šias normas, greitį ir trukmę užtikrinamas pakankamas (> 80 %) DOC (arba COD) pašalinimas ir paruošiami nitrifikuoti ištakiai. Srauto dydis turėtų būti keičiamas, jeigu šalinimas yra nepakankamas arba jeigu turi būti modeliuojama konkretaus valymo įrenginio veikla. Pastaruoju atveju organinės terpės dozavimo norma koreguojama taip, kad reaktoriaus veiklos parametrai atitiktų valymo įrenginio veiklos parametrus.

▼M4

Sėjimo kultūros įdėjimas

35. Jeigu naudojamos sintetinės nuotekos, kad pradėtų augti mikroorganizmai gali pakakti oru atliekamo sėjimo kultūros įdėjimo, tačiau antraip būtina 3 dienas pridėti po 1 ml/l nusodintojo dumblo.

Matavimai

36. Reguliariais intervalais tikrinama, ar dozės, normos ir sūkių dažnio vertės atitinka nustatytąsias ribines vertes. Taip pat matuojama ištakio pH vertė, ypač tuo atveju, jeigu numanoma vyksiant nitrifikacijos procesą.

Ėminių ėmimas ir analizė

37. Ėminių ėmimo metodas, modelis ir dažnumas pasirenkami atsižvelgiant į bandymo tikslą. Pvz., imami žvalgomieji intakio ir ištakio ėminiai arba ėminiai imami ilgesniu laikotarpiu, pvz., 3–6 val. Pirmuoju etapu, kai nenaudojama bandomoji cheminė medžiaga, ėminiai imami du kartus per savaitę. Ėminiai 15 min. (18 pastraipa) filtruojami per membranas ar centrifuguojami maždaug 40 000 m/sec^2. Prieš atliekant membraninį filtravimą gali tekti palaukti, kol ėminiai nusistovės ir (arba) juos filtruoti per stambų filtrą. Ne mažiau negu du kartus nustatomos DOC (arba COD) vertės ir, jeigu reikia, BOD, amonio, nitritų ir (arba) nitratų vertės.

38. Visos analizės turėtų būti atliekamos iš karto po ėminių paėmimo ar jų paruošimo. Jeigu analizių atlikimas turi būti atidedamas, sklidinuose sandariai užkimštuose buteliuose ir tamsoje ėminiai laikomi apie 4 °C temperatūroje. Jeigu ėminius būtina laikyti ilgiau negu 48 val., jie sandėliuojami užšaldyti, parūgštinti arba pridedant tinkamos toksiškos cheminės medžiagos (pvz., 20 ml/l 10 g/l gyvsidabrio (II) chlorido tirpalo). Pasirūpinama, kad naudojant išsaugojimo metodą nebūtų daromas poveikis analizės rezultatams.

Darbinės būsenos paruošimo laikotarpis

39. Šiuo laikotarpiu paviršinė biologinė plėvelė auga, kol jos storis atitinka optimalią vertę; paprastai šis laikotarpis trunka maždaug dvi savaites ir jo trukmė neturėtų viršyti šešių savaičių. DOC (arba COD) šalinimo vertė (44 pastraipa) didėja ir ima atitikti kreivės plokščiosios srities vertę. Kai abiejuose vamzdžiuose užtikrinama panaši kreivės plokščiosios dalies vertė, vienas iš vamzdžių likusiai bandymo daliai pasirenkamas kaip kontrolinis vamzdis; šioje bandymo dalyje vamzdžių veikimo parametrai neturėtų kisti.

Bandomosios cheminės medžiagos įterpimas

40. Šiame etape į kitą reaktorių įterpiama reikiamos koncentracijos (paprastai 10–20 mg C/l) cheminė medžiaga. Į kontrolinį vamzdį tiekiama tik organinė terpė.

Aklimatizavimo laikotarpis

41. Du kartus per savaitę privalomai atliekamos DOC (arba COD) analizės ir, jeigu turi būti įvertintas pirminis biologinis skaidumas, atliekant specialią analizę taip pat matuojama bandomosios cheminės medžiagos koncentracija. Nuo pirmojo bandomosios cheminės medžiagos įterpimo laukiama nuo vienos iki šešių savaičių (ar ilgiau, jeigu pasirenkamos specialios sąlygos), kol pasibaigia aklimatizavimas. Kai procentinės šalinimo dalies (43–45 pastraipos) vertė ima atitikti didžiausią vertę, per 3 savaites nustatomos 12–15 galiojančių kreivės plokščiosios dalies tarpsnio reikšmių siekiant įvertinti vidutinę šalinimo procentinę dalį. Bandymas laikomas užbaigtu, jeigu užtikrinamas ganėtinai didelis šalinimo laipsnis. Bandymo trukmė paprastai neturi būti ilgesnė negu 12 savaičių po pirmojo bandomosios cheminės medžiagos įterpimo.

▼M4

Plėvelės šalinimas

42. Ganėtinai reguliariais intervalais iš vamzdžių staigiai šalinami dideli perteklinės plėvelės kiekiai. Siekiant rezultatų palyginamumą apsaugoti nuo poveikio, atliekant bandymus turi būti aprėpiami bent du išsamūs augimo ir šalinimo ciklai.

DUOMENYS IR ATASKAITŲ TEIKIMAS

Rezultatų apdorojimas

43. Kiekvieno pasirinkto įvertinimo laiko bandomosios cheminės medžiagos šalinimo procentinė DOC arba COD dalis apskaičiuojama pagal šią lygtį:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

kur:

D_t = pašalinta procentinė DOC arba COD dalis t laiko momentu;

C_s = su bandomąja chemine medžiaga susijusi DOC (arba COD) koncentracija ištakyje; ją geriausiai apskaičiuoti atsižvelgiant į pradinio tirpalo koncentraciją (mg/l) ir pridėtą jo kiekį;

E = t laiko momentu bandomajame ištakyje išmatuota DOC (arba COD) vertė (mg/l);

Eo = t laiko momentu kontroliniame ištakyje išmatuota DOC (arba COD) vertė (mg/l).

Apskaičiuojamos etaloninės cheminės medžiagos vertės, jeigu ji bandoma.

Kontrolinio reaktoriaus veikimo parametrai

44. Atliekant bandymą DOC (arba COD) šalinimo laipsnis (D_B) iš kontrolinio reaktoriaus organinės terpės praverčia vertinant biologinės plėvelės biologinio skaidymo veiksmingumą. Pašalinama procentinė dalis apskaičiuojama pagal šią lygtį:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\ \%$$

kur:

C_m = kontrolinio intakio organinės terpės DOC (arba COD) vertė (mg/l).

45. Pašalintas bandomosios cheminės medžiagos kiekis (D_{ST}), jeigu matuojama naudojant specialų analizės metodą kiekvieno įvertinimo metu, apskaičiuojamas pagal šią lygtį:

$$DST = 100\ (1 - S_e/S_i)\ \%$$

kur:

Si = išmatuota arba verčiau apytiksliai apskaičiuota bandomosios cheminės medžiagos koncentracija bandomajame intakyje (mg/l)

Se = laiko momentu t išmatuota bandomosios cheminės medžiagos koncentracija bandomajame ištakyje (mg/l)

▼M4

Jeigu taikant analizės metodus nustatoma nekintančio nuotekų atitikmens teigiamoji vertė S_c mg/l, procentinė šalinimo vertė (D_{SC}) apskaičiuojama pagal šią lygtį:

$$DSC = 100\ (S_i - S_e + S_c)/(S_i + Sc)\ \%$$

Tyrimo rezultatų išraiška

46. Brėžiamas šalinimo procentinės dalies D_t ir D_{ST} (arba D_{SC}), jeigu turima, priklausomybės nuo laiko grafikas (žr. C.10 A skyriaus 2 priedėlį). Naudojamas vidutinis (išreikštas kaip artimiausias sveikasis skaičius) ir standartinis nuokrypis, susijęs su D_T (ir D_{ST}, jeigu turima) 12–15 verčių, nustatytų kreivės plokščiosios dalies tarpsnyje kaip bandomosios cheminės medžiagos procentinė šalinimo dalis. Atsižvelgiant į šalinimo kreivės formą galima daryti kelias su šalinimo procesais susijusias išvadas.

Adsorbavimas

47. Jeigu pradėjus bandymą nustatomas didelio kiekio DOC šalinimas iš bandomosios cheminės medžiagos, šiuo atveju tikėtina, kad bandomoji cheminė medžiaga šalinama todėl, kad ją absorbuoja biologinė plėvelė. Šį procesą gali būti įmanoma įrodyti iš plėvelės paimtoje kietojoje medžiagoje nustačius adsorbuotos bandomosios cheminės medžiagos kiekį. Neįprasta, jeigu atliekant bandymą iš adsorbuojamų cheminių medžiagų būtų šalinamas didelis DOC kiekis; paprastai didelis kiekis šalinamas iš pradžių, o vėliau jis laipsniškai mažėja ir prilygsta pusiausvyros vertei. Tačiau jeigu adsorbuojant bandomąją cheminę medžiagą buvo sukeltas mikrobų populiacijos aklimatizavimas, šalinimas DOC kiekis iš bandomosios cheminės medžiagos vėliau turėtų didėti ir atitikti aukštą kreivės plokščiosios srities vertę.

Vėlavimo tarpsnis

48. Kaip ir atliekant statinius bandymus, darant daugelio bandomųjų cheminių medžiagų atrankos bandymus būtinas vėlavimo tarpsnis, kol visiškai užbaigiamas biologinis skaidymas. Vėlinimo tarpsnyje skaidančios bakterijos aklimatizuojasi arba prisitaiko ir šiame etape beveik nešalinama bandomoji cheminė medžiaga; tada prasideda pradinis šių bakterijų augimas. Laikoma, kad šis etapas yra pasibaigęs, o skaidymo etapas yra prasidėjęs, jeigu pašalinta maždaug 10 % pradinio bandomosios cheminės medžiagos kiekio (pasibaigus adsorbcijai, jeigu ji vyksta). Vėlavimo tarpsnis dažnai būna labai kintantis, todėl jį sunkiai sekasi atkurti.

Kreivės plokščiosios dalies tarpsnis

49. Atliekant nepertraukiamą bandymą šalinimo kreivės plokščiosios dalies tarpsnis apibrėžiamas kaip didžiausio skaidymo etapas. Kreivės plokščiosios dalies tarpsnis neturėtų būti trumpesnis negu 3 savaitės ir per jį turi būti išmatuota apie 15 galiojančių verčių.

Vidutinis bandomosios cheminės medžiagos šalinimo laipsnis

50. Vidutinė vertė apskaičiuojama naudojant kreivės plokščiosios dalies tarpsnio bandomosios cheminės medžiagos šalinimo vertes (D_t) (ir D_{st}, jeigu turima). Suapvalinus iki artimiausio sveikojo skaičiaus (1 %) nustatomas bandomosios cheminės medžiagos šalinimo laipsnis. Taip pat rekomenduojama apskaičiuoti vidutinės vertės 95 % pasikliovimo intervalą. Panašiai apskaičiuojamas organinės terpės kontroliniame inde vidutinis šalinimo laipsnis (D_B).

▼M4

Biologinio skaidymo požymiai

51. Jeigu biologinė plėvelė neadsorbuoja didesnio bandomosios cheminės medžiagos kiekio ir šalinimo kreivė yra būdinga biologinio skaidymo kreivė su vėlinimu, skaidymo etapą ir kreivės plokščiosios dalies tarpsnį (48, 49 pastraipos), išmatuotą šalinimą galima patikimai laikyti biologiniu skaidymu. Jeigu iš pradžių šalinamas didelis kiekis, modeliavimo bandymas neturi skirtis biologinio ir abiotinio šalinimo procesų atžvilgiais. Šiais atvejais ir kitais atvejais, jeigu kyla kokių nors dvejonių dėl biologinio skaidymo (pvz., jeigu vyksta išpūtimas), analizuojama plėvelės ėminiuose adsorbuota bandomoji cheminė medžiaga ar remiantis biologinius procesus aiškiai apibūdinančiais parametrais atliekami papildomi statiniai (atrankos) biologinio skaidymo bandymai. Šie bandymai – tai deguonies suvartojimo metodai (šio priedo D, E ir F C.4 skyrius) arba CO_2 matavimo bandymas (šio priedo V.4–C skyrius arba viršutinės erdvės tyrimas) (10); kaip sėjimo kultūra naudojama iš atitinkamo reaktoriaus paimta iš anksto apdorota biologinė plėvelė.

52. Jeigu išmatuojamas pašalintas DOC kiekis ir pašalintas konkrečios cheminės medžiagos kiekis ir jeigu nustatomas didelis pašalinimo procentinių dalių skirtumas (pirmoji dalis mažesnė negu pastaroji), šiuo atveju galima daryti prielaidą, kad ištakiuose yra tarpinių organinių produktų, kurie kur kas sunkiau skaidomi; šie dalykai turi būti ištirti.

Bandymų rezultatų validumas

53. Bandymas laikomas validuotu, jeigu DOC (arba COD) šalinimo laipsnis (D_B) kontroliniuose įrenginiuose yra > 80 % po dviejų savaičių, jeigu ir nebuvo pastebėta jokių neįprastų ypatybių.

54. Jeigu bandoma lengvai biologiškai skaidoma (etaloninė) cheminė medžiaga, biologinio skaidymo laipsnis turėtų būti > 90 % ir bet kokių dviejų verčių skirtumas neturėtų būti didesnis negu 5 %. Jeigu šių dviejų kriterijų nėra laikomasi, šiuo atveju persvarstytinos bandymo procedūros ir (arba) naudotinos kito šaltinio buitinės nuotekos.

55. Be to, dviejų įrenginių (jeigu naudojami) biologinio skaidymo vertės apdorojant bandomąją cheminę medžiagą neturėtų skirtis daugiau negu 5 %. Jeigu šio kriterijaus vertės neatitinka nustatytųjų, tačiau šalinimo laipsnis yra didelis, analizė atliekama dar tris savaites. Jeigu šalinimo laipsnis yra mažas, tiriamas bandomosios cheminės medžiagos slopinamasis poveikis, jeigu jis nėra žinomas, ir bandymas kartojamas naudojant mažesnę bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją, kai šitą įmanoma padaryti.

Bandymo ataskaita

56. Į bandymo ataskaitą turi būti įtraukiama:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— tapatybės nustatymo duomenys,

— fizinis pobūdis ir, jeigu reikia, fizinės bei cheminės savybės.

Bandymo sąlygos:

— bet kokie bandymo sistemos keitimai, ypač tuo atveju, jeigu bandymai atliekami su netirpiomis arba lakiomis medžiagomis,

— organinės terpės tipas,

— pramoninių nuotekų dalis nuotekose ir jų pobūdis, jeigu naudojamos ir žinoma,

— sėjimo kultūros įdėjimas,

▼M4

— pradinis bandomosios cheminės medžiagos tirpalas – DOC (ištirpusios organinės anglies) ir TOC (bendrosios organinės anglies) kiekis; kaip paruošta, jeigu suspensija; naudota (-os) bandymo koncentracija (-os), priežastys, jeigu nesilaikoma intervalo 10–20 mg/l DOC; pridėjimo metodas; pirmo įdėjimo data; bet kokie koncentracijos pokyčiai,

— vidutinė hidraulinė išbuvimo trukmė (be augimo); vamzdžio sūkių dažnis; apytikslis pokrypio kampas, jeigu jį įmanoma nustatyti,

— plėvelės šalinimo informacija; trukmė ir intensyvumas,

— bandymo temperatūra ir intervalas,

— naudoti analizės metodai.

Bandymo rezultatai:

— visi išmatuoti duomenys (DOC, COD, speciali analizė, pH, temperatūra, N cheminės medžiagos, jeigu reikia,

— visos apskaičiuotosios D_t (arba D_{tc}), D_B, D_s vertės, pateiktos lentelėje ir šalinimo kreivės,

— informacija apie vėlinimo ir kreivės plokščiosios dalies tarpsnius, bandymo trukmę, bandomosios cheminės medžiagos, etaloninės cheminės medžiagos (jeigu buvo bandyta) organinės terpės (kontrolinio įrenginio) šalinimo laipsnį bei statistinė informacija ir pareiškimai apie biologinį skaidymą bei bandymo validumas,

— rezultatų aptarimas.

LITERATŪRA

1. Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat. Res. 14: 753–758.

2. Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material.Wat. Waste Tr. J. 7: 441–444.

3. Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214–220.

4. Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355–1357.

5. Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92–94.

6. Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865–881.

7. Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

8. Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

9. Šio priedo C.4 skyrius. Lengvo biologinio skaidumo nustatymas AF.

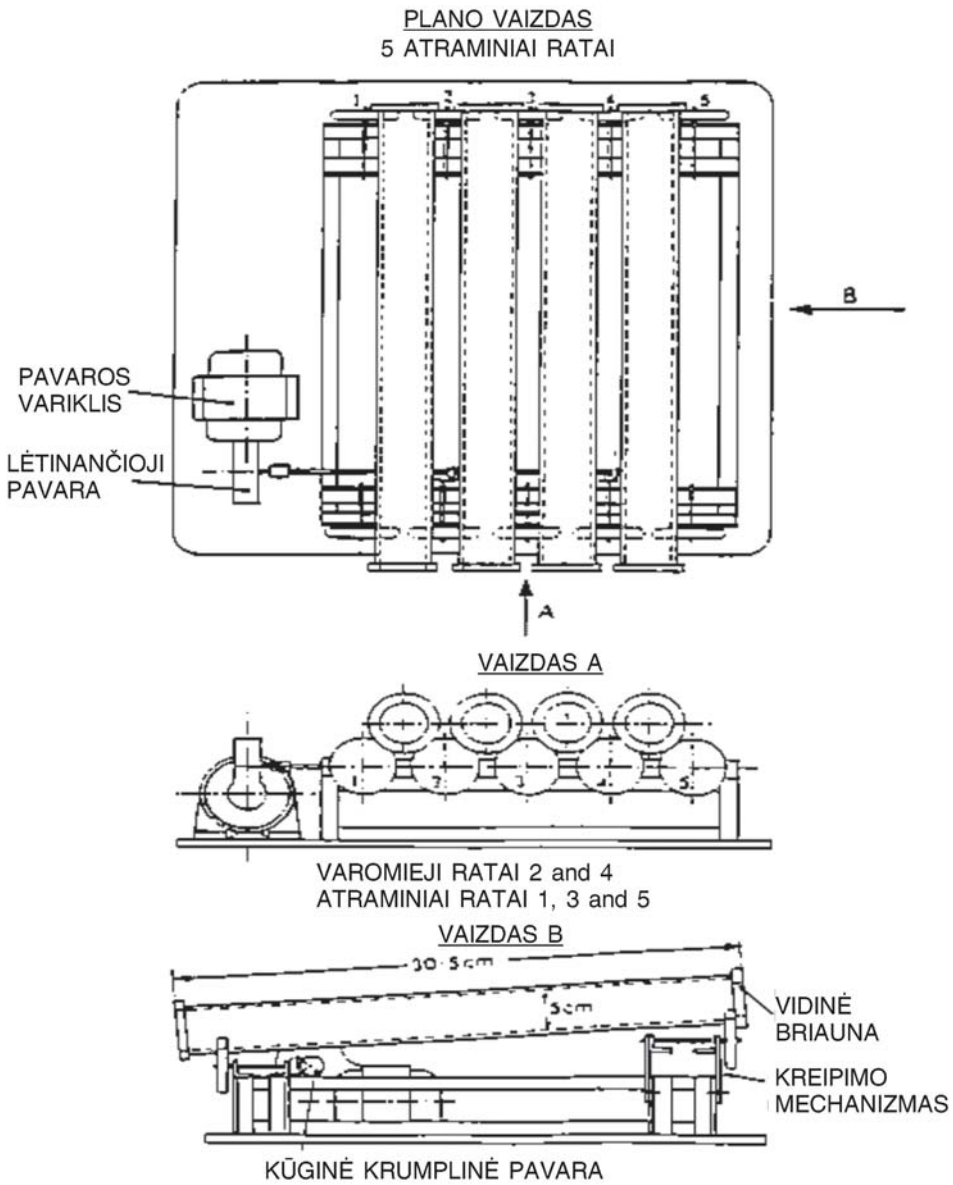
10. ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

▼M4

8 priedėlis

1 paveikslas

Sukamieji vamzdžiai



Žodynėlis

plano vaizdas

A-B vaizdas

varomieji ratai

atraminiai ratai

pavaros variklis

lėtinančioji pavara

vidinė briauna

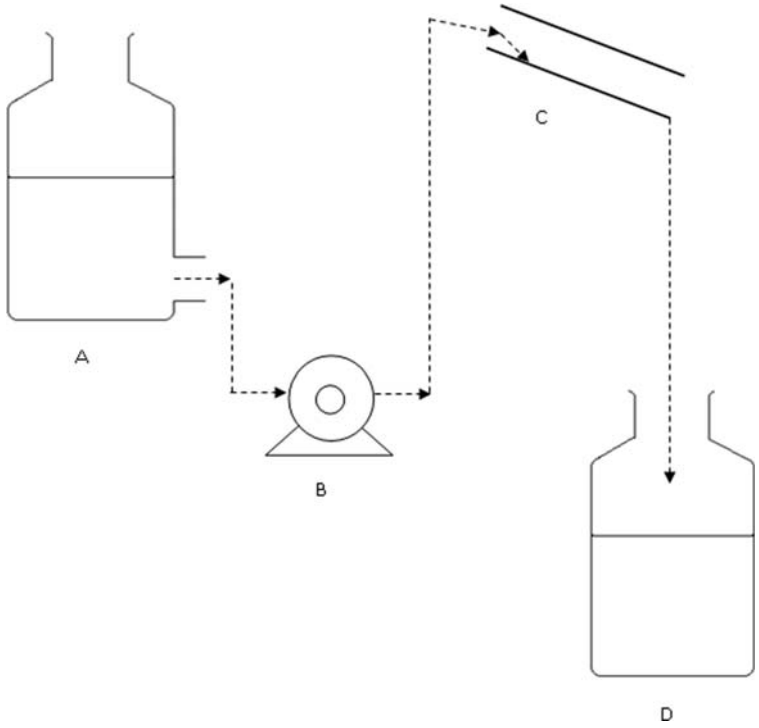
kreipimo mechanizmas

kūginė krumplinė pavara

▼M4

2 paveikslas

Srauto diagrama



A: Tiekimo talpykla

B: Peristaltinis siurblys

C: Sukamasis vamzdis

D: Ištakio rinkimo indas

SĄVOKŲ APIBRĖŽTYS:

Bandomoji cheminė medžiaga – bet kokia naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga ar mišinys.

Cheminės medžiagos – „pabrėžtina, kad terminas „cheminė medžiaga“ UNCED sutartyse ir kituose dokumentuose vartojamas platesne reikšme ir apima chemines medžiagas, produktus, preparatus ar bet kokius kitus terminus, kurie gali būti vartojami esamose sistemose siekiant nurodyti aprėptį“.

▼M6

C.11. AKTYVIOJO DUMBLO KVĖPAVIMO SLOPINIMO BANDYMAS (ANGLIES IR AMONIO OKSIDACIJA)

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 209 (2010). Jis skirtas cheminės medžiagos poveikiui aktyviojo dumblo mikroorganizmams (daugiausia bakterijoms) nustatyti matuojant jų kvėpavimo intensyvumą (anglies ir (arba) amonio oksidaciją) nustatytomis konkrečiomis sąlygomis, esant įvairioms bandomosios cheminės medžiagos koncentracijoms. Šis bandymo metodas pagrįstas ETAD (dažiklių gamybos pramonės ekologijos ir toksikologijos asociacijos) bandymais (1), (2), ankstesnėmis EBPO bandymo gairėmis Nr. 209 (3) ir pakeistu ISO 8192 standartu (4). Šio bandymo tikslas – taikant greitąjį atrankos metodą, vertinti cheminių medžiagų poveikį nuotekų valymo įrenginių biologinio (aerobinio) valymo etape naudojamo aktyviojo dumblo mikroorganizmams. Šio bandymo rezultatais taip pat galima remtis nustatant neslopinančias bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijas, tinkamas naudoti atliekant biologinio skaidumo tyrimus (pvz., šio priedo C.4 A–F, C.9, C.10, C12 ir C.29 skyriai, EBPO TG302C). Tokiu atveju šį bandymą galima atlikti kaip atrankos bandymą, panašų į intervalo arba ribų nustatymo bandymą (žr. 39 skirsnį), vertinant tik bendrąjį kvėpavimą. Tačiau šia informacija reikėtų atsargiai remtis atliekant lengvo biologinio skaidumo bandymus (šio priedo C.4 A–F ir C.29 skyriai), per kuriuos pasėlio koncentracija yra kur kas mažesnė nei pagal šį bandymo metodą. Iš tiesų, nors per šį kvėpavimo slopinimo bandymą gali būti nustatyta, kad jokio slopinimo nėra, tai dar nereiškia, kad būtų pripažintos neslopinančios sąlygos atliekant lengvo biologinio skaidumo bandymą pagal šio priedo C.4 A–F arba C.29 skyrių.

2. Apskritai atrodo, jog nuo tada, kai pirmą kartą paskelbta apie kvėpavimo slopinimo bandymą, jis atliekamas sėkmingai, tačiau kartais pranešama apie gautus klaidingus rezultatus, pvz., (2), (4), (5). Kartais gaunamos dvifazės kvėpavimo pagal koncentraciją kreivės, iškraipyti dozės ir atsako santykio grafikai ar netikėtai mažos EC_{50} vertės (5). Ištyrus nustatyta, jog tokie rezultatai gaunami tada, kai bandymo aktyviajam dumblui yra būdinga stipri nitrifikacija ir bandomoji cheminė medžiaga amonio oksidaciją veikia labiau negu bendrąją heterotrofinę oksidaciją. Todėl tokių klaidingų rezultatų galima išvengti atliekant papildomus bandymus naudojant specialų nitrifikacijos inhibitorių. Išmatuojant deguonies sugerties greitį esant tokiam inhibitoriui, pvz., N-aliltiokarbamidui (ATU), ir be jo, galima atskirai apskaičiuoti bendros, heterotrofinės ir dėl nitrifikacijos vykstančios deguonies sugerties lygius (4), (7), (8). Taip galima nustatyti bandomosios cheminės medžiagos slopinamąjį poveikį abiem procesams ir tiek organinės (heterotrofinės) anglies oksidacijos, tiek amonio oksidacijos (nitrifikacijos) EC_{50} vertes apskaičiuoti įprastu būdu. Pažymėtina, jog kai kuriais retais atvejais N-aliltiokarbamido slopinamasis poveikis gali iš dalies arba visiškai išnykti dėl kompleksodaros su bandomosiomis cheminėmis medžiagomis arba terpės priedais, pvz., Cu^{++} jonais (6). Cu^{++} jonai yra būtini *Nitrosomonas*, tačiau didesnėmis koncentracijomis toksiški.

3. Užtikrinti nitrifikaciją atliekant aerobinį nuotekų valymą kaip būtiną azoto junginių šalinimo iš nuotekų, denitrifikuojant dujinius darinius, proceso etapą yra itin svarbus uždavinys, ypač Europos šalyse; ES neseniai nustatė žemesnes azoto koncentracijos išvalytose nuotekose, išleidžiamose į nuotekų priimtumą, ribines vertes ([1]).

([1]) 1991 m. gegužės 21 d. Tarybos direktyva 91/271/EEB dėl miesto nuotekų valymo (OL L 135, 1991 5 30, p. 40).

▼M6

4. Daugeliu atvejų pakanka taikyti tokį metodą, pagal kurį būtų įvertintas poveikis organinės anglies oksidacijos procesams. Tačiau kai kuriais atvejais, siekiant išaiškinti gautus rezultatus ir suprasti šį poveikį, reikia ištirti poveikį vien nitrifikacijai arba atskirai ištirti poveikį nitrifikacijai ir poveikį organinei anglies oksidacijai.

BANDYMO METODO ESMĖ

5. Sintetinėmis nuotekomis maitinamo aktyviojo dumblo ėminių kvėpavimo intensyvumas matuojamas uždaroje kameroje su deguonies elektrodu po 3 val. sąlyčio su bandomąja medžiaga. Atsižvelgiant į tikėtiną poveikio scenarijų, sąlytis galėtų trukti ir ilgiau. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga yra greitai suskaidoma, pvz., abiotiškai hidrolizės būdu, arba yra laki ir pastovios jos koncentracijos palaikyti neįmanoma, papildomai galima nustatyti trumpesnį, pvz., 30 min., poveikio laikotarpį. Poveikio dieną turėtų būti patikrintas kiekvienos partijos aktyviojo dumblo jautris naudojant tinkamą etaloninę cheminę medžiagą. Per šį bandymą paprastai nustatoma bandomosios cheminės medžiagos EC_x (pvz., EC_{50}) ir (arba) nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC).

6. Organinę anglį oksiduojančių mikroorganizmų deguonies suvartojimo slopinimas gali būti išreiškiamas atskirai nuo amonį oksiduojančių mikroorganizmų, išmatuojant deguonies suvartojimo spartą su N-aliltiokarbamidu ir be jo (tai specialus inhibitorius, stabdantis pirmosios pakopos nitrobakterijų amonio oksidavimą į nitritą). Šiuo atveju deguonies sugerties greičio procentinis slopinimas apskaičiuojamas palyginant deguonies sugerties greitį veikiant bandomajai cheminei medžiagai su atitinkamų kontrolinių bandinių be bandomosios cheminės medžiagos vidutiniu deguonies sugerties greičiu, tiek naudojant specialųjį inhibitorių N-aliltiokarbamidą, tiek be jo.

7. Bet kokią deguonies sugertį per abiotinius procesus galima nustatyti išmatuojant sugerties greitį bandomosios cheminės medžiagos, sintetinių nuotekų terpės ir vandens mišiniuose be aktyviojo dumblo.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

8. Kad būtų įmanoma teisingai aiškinti bandymo rezultatus, reikėtų žinoti bandomosios cheminės medžiagos tapatybę (geriausia CAS numerį), pavadinimą (IUPAC), grynumą, tirpumą vandenyje, garų slėgį, lakumą ir įgerties (adsorbcijos) savybes. Lakiųjų cheminių medžiagų bandymų paprastai neįmanoma tinkamai atlikti be specialių atsargumo priemonių (žr. 21 skirsnį).

BANDYMO METODO TAIKOMUMAS

9. Šį bandymo metodą galima taikyti vandenyje tirpioms, mažai tirpioms ir lakioms cheminėms medžiagoms. Tačiau gali būti ne visada įmanoma gauti riboto tirpumo cheminių medžiagų EC_{50} vertes, o atliekant lakiųjų cheminių medžiagų bandymus, patikimus rezultatus įmanoma gauti tik tada, kai didžioji bandomosios cheminės medžiagos dalis (pvz., > 80 %) lieka reakcijos mišinyje iki veikimo laikotarpio (-ių) pabaigos. Reikėtų pateikti papildomų patvirtinamųjų analitinių duomenų, siekiant patikslinti EC_x koncentraciją tais atvejais, kai esama neaiškumų dėl bandomosios cheminės medžiagos stabilumo arba lakumo.

▼M6

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

10. Siekiant įsitikinti bandymo metodo ir bandymo sąlygų patikimumu, reikėtų reguliariai atlikti bandymus su etaloninėmis cheminėmis medžiagomis, o poveikio dieną patikrinti kiekvienos mikroorganizmų pasėlio partijos aktyviojo dumblo jautrį. Kaip etaloninę slopinamąjį poveikį turinčią cheminę medžiagą rekomenduojama naudoti 3,5-dichlorfenolį (3,5-DCP) – tai žinomas kvėpavimo inhibitorius, naudojamas atliekant daugelį įvairaus pobūdžio slopinamojo ir (arba) toksinio poveikio bandymų (4). Matuojant bendrojo kvėpavimo slopinimą, kaip etaloninę cheminę medžiagą taip pat galima naudoti vario (II) sulfato pentahidratą (9). Kaip specialų etaloninį nitrifikacijos inhibitorių galima naudoti N-metilaniliną (4).

TINKAMUMO KRITERIJAI IR ATKURIAMUMAS

11. Tuščių (be bandomosios ar etaloninės cheminės medžiagos) kontrolinių bandinių deguonies sugerties greitis turėtų būti ne mažiau kaip 20 mg deguonies vienam gramui aktyviojo dumblo (sausosios suspenduotų kietųjų medžiagų masės) per valandą. Jei greitis yra mažesnis, bandymą reikėtų pakartoti naudojant išplautą aktyvųjį dumblą arba iš kito šaltinio gautą dumblą. Kartotinių kontrolinių bandinių deguonies sugerties greičio variacijos koeficientas nustatomojo bandymo pabaigoje neturėtų būti didesnis kaip 30 %.

12. 2004 m. atlikus ISO organizuotą tarptautinį tarplaboratorinį bandymą (4), per kurį naudotas buitinių nuotekų aktyvusis dumblas, nustatytos 3,5-DCP EC_{50} vertės matuojant bendrąjį kvėpavimą buvo nuo 2 iki 25 mg/l, matuojant heterotrofinį kvėpavimą – nuo 5 iki 40 mg/l, matuojant nitrifikacinį kvėpavimą – nuo 0,1 iki 10 mg/l. Jeigu nustatyta 3,5-DCP EC_{50} vertė nepatenka į tikėtiną intervalą, bandymą reikėtų pakartoti naudojant iš kito šaltinio gautą aktyvųjį dumblą. Vario (II) sulfato pentahidrato EC_{50} vertė, matuojant bendrąjį kvėpavimą, turėtų būti 53–155 mg/l (9).

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Bandymo indai ir aparatūra

13. Turėtų būti naudojama įprasta laboratorinė įranga ir šie reikmenys:

a) bandymo indai – pvz., 1 000 ml tūrio cheminės stiklinės, kuriose laikoma 500 ml reakcijos mišinio (žr. 1 pav. – 5);

b) ištirpusio deguonies koncentracijos matavimo kamera ir priedai; tinkamas deguonies elektrodas; uždara talpa ėminiui laikyti be viršerdvės, su savirašiu (pvz., 2 priedėlio 1 pav. – 7, 8, 9); vietoj jos galima naudoti biocheminiam deguonies suvartojimui (BDS) matuoti skirtą butelį su pritaikyta mova deguonies elektrodui prie butelio kaklelio pritvirtinti (žr. 3 priedėlio 2 pav.). Kad įstatant deguonies elektrodą nebūtų išstumta ir prarasta butelyje esančio skysčio, patartina visų pirma per movą įstatyti piltuvėlį ar stiklinį vamzdelį arba naudoti indus išlenktais kraštais. Abiem atvejais reikėtų naudoti magnetinį maišiklį arba kitą maišymo priemonę, pvz., savimaišį zondą;

c) inertine medžiaga padengti magnetiniai maišikliai ir kartotuvai, skirti naudoti matavimo kameroje ir (arba) bandymo induose;

d) aeratorius. Jeigu reikia, suslėgtas oras turėtų būti leidžiamas per tinkamą filtrą, iš jo pašalinant dulkes ir riebalus, ir per plovykles su vandeniu orui drėkinti. Indų turinys turėtų būti aeruojamas naudojant Pastero pipetes

▼M6

arba kitus cheminių medžiagų nesugeriančius aeratorius. Sukamoji purtyklė, kurios sukimosi greitis būtų 150–250 sūkių/min., gali būti naudojama, pvz., 2 000 ml talpos kolboms, siekiant tiekti dumblui reikalingą deguonį ir išspręsti problemas, kylančias, kai cheminės medžiagos pernelyg gausiai putoja, yra lakios ir todėl prarandamos arba sunkiai išsklaidomos barbotuojant. Bandymo sistema paprastai susideda iš nuolat aeruojamų ir tam tikra seka (pvz., 10–15 min. intervalais) paruoštų cheminių stiklinių, kurių turinys atitinkama eilės tvarka analizuojamas. Taip pat galima naudoti patvirtintus instrumentus mišiniams aeruoti ir kartu deguonies vartojimo greičiui matuoti juose;

e) pH-metras;

f) centrifuga – įprasta dumblui tinkama stalinė centrifuga, kurios sparta siekia 10 000 m/s^2.

Cheminiai reagentai

14. Per visą bandymą turėtų būti naudojami analiziškai gryni cheminiai reagentai.

Vanduo

15. Turėtų būti naudojamas distiliuotas arba dejonizuotas vanduo, kuriame būtų mažiau nei 1 mg/l ištirpusios organinės anglies, nebent konkrečiai tiktų naudoti vandentiekio vandenį be chloro.

Sintetinių nuotekų mitybinė terpė

16. Terpė ruošiama iš toliau nurodytų sudedamųjų dalių, kurių kiekiai turėtų būti tokie:

— peptono	16 g
— mėsos ekstrakto (arba panašaus augalinio ekstrakto)	11 g
— karbamido	3 g
— natrio chlorido (NaCl)	0,7 g
— kalcio chlorido dihidrato ($CaCl_2$, $2H_2O$)	0,4 g
— magnio sulfato heptahidrato ($MgSO_4$, $7H_2O$)	0,2 g
— bevandenio kalio monohidrofosfato (K_2HPO_4)	2,8 g
— distiliuoto arba dejonizuoto vandens iki 1 litro tūrio.	

17. Šio tirpalo pH turėtų būti 7,5 ± 0,5. Jeigu paruošta terpė naudojama ne iš karto, ją reikėtų laikyti tamsoje 0–4 °C temperatūroje ne ilgiau kaip savaitę arba tokiomis sąlygomis, kad nepakistų jos sudėtis. Įsidėmėtina, jog šios sintetinių nuotekų terpės koncentracija yra 100 kartų didesnė negu terpės, aprašytos EBPO techninėje ataskaitoje „Proposed metod for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents“ (Siūlomas metodas paviršinio aktyvumo medžiagų, naudojamų sintetiniuose plovikliuose, biologiniam skaidumui nustatyti) (1976 m. birželio 11 d.), be to, į šią terpę dedama dikalio vandenilio fosfato.

▼M6

18. Kitu atveju, ruošiant terpę laikymui, galima atskirai sterilizuoti jos sudedamąsias dalis arba peptonas ir mėsos ekstraktas gali būti dedami prieš pat bandymą. Prieš naudojant terpę reikėtų gerai sumaišyti ir, jei reikia, jos pH vertę patikslinti iki 7,5 ± 0,5.

Bandomoji cheminė medžiaga

19. Lengvai vandenyje tirpstančioms bandomosioms medžiagoms reikėtų paruošti tiek pradinio tirpalo, kad nebūtų viršyta jų tirpumo vandenyje riba (neturi susidaryti nuosėdų). Vandenyje mažai tirpios medžiagos, mišiniai, kurių įvairios sudedamosios dalys yra nevienodai tirpios vandenyje, ir lengvai įsigeriančios (adsorbuojamos) medžiagos turėtų būti dedamos tiesiai į bandymo indus ir juose pasveriamos. Tokiais atvejais galima naudoti pradinius tirpalus, jeigu ištirpusių bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijų analiziniai nustatymai atliekami bandymo induose (prieš įdedant aktyvųjį dumblą). Ištirpusių bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijų analizinis nustatymas taip pat turi būti atliekamas bandymo induose tuo atveju, jeigu ruošiamos vandenyje ištirpusios dalys (angl. *water accommodated fractions*, WAF). Nereikėtų naudoti organinių tirpiklių, dispergentų ar emulsiklių tirpumui padidinti. Pradinius tirpalus ir dar nesumaišytas suspensijas apdoroti ultragarsu, pvz., per naktį, galima tada, kai pakanka informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos stabilumą tokiomis sąlygomis.

20. Bandomoji cheminė medžiaga gali neigiamai paveikti bandymo sistemos pH. Mišinių su bandomąja chemine medžiaga pH vertes reikėtų išmatuoti dar iki bandymo pradžios, per išankstinį bandymą, siekiant nustatyti, ar reikės patikslinti pH prieš pagrindinį bandymą ir dar kartą pagrindinio bandymo dieną. Bandomosios cheminės medžiagos vandeniniai tirpalai arba suspensijos, kai reikia, turėtų būti neutralizuojami prieš įdedant pasėlį. Tačiau kadangi neutralizuojant gali pakisti cheminės medžiagos savybės, priklausomai nuo tyrimo tikslų, galima papildomais bandymais įvertinti bandomosios cheminės medžiagos poveikį dumblui netikslinant pH vertės.

21. Lakiųjų cheminių medžiagų toksinis poveikis, ypač kai atliekant bandymą sistemoje barbotuojamas oras, gali būti nevienodai didelis dėl tokios medžiagos kiekio mažėjimo jos veikimo laikotarpiu. Atliekant šių medžiagų bandymus reikėtų imtis atsargumo priemonių – atskirai išanalizuoti kontrolinius mišinius su tokia medžiaga ir atitinkamai pakeisti aeravimo normą.

Etaloninė cheminė medžiaga

22. Kaip etaloninę cheminę medžiagą naudojant 3,5-dichlorfenolį, reikėtų paruošti tirpalą iš 1,00 g 3,5-dichlorfenolio ir 1 000 ml vandens (15). Kad ši medžiaga greičiau ištirptų, reikėtų naudoti šiltą vandenį ir (arba) apdoroti tirpalą ultragarsu, o kai tirpalas atauš iki kambario temperatūros, papildyti jį iki reikiamo tūrio. Tačiau reikėtų užtikrinti, kad nepakistų etaloninės medžiagos struktūra. Tirpalo pH vertę reikėtų patikrinti ir, jei reikia, patikslinti naudojant NaOH arba H_2SO_4, kad pH būtų 7–8.

23. Jeigu kaip etaloninė cheminė medžiaga naudojamas vario (II) sulfato pentahidratas, jo koncentracijos turi būti 58 mg/l, 100 mg/l ir 180 mg/l (besiskiriančios 1,8 karto). Ši medžiaga dedama tiesiai į bandymo indus ir juose pasveriama (kai bendras bandymo tirpalo tūris yra 500 ml, imama 29, 50 arba 90 mg medžiagos), tada ištirpinama 234 ml autoklave apdoroto vandentiekio vandens. Vario (II) sulfato pentahidratas yra lengvai tirpstanti medžiaga. Pradedant bandymą į tirpalą įdedama 16 ml sintetinių nuotekų ir 250 ml aktyviojo dumblo.

▼M6

Specialus nitrifikacijos inhibitorius

24. Reikėtų paruošti 2,32 g/l N-aliltiokarbamido (ATU) pradinį tirpalą. Įpylus 2,5 ml šio pradinio tirpalo į inkubuojamą 500 ml bendro tūrio mišinį, gaunama galutinė 11,6 mg ATU/l (10^{-4} mol/l) koncentracija, kurios, kaip žinoma, pakanka (4) nitrifikacijai visiškai (100 %) sustabdyti nitrifikuojančiame aktyviajame dumble, kuriame yra 1,5 g/l suspenduotų kietųjų medžiagų.

Abiotinė kontrolė

25. Tam tikromis retomis sąlygomis, kai bandomoji cheminė medžiaga turi stipriai redukuojančių savybių, matuojant gali būti nustatyta nemaža abiotinė deguonies sugertis. Tokiais atvejais, siekiant skirti bandomosios cheminės medžiagos abiotinę deguonies sugertį nuo mikroorganizmų kvėpavimo, būtina abiotinė kontrolė. Abiotinius kontrolinius bandinius galima paruošti į bandymo mišinius nededant pasėlio. Abiotinius kontrolinius bandinius be pasėlio taip pat galima naudoti atliekant patvirtinamuosius analizinius matavimus, siekiant nustatyti per bandomosios medžiagos veikimo etapą pasiektą koncentracijos lygį, pvz., naudojant vandenyje mažai tirpių cheminių medžiagų pradinius tirpalus, kurių sudedamosios dalys nevienodai tirpios vandenyje. Konkrečiais atvejais gali reikėti paruošti abiotinį kontrolinį bandinį naudojant sterilizuotą (pvz., apdorojus autoklave arba pridėjus sterilizuojančių toksinių medžiagų) pasėlį. Kai kurios cheminės medžiagos gali išskirti arba sugerti deguonį tuo atveju, jeigu jų paviršiaus plotas yra pakankamai didelis tokiai reakcijai vykti, net jeigu tai reakcijai įprastai reikėtų kur kas aukštesnės temperatūros ar slėgio. Todėl daugiau dėmesio reikėtų skirti peroksi- grupės medžiagoms. Sterilizuotas pasėlis užima didelį paviršiaus plotą.

Pasėlis

26. Aktyvusis dumblas bendroms reikmėms turėtų būti imamas iš tinkamai veikiančio nuotekų valymo įrenginio, į kurį patenka daugiausia buitinės nuotekos, aeracijos rezervuaro išleidimo angos arba arti jos. Atsižvelgiant į bandymo tikslą, gali būti naudojamas ir kitų tinkamų rūšių arba iš kitų šaltinių gautas, pvz., laboratorijoje išaugintas aktyvusis dumblas. Tinkama suspenduotų dumblo kietųjų medžiagų koncentracija yra 2–4 g/l. Tačiau iš kelių valymo įrenginių surinktas dumblas veikiausiai turėtų skirtingų savybių, skirtųsi jo jautris įvairiam poveikiui.

27. Dumblą galima naudoti tokį, koks jis surinktas, tačiau reikėtų pašalinti stambias daleles paliekant dumblą trumpam (pvz., 5–15 min.) nusistovėti ir tada viršutinį smulkesnių kietųjų dalelių sluoksnį nupilant arba nukošiant (pvz., per 1 mm^2 dydžio akučių sietą). Vietoj to dumblą galima sumaišyti iki vienalytės masės, įjungus maišytuvą maždaug 15 sekundžių ar ilgiau, tačiau reikia stengtis, kad nebūtų per didelių šlyties jėgų ir temperatūros pokyčių ilgai maišant maišytuvu.

28. Dažnai reikia išplauti dumblą, pvz., jeigu jam būdingo kvėpavimo intensyvumas yra mažas. Pirmiausia reikėtų dumblą kurį laiką centrifuguoti, pvz., 10 min. apie 10 000 m/s^2 greičiu, kad susidarytų skaidrus paviršinis skystis ir nuotekų kietųjų medžiagų gumulas. Susidariusį paviršinį skystį reikėtų pašalinti, tada dumblą dar kartą suspenduoti vandentiekio vandenyje be chloro, sukratyti ir pašalinti plovimo vandenį dar kartą centrifuguojant bei nupilant. Jeigu reikia, plovimo ir centrifugavimo procesas kartojamas. Žinant resuspenduoto dumblo tūrį, turėtų būti nustatyta jo sausosios medžiagos masė ir dumblo koncentracija padidinta pašalinant dalį skysčio arba dumblas dar labiau atskiestas vandentiekio vandeniu be chloro, kad būtų gauta reikiama dumblo kietųjų medžiagų koncentracija – 3 g/l. Aktyvusis dumblas turėtų būti nuolat aeruojamas (pvz., 2 l/min. sparta) esant bandymo temperatūrai, ir, jeigu įmanoma, naudojamas tą pačią dieną, kurią surinktas. Jei tai

▼M6

neįmanoma, dumblą reikėtų kasdien maitinti sintetinių nuotekų mitybine terpe (į 1 l aktyviojo dumblo dedama 50 ml sintetinių nuotekų mitybinės terpės) ir jį laikyti galima ne ilgiau kaip dar dvi dienas. Tada dumblas naudojamas bandymui ir, jeigu jo aktyvumas (vertinant pagal jam būdingo heterotrofinio ir nitrifikacinio kvėpavimo intensyvumą) reikšmingai nepakito, bandymo rezultatai pripažįstami tinkamais.

29. Gali kilti sunkumų tuo atveju, jeigu inkubuojamas dumblas užputoja tiek, kad putos ir į jas patekusios kietosios dumblo dalelės išsiveržia iš aeracijos rezervuarų. Kai kada putojimą gali sukelti vien sintetinės nuotekos, tačiau putojimo taip pat reikėtų tikėtis tada, kai bandomoji cheminė medžiaga yra paviršinio aktyvumo medžiaga arba jos sudėtyje yra paviršinio aktyvumo medžiagų. Iš bandymo mišinių pašalinus dalį kietųjų dumblo medžiagų, dirbtinai sumažinamas dumblo kvėpavimo intensyvumas ir tai gali būti klaidingai palaikyta slopinamojo poveikio rezultatu. Be to, aeruojant paviršinio aktyvumo medžiagos tirpalą, ta medžiaga kaupiasi putų sluoksnyje, todėl efektyvioji jos koncentracija sumažėja pašalinus putas iš bandymo sistemos. Putojimą galima kontroliuoti paprastais mechaniniais būdais (pvz., kartais rankomis pamaišant stikline lazdele) arba įdedant silikoninės emulsijos priešpučio, kurio sudėtyje nėra paviršinio aktyvumo medžiagų, ir (arba) taikant kratomos kolbos aeravimo metodą. Jeigu putojimo problema kyla dėl naudojamų sintetinių nuotekų, reikėtų pakeisti nuotekų sudėtį pridedant priešpučio reagento, pvz., 50 µl/l. Jeigu putojimą sukelia pati bandomoji cheminė medžiaga, putojimui sustabdyti reikalingą priešpučio kiekį reikėtų nustatyti didžiausiai bandomosios medžiagos koncentracijai ir tada visus atskirus aeracijos rezervuarus (įskaitant tuos, kuriuose nesusidaro putų, pvz., tuščių kontrolinių ir etaloninių bandinių indus) apdoroti vienodai. Jeigu naudojami priešpučiai, neturėtų būti sąveikos tarp jų ir pasėlio ir (arba) bandomosios cheminės medžiagos.

BANDYMO PROCEDŪRA

30. Galima nustatyti trijų skirtingų rūšių deguonies sugerties – bendrosios, tik heterotrofinės ir tik nitrifikacinės – slopinimą. Paprastai turėtų pakakti išmatuoti bendrąjį deguonies sugerties slopinimą. Poveikį heterotrofinei deguonies sugerčiai, vykstančiai dėl organinės anglies oksidacijos ir amonio oksidacijos, būtina nustatyti tada, kai konkrečiai reikia gauti šias dvi atskiras konkrečios cheminės medžiagos tyrimo vertinamąsias baigtis arba (nebūtinai) paaiškinti neįprastas dozės ir atsako santykio kreives, gautas išmatavus bendrosios deguonies sugerties slopinimą.

Bandymo sąlygos

31. Bandymas turėtų būti atliekamas 20 ± 2 °C temperatūroje.

Bandymo mišiniai

32. Bandymo mišiniai (F_T 1 lentelėje) iš vandens, sintetinių nuotekų mitybinės terpės ir bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti ruošiami taip, kad būtų gautos įvairios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vardinės vertės (mišinio sudedamųjų dalių kiekių pavyzdį žr. 1 lentelėje). Jeigu reikia, pH patikslinamas iki 7,5 ± 0,5; mišinius reikėtų atskiesti vandeniu ir įdėti pasėlio tiek, kad galutinis mišinio tūris būtų vienodas visuose induose. Tada indai pradedami aeruoti.

Etaloninės medžiagos mišiniai

33. Mišiniai (F_R) su etalonine chemine medžiaga, pvz., 3,5-dichlorfenoliu, vietoj bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti ruošiami taip pat, kaip ir bandomieji mišiniai.

▼M6

Tušti kontroliniai bandiniai

34. Tuščius kontrolinius bandinius (F_B) reikėtų paruošti bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžioje ir pabaigoje atliekant bandymus, kuriems bandymo indai ruošiami tam tikra seka nustatytais laiko intervalais. Kai naudojant bandymo įrangą deguonies suvartojimą galima matuoti vienu metu keliuose bandiniuose, bent po du tuščius kontrolinius bandinius reikėtų įtraukti į kiekvieną atskirą vienu metu analizuojamų bandinių grupę. Į tuščius kontrolinius bandinius dedama po vienodą aktyviojo dumblo ir sintetinės terpės kiekį, tačiau nededama bandomosios ar etaloninės cheminės medžiagos. Juos reikėtų atskiesti vandeniu iki bandomųjų ir etaloninių medžiagų mišinių tūrio.

Abiotinė kontrolė

35. Kai būtina, pavyzdžiui, žinant arba įtariant, kad bandomoji cheminė medžiaga turi stipriai redukuojančių savybių, reikėtų paruošti F_A mišinį abiotiniam deguonies suvartojimui matuoti. Bandomosios cheminės medžiagos ir sintetinių nuotekų mitybinės terpės kiekiai šiame mišinyje bei jo tūris turėtų būti tokie patys, kaip ir bandomųjų mišinių, tačiau į jį nededama aktyviojo dumblo.

Bendra darbo tvarka ir matavimai

36. Bandomųjų ir etaloninių medžiagų mišiniai, taip pat tušti ir abiotiniai kontroliniai bandiniai inkubuojami bandymo temperatūroje, dirbtinės aeracijos (0,5–1 l/min.) sąlygomis, siekiant palaikyti ištirpusio deguonies koncentraciją, viršijančią 60–70 % soties vertę, ir kad dumblo gumulėliai visą laiką būtų suspenduoti. Taip pat, kad dumblo gumulėliai būtų suspenduoti, paruoštas kultūras būtina maišyti. Inkubacinis periodas prasideda nuo tada, kai aktyviojo dumblo pasėlis iš pradžių sumaišomas su kitomis galutinio mišinio sudedamosiomis dalimis. Po inkubacinio periodo, praėjus nustatytam bandomosios medžiagos veikimo laikui (paprastai 3 valandoms), paimami ėminiai ir ištirpusio deguonies koncentracijos sumažėjimas išmatuojamas specialioje kameroje (3 priedėlio 2 pav.) arba visiškai pripildytame BOD butelyje. Inkubacinio periodo pradžios eiga taip pat priklauso nuo turimos įrangos gebos matuoti deguonies vartojimo greitį. Pavyzdžiui, jeigu turimas tik vienas deguonies zondas, matavimai atliekami atskirai. Šiuo atveju reikėtų paruošti įvairius bandymui reikalingus sintetinių nuotekų mišinius, tačiau į juos nedėti pasėlio ir reikiamas dumblo porcijas atskirai įdėti į kiekvieną tos serijos bandymo indą. Kiekvieno indo inkubacija turėtų būti pradedama paeiliui patogiais laiko intervalais, pvz., kas 10–15 min. Kitu atveju matavimo sistemoje gali būti keli zondai, todėl galima vienu metu atlikti kelis matavimus; šiuo atveju pasėlį galima vienu metu įdėti į atitinkamų grupių indus.

37. Visuose bandomųjų bei etaloninių medžiagų ir tuščiuose (tačiau ne abiotinės kontrolės) mišiniuose aktyviojo dumblo koncentracijos vardinė vertė yra 1,5 g suspenduotų kietųjų medžiagų viename mišinio litre. Deguonies suvartojimą reikėtų matuoti po 3 poveikio valandų. Kaip aprašyta 5 skirsnyje, kai tinka, reikėtų atlikti matavimus po papildomų 30 minučių poveikio.

Dumblo nitrifikacinė geba

38. Siekiant nustatyti, ar dumblas yra nitrifikuojantis, ir jei taip – nitrifikacijos proceso greitį, reikėtų paruošti tokius mišinius (F_B), kurie būtų kaip tušti kontroliniai ir papildomi „kontroliniai“ mišiniai (F_N), tačiau į juos papildomai dedama 11,6 mg/l N-aliltiokarbamido. Šie mišiniai turėtų būti aeruojami ir 3

▼M6

valandas inkubuojami 20 ± 2 °C temperatūroje, po to išmatuojamas deguonies sugerties greitis ir apskaičiuojamas deguonies sugerties dėl nitrifikacijos greitis.

Bandymų planai

Intervalo nustatymo bandymas

39. Kai reikia, atliekamas išankstinis bandymas, per kurį įvertinamas deguonies vartojimo slopinimo nustatomajam bandymui tinkamų bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų intervalas. Kitu atveju per išankstinį bandymą gali būti nustatyta, kad bandomoji cheminė medžiaga deguonies vartojimo neslopina, todėl nustatomojo bandymo atlikti nereikia, tačiau šiuo atveju matavimai turėtų būti atlikti trijuose didžiausios bandomosios koncentracijos (paprastai 1 000 mg/l, tačiau didžiausia koncentracija priklauso nuo to, kokius duomenis reikia gauti) kartotiniuose bandiniuose.

1 lentelė.

Išankstiniam bandymui naudojamų mišinių pavyzdžiai

Reagentas	Pradinė koncentracija				
Bandomosios cheminės medžiagos pradinis tirpalas	10 g/l				
Sintetinės terpės pradinis tirpalas	Žr. 16 skirsnį				
Aktyviojo dumblo pradinė suspensija	3 g/l suspenduotų kietųjų medžiagų				
Mišinių sudedamosios dalys	Į bandomuosius indus dedami kiekiai (žr. a pastabą) ([a])				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3-5}	F_{B1-2}	F_A
Bandomosios cheminės medžiagos pradinis tirpalas (ml) (19–21 skirsniai)	0,5	5	50	0	50
Sintetinių nuotekų mitybinės terpės pradinis tirpalas (ml) (16 skirsnis)	16	16	16	16	16
Aktyviojo dumblo suspensija (ml) (26–29 skirsniai)	250	250	250	250	0
Vanduo (15 skirsnis)	233,5	229	184	234	434
Bendras mišinių tūris (ml)	500	500	500	500	500
Mišinio sudedamųjų dalių koncentracijos					
Bandomosios cheminės medžiagos suspensija (mg/l)	10	100	1 000	0	1 000
Aktyvusis dumblas (suspenduotos kietosios medžiagos) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

([a]) Tą pačią procedūrą reikėtų atlikti naudojant etaloninę cheminę medžiagą, kolbose gaunant F_{R1-3} mišinį.

40. Atliekant bandymą reikėtų rinktis bent tris bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas, pvz., 10 mg/l, 100 mg/l ir 1 000 mg/l, kartu naudojant tuščią kontrolinį bandinį ir, jei reikia, bent tris abiotinius kontrolinius bandinius su didžiausiomis bandomosios cheminės medžiagos koncentracijomis (žr. pavyzdį 1 lentelėje). Geriausia parinkti tokią mažiausią koncentraciją, kuri neturėtų jokio poveikio deguonies vartojimui. Kai tinka, reikėtų apskaičiuoti deguonies sugerties greitį ir nitrifikacijos greitį, o tada

▼M6

apskaičiuoti šių procesų slopinimo lygį procentais. Atsižvelgiant į bandymo tikslą, taip pat galima paprasčiausiai nustatyti ribinės koncentracijos, pvz., 1 000 mg/l, toksiškumą. Jeigu, esant tokiai koncentracijai, statistiškai reikšmingo toksinio poveikio nėra, tolesnių bandymų su didesnėmis ar mažesnėmis koncentracijomis atlikti nebūtina. Reikia pažymėti, kad vandenyje mažai tirpios medžiagos, mišiniai, kurių sudedamosios dalys yra nevienodai tirpios vandenyje, ir lengvai įsigeriančios (adsorbuojamos) medžiagos turėtų būti dedami tiesiai į bandymo indus ir juose pasveriami. Šiuo atveju nustatytą bandomosios medžiagos pradinio tirpalo tūrį reikėtų pakeisti skiedimui tinkamu vandeniu.

Nustatomasis bandymas

Bendrosios deguonies sugerties slopinimas

41. Atliekant šį bandymą reikėtų naudoti per išankstinį bandymą nustatytą koncentracijos verčių intervalą. Siekiant gauti tiek NOEC, tiek EC_x (pvz., EC_{50}) vertes, daugeliu atvejų rekomenduojama naudoti šešis kontrolinius bandinius ir penkias bandomosios medžiagos koncentracijas, nustatytas geometrinės progresijos seka, paruošiant penkis kartotinius bandinius. Abiotinės kontrolės kartoti nereikia, jeigu per išankstinį bandymą abiotinės deguonies sugerties nenustatyta; tačiau jeigu nustatyta reikšminga abiotinė deguonies sugertis, reikėtų paruošti kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos abiotinius kontrolinius bandinius Dumblo jautrį reikėtų patikrinti naudojant etaloninę cheminę medžiagą 3,5-dichlorfenolį. Reikėtų tikrinti kiekvienos bandymų serijos dumblo jautrį, nes yra žinoma, kad jis kinta. Visais atvejais po 3 valandų (ir, jei reikia, papildomų 30 minučių) iš bandymo indų paimami ėminiai ir deguonies sugerties greitis išmatuojamas kameroje su deguonies elektrodu. Pagal gautus duomenis apskaičiuojamas konkretus kontrolinių ir bandomųjų mišinių kvėpavimo intensyvumas, tada apskaičiuojamas procentinis slopinimo lygis pagal 7 lygtį (pateikta toliau).

Heterotrofinio kvėpavimo ir nitrifikacijos slopinimo skyrimas

42. Naudojant specialų nitrifikacijos inhibitorių ATU galima tiesiogiai įvertinti bandomųjų cheminių medžiagų slopinamąjį poveikį heterotrofinei oksidacijai, o atimant deguonies sugerties greitį, veikiant ATU, iš bendrosios sugerties greičio (be ATU) galima apskaičiuoti poveikį nitrifikacijos greičiui. Reikėtų paruošti du reakcijos mišinių rinkinius pagal 41 skirsnyje aprašytus bandymo planus, skirtus EC_x arba NOEC nustatyti, tačiau viename iš šių rinkinių reikėtų į kiekvieną mišinį papildomai įdėti ATU (galutinė šios medžiagos koncentracija turėtų būti 11,6 mg/l; įrodyta, kad ji visiškai nuslopina nitrifikaciją dumble, kurio suspenduotų kietųjų medžiagų koncentracija siekia iki 3 000 mg/l) (4). Deguonies sugerties greitis turėtų būti matuojamas po bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio; šios tiesioginės vertės parodo tik heterotrofinį kvėpavimą, o skirtumai tarp jų ir atitinkamo bendrojo kvėpavimo intensyvumo reiškia nitrifikaciją. Tada apskaičiuojami įvairūs slopinimo laipsniai.

Matavimai

43. Po bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio (-ių) reikėtų iš pirmojo aeracijos rezervuaro paimtą ėminį perkelti į kamerą su deguonies elektrodu (2 priedėlio 1 pav.) ir iškart išmatuoti ištirpusio deguonies koncentraciją. Naudojant kelių elektrodų sistemą, matavimus galima atlikti vienu metu. Maišyti (naudojant dengtą magnetą) būtina ta pačia sparta, kaip ir kalibruojant elektrodą, taip užtikrinant, kad zondas kuo mažiau vėluodamas reaguotų į deguonies koncentracijų kaitą ir matavimo inde būtų atliekami reguliarūs bei atkuriami deguonies matavimai. Paprastai pakanka savimaišio zondo sistemos su keliais deguonies elektrodais. Kamerą tarp matavimų reikėtų išplauti vandeniu. Vietoj to ėminį galima įpilti į BDS butelį (3 priedėlio 2 pav.) su magnetiniu maišikliu. Tada reikėtų į kolbos kaklelį įstatyti deguonies zondą su adapteriu (mova) ir įjungti magnetinį maišiklį. Abiem atvejais

▼M6

ištirpusio deguonies koncentracija turėtų būti nuolat matuojama ir registruojama tam tikrą laiko tarpą, paprastai 5–10 minučių arba iki tol, kol deguonies koncentracija sumažės iki mažiau nei 2 mg/l. Tada, jeigu reikia atlikti matavimus po ilgesnių veikimo laikotarpių, reikėtų išimti elektrodą, mišinį grąžinti į aeracijos rezervuarą ir toliau aeruoti bei maišyti.

Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos patikrinimas

44. Dėl tam tikrų priežasčių gali reikėti išmatuoti bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją bandymo induose. Pažymėtina, kad jeigu naudojami pradiniai tirpalai, paruošti iš:

— vandenyje mažai tirpių medžiagų,

— mišinių, kurių sudedamosios dalys nevienodai tirpios vandenyje, arba

— vandenyje labai tirpių medžiagų, kurių pradinio tirpalo koncentracija yra artima tirpumo vandenyje ribai,

tokiu atveju vandenyje ištirpusi dalis ir faktinė į bandymo indus perkeliamos bandomosios cheminės medžiagos koncentracija yra nežinomos. Siekiant apibūdinti bandomosios cheminės medžiagos poveikį, reikia analitiškai įvertinti jos koncentracijas bandymo induose. Kad būtų paprasčiau, šį analitinį vertinimą reikėtų atlikti prieš dedant pasėlį. Kadangi į bandymo indus pateks tik ištirpusios bandomosios medžiagos dalys, išmatuotos jos koncentracijos gali būti labai mažos.

45. Kad nereikėtų atlikti ilgai trunkančios ir brangiai kainuojančios analizės, patartina paprasčiausiai dėti bandomąją cheminę medžiagą tiesiai į bandymo indus ir juose pasverti, o tada šia iš pradžių pasvėrus nustatyta vardine koncentracija remtis atliekant vėlesnius skaičiavimus. Ištirpusių, neištirpusių ar įsigėrusių (adsorbuotų) bandomosios cheminės medžiagos dalių skirti nebūtina, nes visos šios dalys taip pat susidaro nuotekų valymo įrenginyje natūraliomis sąlygomis ir gali skirtis priklausomai nuo nuotekų sudėties. Šiuo bandymo metodu siekiama pagrįstai įvertinti neslopinančią bandomosios medžiagos koncentraciją, tačiau jis netinka, kai reikia išsamiai ištirti, kurios tos medžiagos dalys prisideda prie slopinamojo poveikio aktyviojo dumblo organizmams. Galiausiai pažymėtina, kad lengvai įsigeriančias (adsorbuojamas) medžiagas taip pat reikėtų pasverti tiesiai bandymo induose, kurie turėtų būti silanizuoti, kad dėl įgerties būtų prarasta kuo mažiau medžiagos.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Deguonies sugerties greičio apskaičiavimas

46. Deguonies sugerties greitis turėtų būti apskaičiuojamas naudojant išmatuotų verčių vidurkį, pvz., pagal deguonies koncentracijos kaip laiko funkcijos grafiko tiesinę dalį, atliekant skaičiavimus tik 2,0–7,0 mg/l deguonies koncentracijų intervale, nes nuo didesnių arba mažesnių koncentracijų savaime gali priklausyti deguonies vartojimo greitis. Kartais neišvengiamai būtina rinktis už šias vertes mažesnių arba didesnių koncentracijų intervalus, pavyzdžiui, kai kvėpavimas yra stipriai slopinamas, todėl labai lėtas, arba kai tam tikras aktyvusis dumblas kvėpuoja labai intensyviai. Tai yra priimtina, jeigu deguonies sugerties grafike nubrėžtos papildomos atkarpos yra tiesės, kurių nuolydis nesikeičia ir už O_2 2,0 arba 7,0 mg/l ribos. Bet kokių kreivių atsiradimas grafike reiškia, kad matavimo sistema stabilizuojasi arba

▼M6

kad deguonies sugerties greitis kinta ir jo nereikėtų naudoti apskaičiuojant kvėpavimo intensyvumą. Deguonies sugerties greitį reikėtų išreikšti miligramais vienam litrui per valandą (mg/l/val.) arba miligramais vienam dumblo sausosios medžiagos masės gramui per valandą (mg/g/val.). Deguonies suvartojimo greitis R (mg/l/val.) gali būti apskaičiuojamas arba interpoliuojamas iš nustatyto deguonies kiekio mažėjimo grafiko tiesinės dalies pagal 1 lygtį:

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

kurioje:

Q_1 yra deguonies koncentracija (mg/l) grafiko tiesinės dalies pasirinktos atkarpos pradžioje;

Q_2 – deguonies koncentracija (mg/l) grafiko tiesinės dalies pasirinktos atkarpos pabaigoje;

Δ_t – laiko intervalas (min.) tarp abiejų matavimų.

47. Konkretus kvėpavimo intensyvumas (R_s) išreiškiamas kaip suvartoto deguonies kiekis vienam dumblo sausosios medžiagos masės gramui per valandą (mg/g/val.) pagal 2 lygtį:

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

kurioje SS yra bandymo mišinyje suspenduotų kietųjų medžiagų koncentracija (g/l).

48. Įvairūs R rodikliai, kuriuos galima taikyti kartu, yra:

S savitasis deguonies vartojimo greitis

T bendrojo kvėpavimo intensyvumas

N nitrifikacinio kvėpavimo intensyvumas

H heterotrofinio kvėpavimo intensyvumas

A deguonies sugerties dėl abiotinių procesų greitis

B iš tuščiųjų bandinių nustatytas (vidutinis) greitis

Nitrifikacinės deguonies sugerties greičio apskaičiavimas

49. Bendrojo kvėpavimo (R_T), nitrifikacinio kvėpavimo (R_N) ir heterotrofinio kvėpavimo (R_H) santykis gaunamas pagal 3 lygtį:

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

kurioje:

R_N yra nitrifikacinės deguonies sugerties greitis (mg/l/val.);

R_T – tuščiame kontroliniame bandinyje išmatuotas deguonies sugerties greitis (nenaudojant ATU; F_B) (mg/l/val.);

R_H – tuščiame kontroliniame bandinyje išmatuotas deguonies sugerties greitis naudojant ATU (F_N) (mg/l/val.).

▼M6

50. Šis santykis tinka matuojant tuščiųjų bandinių vertes (R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}), abiotinius kontrolinius bandinius (R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}) ir bandinius su bandomosiomis cheminėmis medžiagomis (R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}) (mg/g/val.). Savitasis kvėpavimo intensyvumas apskaičiuojamas pagal:

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

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

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

51. Jeigu per išankstinį bandymą R_N yra nereikšmingas (pvz., < 5 % R_T tuščiuose kontroliniuose bandiniuose), galima daryti prielaidą, kad heterotrofinė deguonies sugertis prilygsta bendrajai sugerčiai ir nitrifikacijos procesas nevyksta. Iš kito šaltinio paimtą aktyvųjį dumblą reikėtų naudoti tuo atveju, jeigu atliekant bandymus reikia atsižvelgti į poveikį heterotrofiniams ir nitrifikuojantiems mikroorganizmams. Jeigu yra įrodymų, kad deguonies sugerties greitis slopinamas esant įvairioms bandomosios cheminės medžiagos koncentracijoms, atliekamas nustatomasis bandymas.

Slopinimo procentinio lygio apskaičiavimas

52. Bendrojo deguonies vartojimo slopinimo, esant kiekvienai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai, procentinis lygis (I_T) nustatomas pagal 7 lygtį:

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

53. Heterotrofinės deguonies sugerties slopinimo, esant kiekvienai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai, procentinis lygis (I_H) panašiai gaunamas pagal 8 lygtį:

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

54. Galiausiai deguonies sugerties dėl nitrifikacijos slopinimas (I_N), esant kiekvienai koncentracijai, gaunamas pagal 9 lygtį:

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

55. Deguonies sugerties slopinimo procentinį lygį reikėtų pavaizduoti grafike kaip bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos logaritmo funkciją (slopinimo kreivė, žr. 4 priedėlio 3 pav.). Slopinimo kreivės brėžiamos po kiekvieno aeravimo periodo (3 val.) arba po papildomų 30 min. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant deguonies sugertis nuslopinama 50 % (EC_{50}), turėtų būti apskaičiuojama arba interpoliuojama pagal grafiką. Jeigu yra tinkamų duomenų, galima apskaičiuoti arba interpoliuoti EC_{50} 95 % pasikliovimo ribas, kreivės nuolydį ir atitinkamas vertes slopinimo pradžioje (pvz., EC_{10} arba EC_{20}) ir slopinimo intervalo pabaigoje (pvz., EC_{80} arba EC_{90}).

56. Pažymėtina, kad dėl dažnai pastebimo rezultatų kintamumo daugeliu atvejų gali pakakti papildomai išdėstyti rezultatus didėjimo tvarka, pvz.:

EC_{50} < 1 mg/l

EC_{50} nuo 1 mg/l iki 10 mg/l

EC_{50} nuo 10 mg/l iki 100 mg/l

EC_{50} > 100 mg/l

Rezultatų aiškinimas

EC_x

▼M6

57. EC_x vertės, įskaitant susijusias atitinkamo parametro žemutinę ir viršutinę 95 % pasikliovimo ribas, apskaičiuojamos taikant tinkamus statistinius metodus (pvz., probito analizę, logistinę arba Weibull funkciją, sutrumpintą Spearman-Karber metodą arba paprastąją interpoliaciją (11)). EC_x vertė gaunama į gautą lygtį įrašant vertę, atitinkančią x % kontrolinės grupės vidurkio. Apskaičiuojant EC_{50} ar bet kokią kitą EC_x vertę turėtų būti atlikta bandomųjų grupių vidurkių (x) regresinė analizė.

NOEC įvertinimas

58. Jeigu, siekiant nustatyti NOEC, reikia atlikti statistinę analizę, būtina turėti kiekvieno indo statistinius duomenis (kartotiniais bandiniais laikomi atskiri indai). Turėtų būti taikomi tinkami statistiniai metodai pagal EBPO „Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application“ (dokumentas, kuriame rašoma apie dabartinius ekotoksiškumo duomenų statistinės analizės metodus – jų taikymo gairės) (11). Apskritai bandomosios cheminės medžiagos neigiamas poveikis, palyginti su kontroline grupe, tiriamas atliekant vienpusį (trumpesnįjį) hipotezės tikrinimą, kai $p \leq 0{,}05$.

Bandymo ataskaita

59. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikta toliau nurodyta informacija.

Bandomoji cheminė medžiaga

— Bendrinis pavadinimas, cheminis pavadinimas, CAS numeris, grynumas.

— Bandomosios cheminės medžiagos fizikinės ir cheminės savybės (pvz., *log* K_{ow}, tirpumas vandenyje, garų slėgis, Henrio dėsnio konstanta (H) ir galima informacija apie bandomosios cheminės medžiagos išlikimą aplinkoje, pvz., įgertį į aktyvųjį dumblą).

Bandymo sistema

— Aktyviojo dumblo šaltinis, atitinkamo nuotekų valymo įrenginio veikimo sąlygos ir į jį patenkančios nuotekos, aktyviojo dumblo koncentracija, išankstinis apdorojimas ir priežiūra.

Bandymo sąlygos

— Bandymo temperatūra, pH lygis bandymo metu ir bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio (-ių) trukmė.

Rezultatai

— Savitasis kontrolinių bandinių deguonies vartojimas (mg O_2/(g dumblo × val.).

— Visi matavimų duomenys, slopinimo kreivė (-ės) ir EC_{50} apskaičiavimo metodas.

— EC_{50} ir, jeigu įmanoma, 95 % pasikliovimo ribos, galbūt EC_{20}, EC_{80}; galbūt NOEC ir taikyti statistiniai metodai, jeigu EC_{50} nustatyti neįmanoma.

— Bendrojo ir, kai tinka, heterotrofinio kvėpavimo bei nitrifikacijos slopinimo nustatymo rezultatai.

— Abiotinė deguonies sugertis kontroliniame fizikinių ir cheminių savybių tyrimo bandinyje (jeigu naudojamas).

— Etaloninės cheminės medžiagos pavadinimas ir ją naudojant gauti rezultatai.

— Bet kokie pastebėjimai ir nukrypimai nuo standartinės procedūros, galėję turėti įtakos bandymo rezultatui.

NUORODOS

(1) Brown, D., Hitz, H.R. and Schäfer, L. (1981). The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10 (3): 245-261.

▼M6

(2) King, E. F. and Painter H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1(1): 27-39.

(3) OECD (1984), Activated sludge, Respiration inhibition test, Test Guideline No. 209, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(4) ISO (2007). ISO 8192 Water Quality- Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation, International Organization for Standardization.

(5) Bealing, D. J. (2003). Document ISO/TC147/WGI/N.183, International Organization for Standardization.

(6) Painter, H A, Jones K (1963). The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-orgranisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471-483.

(7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1:515-524.

(8) Robra, B. (1976). Wasser/Abwasser 117, 80.

(9) Fiebig S. and Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test – acc. to the OECD guideline 209. *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.

(10) ISO (1995). ISO 10634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in aqueous medium, International Organization for Standardization.

(11) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

▼M6

1 priedėlis

Sąvokų apibrėžtys

Toliau pateiktos taikant šį bandymo metodą vartojamų sąvokų apibrėžtys.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

ECx (x % poveikį sukelianti poveikio koncentracija) – bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant bandomieji organizmai patiria x % poveikį per atitinkamą tos medžiagos veikimo laikotarpį, palyginti su kontroliniu bandiniu. Pavyzdžiui, EC_{50} yra koncentracija, kuri, kaip įvertinta, iki bandymo vertinamosios baigties per nustatytą bandomosios medžiagos veikimo laikotarpį paveikia 50 % atitinkamos populiacijos.

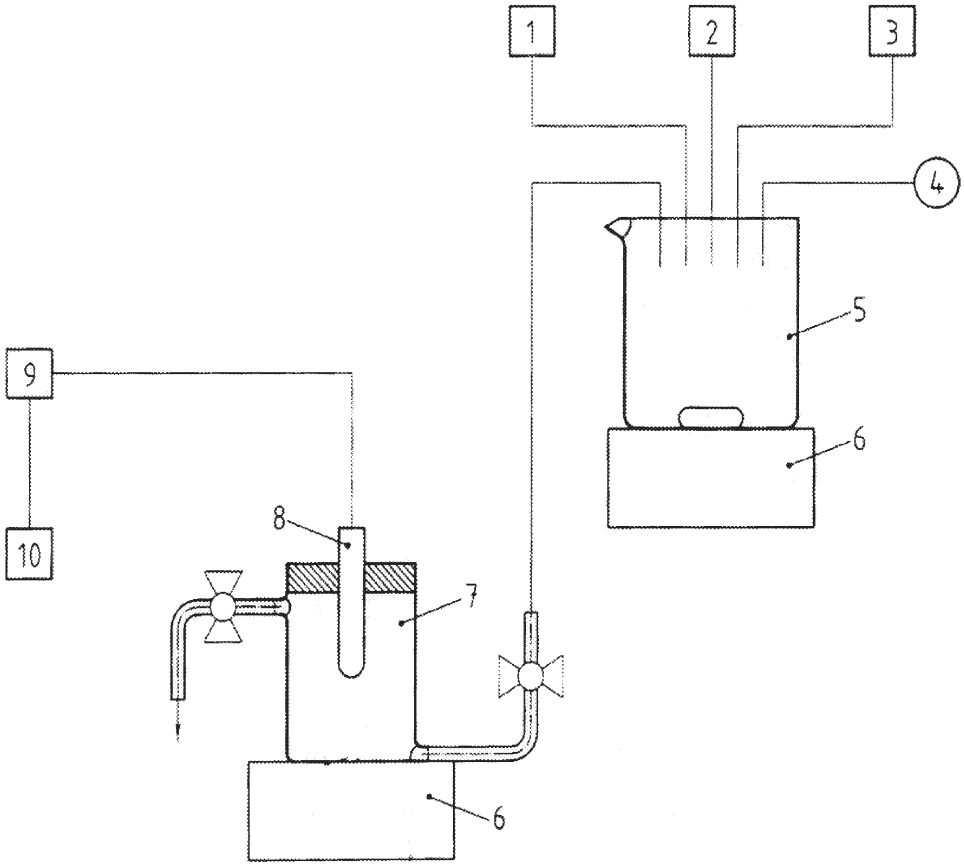
Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant jokio poveikio nepastebima. Atliekant šį bandymą, NOEC atitinkanti koncentracija per nustatytą veikimo laikotarpį nepadaro statistiškai reikšmingo poveikio ($p < 0,05$), palyginti su kontroline grupe.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

▼**M6**

2 priedėlis

1 pav. **Matavimo prietaiso pavyzdys**



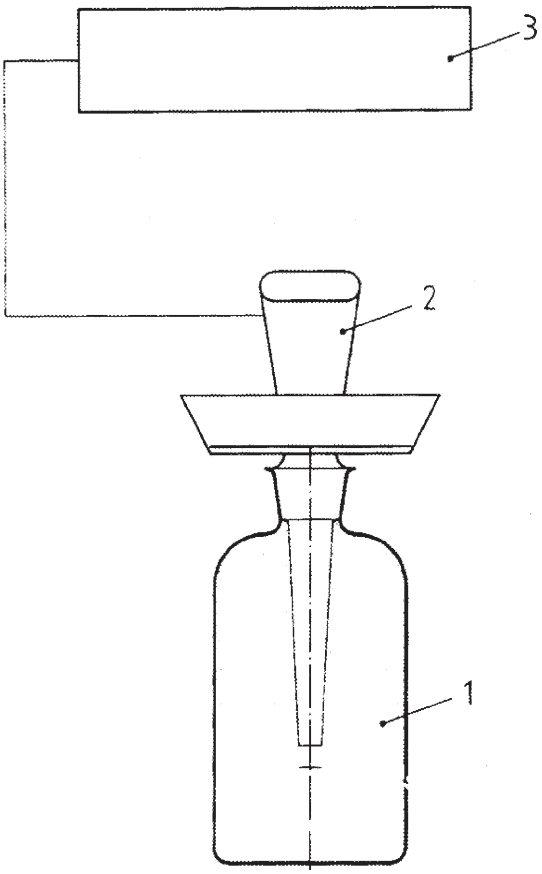
Paaiškinimas

1	aktyvusis dumblas	6	magnetinis maišiklis
2	sintetinė terpė	7	deguonies matavimo kamera
3	bandomoji cheminė medžiaga	8	deguonies elektrodas
4	oras	9	deguonies matuoklis
5	maišymo indas	10	savirašis

▼M6

3 priedėlis

2 pav. **Su BDS buteliu naudojamo matavimo prietaiso pavyzdys**



Paaiškinimas

1 bandymo indas

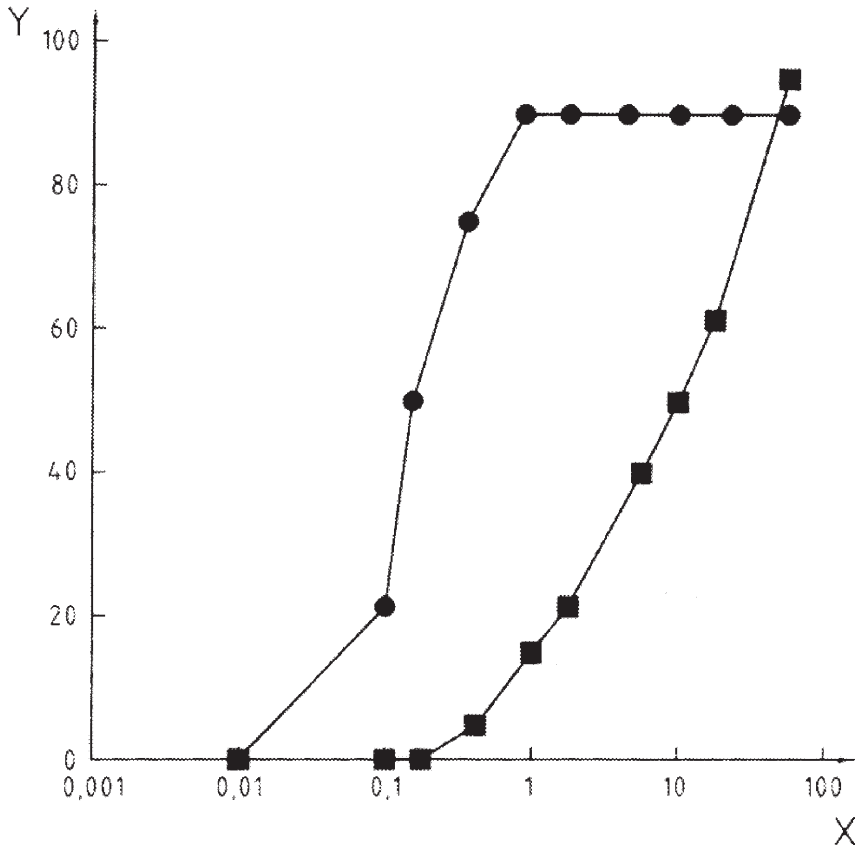
2 deguonies elektrodas

3 deguonies matuoklis

▼**M6**

4 priedėlis

3 pav. **Slopinimo kreivių pavyzdys**



Paaiškinimas

X 3,5-dichlorfenolio koncentracija (mg/l)

Y slopinimo lygis (%)

■ heterotrofinio kvėpavimo slopinimas naudojant nitrifikuojantį dumblą

● nitrifikacijos slopinimas naudojant nitrifikuojantį dumblą.

▼C1

C.12. **BIOLOGINIS SKAIDYMAS**

MODIFIKUOTAS SCAS BANDYMAS

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Metodo tikslas yra įvertinti vandenyje tirpių, nelakių organinių medžiagų galimą biologinį suskaidymą, kai jas ilgą laiką veikia palyginti didelės koncentracijos mikroorganizmai. Mikroorganizmų gyvybingumas tuo laikotarpiu palaikomas kasdien pridedant nusistovėjusių nuotekų mitybinės terpės. (Savaitgaliais nuotekas galima laikyti 4 °C temperatūroje. Dar galima naudoti sintetines nuotekas, kurios naudojamos OECD patvirtinamajame bandyme).

Ant suspenduotų kietųjų dalelių gali vykti fizikocheminė adsorbcija, todėl į tai turi būti atsižvelgta aiškinant rezultatus (žr. 3.2).

Dėl skystosios fazės didelės sulaikymo trukmės (36 valandos) ir dėl nutrūkstamo mitybinių medžiagų pridėjimo bandymas nemodeliuoja nuotekų valymo įrenginio sąlygų. Rezultatai, gauti su įvairiomis bandomosiomis medžiagomis, rodo, kad bandymas turi didelį biologinio skaidymo potencialą.

Bandyme sudarytos sąlygos yra labai palankios atrankai ir (ar) adaptavimui mikroorganizmų, galinčių suskaidyti bandomąją medžiagą. (Metodika gali būti taikoma ruošti aklimatizuotas sėjimo kultūras kitiems bandymams).

Šiame bandyme bandomosios medžiagos biologiniam suskaidymui įvertinti naudojamas ištirpusios organinės anglies kiekio matavimas. Būtų geriau, jei DOC būtų nustatoma po parūgštinimo ir prapūtimo, nei kaip skirtumas $C_{bendroji} - C_{neorganinė}$.

Lygiagrečiai taikant specifinį analizės metodą, gali būti įmanoma įvertinti medžiagos pirminį biologinį skaidymą (pirminės cheminės sandaros išnykimas).

Metodas tinka tik toms organinėms bandomosioms medžiagoms, kurios bandyme naudojamomis koncentracijomis:

— tirpios vandenyje (bent 20 mg/l ištirpusios organinės anglies),

— garų slėgis yra labai mažas,

— neinhibuoja bakterijų,

— bandymo sistemoje adsorbuojamos tik nežymiu laipsniu,

— iš bandomojo tirpalo nepradingsta dėl putojimo.

Turi būti nustatytas organinės anglies kiekis bandomoje medžiagoje.

▼C1

Norint paaiškinti gautus rezultatus, ypač kai rezultatai yra žemi arba ribiniai, naudinga butų turėti informacijos apie bandomosios medžiagos pagrindinių komponentų santykinę dalį.

Kai reikia paaiškinti žemus rezultatus ir pasirinkti tinkamą bandomąją koncentraciją, naudinga turėti informacijos apie medžiagos toksiškumą mikroorganizmams.

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

C_T = bandomojo junginio koncentracija, skaičiuojama organinės anglies kiekiu, kuris yra nusistovėjusiose nuotekose ar pridedamas į jas aeravimo laikotarpio pradžioje (mg/litre),

C_t = ištirpusios organinės anglies koncentracija, nustatyta bandomajame skystyje virš nuosėdų aeravimo laikotarpio pabaigoje (mg/litre),

C_c = ištirpusios organinės anglies koncentracija, nustatyta kontrolinio bandinio skystyje virš nuosėdų aeravimo laikotarpio pabaigoje (mg/litre).

Šiame bandyme biologinis skaidymas nustatomas kaip organinės anglies išnykimas. Biologinį skaidymą galima išreikšti:

1. Kasdien įdedamos medžiagos šalinimo procentine verte D_{da}:

$$D_{da} = \left(\frac{(C_T - (C_T - C_c))}{(C_T)} \times 100 \right) \qquad [1]$$

čia

D_{da} = skaidymas/kasdieninis pridėjimas.

2. Kiekvienos dienos pradžioje turimo medžiagos kiekio šalinimo procentinė vertė D_{ssd}:

$$D_{ssd} = \left(\left(\frac{(2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)})}{(2C_T + C_{ti} - C_{ci})} \right) \times 100 \right) \qquad [2\ (a)]$$

$$\approx \left(\left(\frac{(2C_T - 2(C_t - C_c))}{(2C_T + (C_t - C_c))} \right) \times 100 \right) \qquad [2\ (b)]$$

čia

D_{ssd} = skaidymas/medžiagos kiekis dienos pradžioje;

indeksai i ir (i + 1) nurodo matavimo dieną.

2(a) lygtį rekomenduojama taikyti, jei ištakio DOC kinta diena po dienos, o 2(b) lygtis gali būti taikoma, kai ištakio DOC diena po dienos palyginti nekinta.

▼C1

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Kai kuriais atvejais, kai tiriamos naujos medžiagos, etaloninės medžiagos gali būti naudingos, tačiau nėra specifinės etaloninės medžiagos, kurią galima būtų rekomenduoti šiam bandymui.

Visų pirma, yra pateikti duomenys apie kelis junginius, įvertintus tarplaboratorinio lyginimo bandymuose (žr. 1 priedėlį), kad retkarčiais būtų galima metodą sutikrinti ir jo rezultatus lyginti su rezultatais, gautais kitais metodais.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Aktyvusis dumblas iš nuotekų valymo įrenginio dedamas į pusiau nepertraukiamo veikimo aktyviojo dumblo įrenginį (*Semi-Continuous Activated Sludge* (SCAS)). Įdedama bandomosios medžiagos ir nusistovėjusių buitinių nuotekų, ir mišinys aeruojamas 23 valandas. Paskui aeravimas stabdomas, dumblas paliekamas nusistovėti ir skystis virš dumblo pašalinamas.

Aeravimo kameroje likęs dumblas maišomas su kita bandomosios medžiagos ir nuotekų dalimi ir ciklas kartojamas.

Biologinio skaidymo buvimas įrodomas, nustatant ištirpusios organinės anglies kiekį skystyje virš dumblo. Ši vertė lyginama su verte, gauta skysčiui kontroliniame mėgintuvėlyje, kuriame buvo tik nusistovėjusios nuotekos.

Kai taikomas specifinis analizės metodas, galima nustatyti pradinės medžiagos koncentracijos pokyčius dėl jos molekulių biologinio skaidymo (pirminis biologinis skaidumas).

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Šio metodo, kuris remiasi ištirpusios organinės medžiagos šalinimu, atkuriamumas dar nėra nustatytas. (Kai tiriamas pirminis biologinis skaidymas, labai tikslūs duomenis yra gaunami medžiagoms, kurios labai išsiskaido).

Metodo jautrumas labai priklauso nuo tuščiojo bandinio kintamumo ir, kiek mažiau, nuo ištirpusios anglies nustatymo preciziškumo ir bandomosios medžiagos kiekio skystyje kiekvieno ciklo pradžioje.

1.6. BANDYMO PROCEDŪROS APRAŠYMAS

1.6.1. *Paruošiamieji darbai*

Oro tiekimo vamzdeliai (1 paveikslas) jungiami prie reikiamo skaičiaus švarių aeravimo įrenginių, skirtų kiekvienai bandomajai medžiagai ir kontroliniams bandiniams, arba galima naudoti originalųjį 1,5 litro SCAS bandymo įrenginį. Į įrenginius per medvilnės filtrą tiekiamame suslėgtame ore turi nebūti organinės anglies ir, garavimo nuostoliams mažinti, oras turi būti prisotintas vandens garų.

Aktyviojo dumblo ir nuotekų mišinio bandinys, kuriame būtų nuo 1 iki 4 g/litre suspenduotų kietųjų dalelių, gaunamas iš daugiausia buitines nuotekas valančio aktyviojo dumblo įrenginio. Kiekvienam aeravimo įrenginiui reikia maždaug 150 ml aktyviojo dumblo ir nuotekų mišinio.

▼C1

Pradiniams bandomosios medžiagos tirpalams ruošti naudojamas distiliuotas vanduo; paprastai reikia, kad organinės anglies koncentracija būtų 400 mg/litre, tokiu atveju bandomojo junginio koncentracija kiekvieno aeravimo ciklo pradžioje, kai nevyksta biologinis skaidymas, yra 20 mg/litre.

Galima naudoti didesnes koncentracijas, jei tai įmanoma atsižvelgiant į medžiagos toksiškumą mikroorganizmams.

Nustatomas organinės anglies kiekis pradiniuose tirpaluose.

1.6.2. *Bandymo sąlygos*

Bandymas turi būti atliekamas 20–25 °C temperatūroje.

Naudojama didelė aerobinių mikroorganizmų koncentracija (nuo 1 iki 4 g/litre suspenduotų kietųjų dalelių), ir tikroji sulaikymo trukmė yra 36 valandos. Anglingoji medžiaga nuotekų mitybinėje terpėje stipriai oksiduojama, paprastai tai įvyksta per aštuonias valandas nuo kiekvieno aeravimo ciklo pradžios. Po to, iki aeravimo laikotarpio pabaigos dumblas kvėpuoja endogeniškai, tuo metu vienintelis substratas yra bandomasis junginys, jei jis pats nebuvo lengvai įsisavintas. Šios savybės, kartu su sėjimo kultūros kasdieniu keitimu, kai terpe naudojamos buitinės nuotekos, užtikrina labai palankias aklimatizavimo sąlygas ir galimybę biologiškai stipriai skaidyti.

1.6.3. *Bandymo procedūra*

Iš tinkamo aktyviojo dumblo valymo įrenginio ar laboratorinio įrenginio, skirto valyti daugiausia buitines nuotekas, imamas nuotekų ir aktyviojo dumblo mišinys, kuris visą laiką, kol bus panaudotas laboratorijoje, laikomas aerobinėmis sąlygomis. Į kiekvieną aeravimo įrenginį ir į kontrolinį įrenginį įpilama po 150 ml šio mišinio (jei naudojamas originalus SCAS bandymo įtaisas, nurodytus tūrius reikia dauginti iš 10) ir pradedama aeruoti. Po 23 valandų aeravimas baigiamas ir dumblas 45 minutėms paliekamas nusistovėti. Kiekvienas indas paeiliui atkemšamas, ir iš jo išsiurbiama 100 ml skysčio virš dumblo. Prieš pat naudojimą paimamas nusistovėjusių buitinių nuotekų bandinys, ir 100 ml nuotekų įpilama į kiekvieną aeravimo įrenginį su likusiu jame dumblu. Vėl pradedama aeruoti. Šioje pakopoje bandomoji medžiaga nededama, ir į įrenginius kasdien pilama buitinių nuotekų tik tol, kol skystis virš nusistovėjusio dumblo tampa skaidrus. Tai dažniausiai trunka ne ilgiau kaip dvi savaites, per tą laiką ištirpusios organinės anglies kiekis skystyje virš dumblo kiekvieno aeravimo ciklo pabaigoje priartėja prie pastovios vertės.

Kai šis laikotarpis baigiasi, atskirieji nusistovėjusio dumblo bandiniai yra sumaišomi ir į kiekvieną įrenginį dedama po 50 ml gauto sudėtinio dumblo.

Į kontrolinius įrenginius įpilama 95 ml nusistovėjusių nuotekų ir 5 ml vandens, į bandomuosius įrenginius įpilama 95 ml nusistovėjusių nuotekų ir 5 ml atitinkamos bandomojo junginio pradinio tirpalo (400 mg/litre). Aeruoti pradedama iš naujo ir aeravimas tęsiamas 23 valandas. Po to dumblas paliekamas 45 minutėms nusistovėti, skystis virš dumblo nusiurbiamas ir jame nustatomas ištirpusios organinės anglies kiekis.

Aukščiau aprašytas užpylimo ir siurbimo procesas kartojamas kasdien iki bandymo pabaigos.

▼C1

Prieš paliekant dumblą nusistovėti, gali jį tekti nuvalyti nuo įrenginio sienelių, kad kietosios dalelės nesikauptų virš skysčio. Norint išvengti kryžminio užkrėtimo, kiekvienas įrenginys turi turėti atskirą gremžtuką ar šepetį.

Geriausia būtų, kad ištirpusi organinė anglis skystyje virš dumblo būtų nustatoma kasdien, nors analizę leidžiama atlikti rečiau. Prieš analizę skysčiai filtruojami per išplautus 0,45 μm membraninius filtrus ar centrifuguojami. Membraniniai filtrai tinka, jei užtikrinama, kad filtravimo pakopoje jie neišskiria anglies ir nesugeria medžiagos. Centrifuguojamo bandinio temperatūra neturi būti didesnė kaip 40 °C.

Bandymo trukmė junginiams, kurie yra mažai biologiškai skaidomi arba visiškai neskaidomi, nėra apibrėžta, tačiau patirtis rodo, kad dažniausiai tai turi trukti bent 12 savaičių, bet ne ilgiau kaip 26 savaites.

2. **DUOMENYS IR VERTINIMAS**

Ištirpusios anglies kiekio vertės, nustatytos bandomuosiuose ir kontroliniuose skysčiuose virš nuosėdų, atidedamos grafiškai kaip laiko funkcija.

Baigus biologinį skaidymą, bandomajame bandinyje nustatytas lygis artėja prie kontroliniame bandinyje nustatyto lygio. Kai skirtumas tarp abiejų lygių trijuose iš eilės matavimuose nekinta, dar daroma tiek matavimų, kiek jų pakanka duomenims statistiškai apdoroti, ir skaičiuojama bandomosios medžiagos biologinio skaidymo procentinė vertė (D_{da} ar D_{ssd}, žr. 1.2).

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje pateikiama, jei įmanoma, tokia informacija:

— visa informacija apie nuotekų prigimtį, naudoto įrenginio tipą ir eksperimentiniai rezultatai, gauti bandomajai medžiagai, etaloninei medžiagai, jei buvo naudojama, ir tuščiajam bandiniui,

— temperatūra,

— šalinimo kreivė su aprašymu, skaičiavimo būdu (žr. 1.2),

— data ir vieta, kur buvo imti aktyviojo dumblo ir nuotekų bandiniai, adaptavimo būsena, koncentracija ir t. t.,

— mokslinis bet kokių bandymo metodikos keitimų pagrindimas,

— parašas ir data.

▼C1

3.2. DUOMENŲ AIŠKINIMAS

Kadangi medžiaga, skirta šiuo metodu bandyti, biologiškai nėra lengvai skaidoma, bet koks DOC šalinimas vien tik dėl biologinio skaidymo paprastai vyksta laipsniškai dienas ar savaites, išskyrus tuos atvejus, kai įvyksta staigus aklimatizavimas, apie kurį rodo staigus išnykimas, įvykstantis po kelių savaičių.

Tačiau kartais svarbų vaidmenį gali vaidinti fizikocheminė adsorbcija; tai rodo pridėtos DOC visiškas ar dalinis išnykimas bandymo pradžioje. Kas atsitinka vėliau, priklauso nuo kai kurių faktorių, pvz., adsorbcijos laipsnio ir suspenduotų kietųjų dalelių koncentracijos išleidžiamajame ištakyje. Paprastai skirtumas tarp DOC koncentracijos kontroliniame bandinyje ir bandomosios medžiagos skystyje virš nuosėdų laipsniškai didėja nuo pradinės mažos vertės ir toliau šis skirtumas, pasiekęs naują vertę, išlieka toks iki bandymo pabaigos, jei neįvyksta aklimatizavimas.

Jei reikia atskirti biologinį skaidymą (ar dalinį biologinį skaidymą) ir adsorbciją, būtina atlikti tolesnius bandymus. Tai galima daryti įvairiais būdais, tačiau įtikinamiausias būdas yra pamatiniame bandyme (geriau, kad tai būtų respirometrinis bandymas) sėjimo kultūra naudoti skystį virš dumblo ar dumblą.

Bandomosios medžiagos, kurių neadsorbcinio DOC šalinimo vertės bandyme yra didelės, turi būti laikomos potencialiai biologiškai skaidomomis. Dalinis neadsorbcinis šalinimas rodo, kad cheminė medžiaga bent kažkiek yra biologiškai skaidoma.

Mažos ar nulinės DOC šalinimo vertės gali būti dėl mikroorganizmų inhibavimo bandomąja medžiaga, tai dar gali parodyti dumblo irimas ir jo kiekio mažėjimas, dėl ko skystis virš dumblo drumsčiasi. Bandymas turi būti pakartotas naudojant mažesnę bandomosios medžiagos koncentraciją.

Naudojant specifinį junginio analizės metodą ar bandomąsias medžiagas su žymėtais ^{14}C atomais, gali būti pasiektas didesnis jautrumas. Jei bandomasis junginys turi ^{14}C, $^{14}CO_2$ surinkimas patvirtintų, kad biologinis skaidymas įvyko.

Kai duomenys pateikiami, kaip pirminio biologinio skaidymo rezultatai, turi būti paaiškinta, jei tai įmanoma, kaip pakito cheminė sandara, kad neliko pradinės bandomosios medžiagos atsako.

Turi būti pateiktas analizės metodo tinkamumo patvirtinimas ir tuščiojo bandinio terpėje nustatyta skaidymo vertė.

4. **NUORODOS**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 A, Decision of the Council C(81) 30 final.

▼C1

1 priedėlis

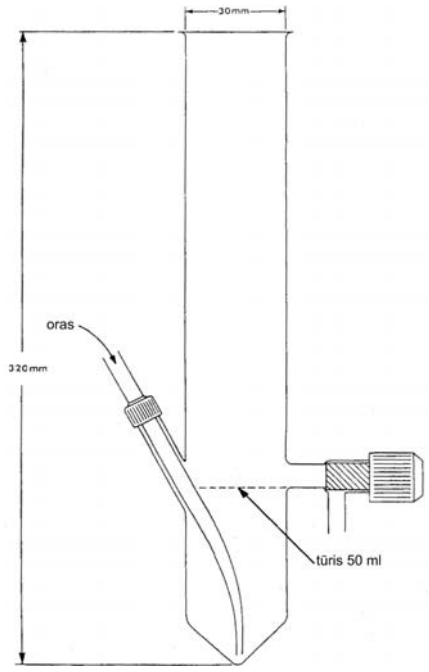
SCAS bandymas. Rezultatų pavyzdys

Medžiaga	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	Biologinio skaidymo procentas D_{da}	Bandymo trukmė (paros)
4-acetilaminobenzensulfonatas	17,2	2,0	85	40
Tetrapropilenbenzensulfonatas	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenolis	16,9	0,8	95,3	40
Dietilenglikolis	16,5	0,2	98,8	40
Anilinas	16,9	1,7	95,9	40
Ciklopentano tetrakarboksilatas	17,9	3,2	81,1	120

▼C1

2 priedėlis

Bandymo aparato pavyzdys



▼M7

C.13. **BIOLOGINIS KAUPIMASIS ŽUVYSE. VEIKIMO PER VANDENINĘ TERPĘ METODAS IR MITYBOS BANDYMAS**

ĮVADAS

Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) 305 (2012). Šios bandymų metodo peržiūros pagrindinis tikslas yra dvejopas. Pirma, numatyta įtraukti biologinio kaupimosi per maistą ([1]) bandymą, kuris tiktų labai mažai tirpių vandenyje medžiagų biologinio kaupimosi gebai nustatyti. Antra, numatyta sukurti bandymų metodą, kuriame dėl gyvūnų gerovės priežasčių būtų naudojama mažiau žuvų, jei tinka, ir kuris būtų ekonomiškai efektyvesnis.

Per metus, praėjusius nuo konsoliduoto bandymų metodo C.13 (1) priėmimo, buvo išbandyta daug medžiagų ir laboratorijos bei priežiūros institucijos įgijo nemažą patirtį. Tai padėjo įsitikinti, kad bandymo sudėtingumą galima sumažinti, jei būtų įvykdyti specifiniai kriterijai (žr. 88 pastraipą), ir kad galimas nuosekliųjų bandymų metodas. Patirtis taip pat parodė, kad biologiniai veiksniai, pvz., augimas bei žuvų lipidų kiekis, gali daryti didelę įtaką rezultatams ir į juos gali tekti atsižvelgti. Be to, buvo pripažinta, kad vandenyje labai mažai tirpių medžiagų bandymus gali būti techniškai neįmanoma atlikti. Be to, jei medžiagos labai mažai tirpsta vandeninėje terpėje, veikimo per vandeninę terpę metodas gali būti ne toks svarbus, palyginti su mitybos bandymu. Taip buvo sukurtas bandymų metodas, kurį atliekant žuvys paveikiamos per jų maistą (žr. 7–14 pastraipas ir nuo 97 pastraipos). Mitybos tinkamumo patvirtinimo bandymas (tarplaboratorinis bandymas) buvo atliktas 2010 m. (51).

Pagrindinius pakeitimus sudaro:

— jei yra tikimybė, kad biologinio koncentravimo faktorius (BCF) nepriklauso nuo bandymo koncentracijos, galima manyti, kad pakaktų bandyti tik vieną bandymo koncentraciją.

— veikimo per vandeninę terpę supaprastinto bandymo schema, pagal kurią įmanomas mažesnis ėminių ėmimo taškų skaičius, jei yra atitiktis specifiniams kriterijams;

— reikėtų išmatuoti žuvų lipidų kiekį, kad BCF būtų galima išreikšti pagal 5 % lipidų kiekį.

— didesnis dėmesys kreipiamas kinetinio BCF įvertinimui (kai įmanoma) kartu su nuostoviosios būsenos BCF įvertinimu;

— tam tikrų medžiagų grupėms bus siūlomas mitybos bandymas, jei manoma, kad jis tiktų labiau nei veikimo per vandeninę terpę bandymas.

— reikėtų matuoti žuvų masę, kad būtų galima daryti BCF_k pataisą atsižvelgiant į praskiedimą dėl augimo.

Prieš atliekant bet kurį iš biologinio kaupimosi bandymų, reikėtų turėti šią informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą:

(a) analizės metodo, taikomo matuojant bandomosios cheminės medžiagos ir jos galimų metabolitų koncentraciją audinyje, vandenyje ar maiste, jautrį (žr. 65 pastraipą);

(b) tirpumą vandenyje [TM A.6; (2)]; jį reikėtų nustatyti taikant metodą, kuris atitinka (įvertintą) tirpumo intervalą, kad būtų gauta patikima vertė. Hidrofobinėms cheminėms medžiagoms tiktų kolonėlės eliuavimo metodas.

([1]) Apibrėžtys ir vienetai pateikti 1 priedėlyje.

▼M7

(c) pasiskirstymo tarp oktanolio ir vandens koeficientą, K_{OW} [1] [TM A.8 (4), A.24 (5), A.23 (6)]; arba kitą tinkamą informaciją apie pasiskirstymo charakteristikas (pvz., sorbciją lipidais, K_{OC}); šį koeficientą reikėtų nustatyti taikant metodą, kuris atitinka (įvertintą) K_{OW} intervalą, kad būtų gauta patikima vertė. Hidrofobinėms cheminėms medžiagoms paprastai tiktų lėto maišymo metodas [TM A.23 (6)];

(d) cheminės medžiagos stabilumą vandenyje (hidrolizė [TM C.7 (7)]);

(e) cheminės medžiagos stabilumą maiste (ypač, jei pasirinktas mitybos metodas);

(f) informaciją apie fotocheminį virsmą, susijusį su švitinimo sąlygomis atliekant bandymą (8);

(g) paviršiaus įtemptį (t. y. cheminių medžiagų, kurių log K_{OW} negali būti nustatytas) (TM A.5 (9));

(h) garų slėgį (TM A.4 (10));

(i) visą informaciją apie biotinį ar abiotinį skaidymą vandenyje, pvz., lengvą biologinį skaidumą (TM C.4, I–VII dalys(11), C.29 (12)) (bet juo neapsiribojant), jei tinka;

(j) informaciją apie metabolitus: struktūrą, log K_{OW}, susidarymą ir skaidumą, jei tinka;

(k) rūgšties disociacijos konstantą (pK_a), jei cheminės medžiagos gali jonizuotis. Jei būtina, reikėtų nustatyti bandymo vandens pH, siekiant užtikrinti, kad bandant medžiaga būtų jonizuotos formos, jei tai suderinama su žuvų rūšimi.

Nepriklausomai nuo pasirinkto veikimo būdo ar ėminių ėmimo schemos, šiame bandymų metode aprašyta procedūra cheminių medžiagų biologinio kaupimosi žuvyse gebai nustatyti. Nors visiška pirmenybė teikiama dinaminių bandymų režimams, leidžiami pusiau statiniai režimai, jei jie atitinka tinkamumo kriterijus (žr. 24 ir 113 pastraipas). Taikant mitybos metodą, dinaminė sistema nėra būtina, kad būtų išlaikyta bandomosios cheminės medžiagos koncentracija vandenyje, tačiau ji padės užtikrinti reikiamą ištirpusio deguonies koncentraciją bei vandens grynumą ir pašalinti įtaką darančius veiksnius, pvz., organizmo išskiriamus produktus.

Nepriklausomai nuo pasirinkto bandymų metodo, pateikta pakankamai daug duomenų šiam bandymui atlikti, bet paliekant reikiamą laisvę bandymo schemai priderinti prie konkrečių laboratorijų sąlygų ir prie įvairių bandomųjų cheminių medžiagų charakteristikų. Veikimo per vandeninę terpę bandymas labiausiai tinka stabilioms organinėms medžiagoms, kurių log K_{OW} vertės yra nuo 1,5 iki 6,0 (13), bet vis dar gali būti taikoma stipriai hidrofobinėms medžiagoms (kurių log K_{OW} > 6,0), jei galima įrodyti visiškai vandenyje ištirpusios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos stabilumą. Jei vandenyje ištirpintos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos stabilumo negalima įrodyti, veikimo per vandeninę terpę tyrimas netiktų, todėl medžiagą žuvyse reikėtų nustatyti mitybos metodu (nors mitybos bandymo rezultatų aiškinimas ir naudojimas gali priklausyti nuo reglamentavimo sistemos). Organinių medžiagų, kurių log K_{OW} vertės yra ne didesnės kaip maždaug 9,0, biologinio kaupimosi faktoriaus (BCF, kartais žymimo K_B) pradinius įverčius galima gauti taikant Bintein *et al.* lygtį (14). Tokių stipriai hidrofobinių medžiagų biologinio kaupimosi faktoriaus

[1] Kartais žymimas P_{OW}; nustatomas kratomos kolbos metodu pagal TM A.8 (4), HPLC metodu pagal TM A.24 (5) ir lėto maišymo metodu pagal TM A.23 (6). Kartais naudojamos tirpalo generavimo kolonėlės metodas log K_{OW} nustatyti. Yra nedaug tyrimų, kuriuose būtų taikomas šis metodas, pirmiausiai polichlorintiesiems bifenilams ir dibenzdioksinams (pvz., Li and Doucette, 1993) (3). Jei medžiagos gali jonizuotis, log K_{OW} būtų naudojamas nejonizuotai formai.

▼M7

pradinis įvertis gali būti didesnis nei nuostoviosios būsenos biologinio kaupimosi faktoriaus (BCF_{SS}) vertė, kurią būtų tikimasi gauti atliekant laboratorinius bandymus, ypač, kai pradiniam įverčiui gauti naudojamas paprastas tiesinis modelis. Parametrai, kurie apibūdina biologinio kaupimosi gebą, yra sugerties greičio konstanta (k_1), šalinimo greičio konstantos, įskaitant apsivalymo greičio konstantą (k_2), nuostoviosios būsenos biologinio koncentravimo faktorius (BCF_{SS}), kinetinis biologinio koncentravimo faktorius (BCF_K) ir mitybos biomagnifikacijos faktorius (BMF) ([1]).

Žymėtosios bandomosios cheminės medžiagos gali palengvinti vandens, maisto ir žuvų ėminių analizę, ir gali būti naudojamos tam, kad būtų nustatyta, ar reikės atlikti metabolitų identifikavimą ir kiekybinį nustatymą. Jei matuojamas vien tik suminis radioaktyviųjų likučių kiekis (pvz., sudeginant arba soliubilizuojant audinį), BCF ar BMF yra pagrįsti pradinės cheminės medžiagos, visų išlikusių metabolitų, taip pat asimiliuotos anglies suminiu kiekiu. Todėl BCF ar BMF vertės, pagrįstos suminiu radioaktyviųjų likučių kiekiu, negali būti tiesiogiai lyginamos su BCF ar BMF, gautų atliekant vien tik pradinės cheminės medžiagos specifinę analizę. Atliekant žymėtųjų medžiagų tyrimus, prieš analizę galima taikyti atskyrimo procedūras, pvz., plonasluoksnė chromatografija TLC, HPLC ar GC ([2]), kad BCF ar BMF būtų nustatyti pagal pradinę cheminę medžiagą. Taikant atskyrimo metodus, reikėtų atlikti pradinės cheminės medžiagos ir atitinkamų metabolitų identifikavimą ir kiekybinį nustatymą ([3]) (žr. 65 pastraipą), jei BCF ar BMF reikia gauti pagal pradinės cheminės medžiagos koncentraciją žuvyje, o ne pagal žymėtųjų likučių suminį kiekį. Taip pat galima sujungti žuvų metabolizmo ar *in vivo* pasiskirstymo tyrimą su biologinio kaupimosi tyrimu dėl likučių audiniuose analizės ir identifikavimo. Metabolizmo tikimybę galima prognozuoti tinkamomis priemonėmis (pvz., naudojant EBPO QSAR instrumentines priemones (15) ir nuosavybės teise turimas QSAR programas).

Sprendimas dėl veikimo per vandeninę terpę ar mitybos bandymo atlikimo ir dėl jo schemos turėtų būti pagrįstas 3 pastraipos veiksniais, kurie būtų nagrinėjami kartu su atitinkama reglamentavimo sistema. Pvz., jei cheminės medžiagos turi didelį log K_{OW}, bet jų tirpumas vandenyje vis dar yra pakankamas atsižvelgiant į turimų analizės metodų jautrį, pirmenybę reikėtų teikti veikimo per vandeninę terpę bandymui. Tačiau gali būti, kad nėra galutinės informacijos apie šių hidrofobinių medžiagų tirpumą vandenyje, todėl, prieš priimant sprendimą dėl taikomo bandymų metodo, reikėtų ištirti galimybę gauti stabilias ir matuojamas vandenyje ištirpusios medžiagos koncentracijos vertes (stabilios emulsijos neleidžiamos), tinkamas veikimo per vandeninę terpę metodui (16). Neįmanoma pateikti tikslių nurodymų dėl metodo, kurį reikia taikyti atsižvelgiant į tirpumo vandenyje ir pasiskirstymo tarp oktanolio ir vandens koeficiento „ribinius“ kriterijus, nes dėl pirmiau nurodytų priežasčių metodo taikomumui gali turėti reikšmingą įtaką kiti veiksniai (analizės metodai, skaidumas, adsorbcija ir kt.). Tačiau didesnis kaip 5 K_{OW} ir mažesnis kaip ~0,01 – 0,1 mg/l tirpumas vandenyje žymi grupę medžiagų, kurių veikimo per vandeninę terpę bandymas gali būti vis sunkesnis.

Reikėtų atsižvelgti į kitus veiksnius, kurie gali turėti įtakos bandymo pasirinkimui, įskaitant cheminės medžiagos adsorbcijos ant bandymo indų ir aparatūros gebą, jos stabilumą vandeniniame tirpale palyginti su jos stabilumu žuvų maiste (17) (18) ir kt.

Informacijos apie tokius praktinius aspektus galima gauti iš kitų baigtų vandeninės terpės tyrimų. Papildomos informacijos apie tai, kaip įvertinti aspektus, susijusius su biologinio kaupimosi tyrimų charakteristikomis, galima rasti literatūroje (pvz., (19)).

Jei medžiagų tirpumas arba vandeninio tirpalo koncentracijos užtikrinimas, taip pat šių koncentracijos verčių analizė niekaip netrukdo taikyti veikimo per vandeninę terpę metodo, šiam metodui yra teikiama pirmenybė, kai reikia nustatyti medžiagos biologinio koncentravimo gebą. Bet kuriuo atveju reikėtų patikrinti, ar

([1]) Apibrėžtys ir vienetai pateikti 1 priedėlyje.

([2]) TLC – plonasluoksnė chromatografija; HPLC –efektyvioji skysčių chromatografija; GC – dujų chromatografija.

([3]) Taikant kai kurias reglamentavimo sistemas, gali būti privaloma metabolitų analizė, kai įvykdomos tam tikros sąlygos (žr. 65 pastraipą).

▼M7

naudoti numatyta (-os) veikimo per vandeninę terpę koncentracijos vertė (-ės) atitinka tirpumo bandymo terpėje vertes. Galima taikyti įvairius metodus ištirpintos bandomosios cheminės medžiagos stabiliai koncentracijai užtikrinti, pvz., naudoti pradinius tirpalus ar pasyvaus dozavimo sistemas (pvz., kolonėlės eliuavimo metodą), jei galima įrodyti, kad galima užtikrinti stabilias koncentracijos vertes ir kad bandymo terpės nepakito palyginti su rekomenduotomis 27 pastraipoje.

Stipriai hidrofobinių medžiagų (kurių log K_{OW} > 5, o tirpumas mažesnis kaip ~ 0,01–0,1 mg/l) veikimo per vandeninę terpę bandymas gali būti vis sunkesnis. Apribojimų priežastimi gali būti nesugebėjimas užtikrinti vandeninės terpės koncentracijos, kurią būtų galima laikyti pakankamai pastovia (pvz., dėl sorbcijos ant veikimo indų stiklo ar dėl to, kad žuvys ją greitai sugeria), arba naudojamos koncentracijos vandeninėje terpėje vertės yra tokios mažos, kad jos atitinka analizės kiekybinio nustatymo ribą arba yra dar mažesnės [1]. Šioms stipriai hidrofobinėms medžiagoms rekomenduojamas mitybos bandymas, jei bandymas yra suderinamas su atitinkama reglamentavimo sistema ir rizikos vertinimo poreikiais.

Tiriant paviršinio aktyvumo medžiagas reikėtų spręsti, ar, atsižvelgiant į cheminės medžiagos savybes, biologinio koncentravimo bandymą vandeninėje terpėje įmanoma atlikti, kitu atveju turbūt labiau tiktų mitybos tyrimas. Paviršinio aktyvumo medžiagos yra paviršiuje veikiantys agentai, kurie mažina sąlyčio tarp dviejų skysčių paviršiaus įtemptį. Dėl savo amfifilinės prigimties (t. y. jos turi hidrofilinę ir hidrofobinę dalį) jos kaupiasi sąlyčio paviršiuje, pvz., vandens ir oro sąlyčio paviršiuje, vandens ir maisto bei stiklinių sienų sąlyčio paviršiuje, ir tai trukdo nustatyti jų koncentraciją vandenyje.

Atliekant mitybos bandymą, galima apeiti kai kuriuos veikimo aspektus, kai tiriami sudėtingi mišiniai, kurių komponentų tirpumo vandenyje ribos skiriasi, nes tolygesnis veikimas įvairiems mišinio komponentams yra labiau tikėtinas palyginti su veikimo per vandeninę terpę metodu (žr. (20)).

Reikėtų pažymėti, kad taikant mitybos metodą gaunamas mitybos biomagnifikacijos faktorius (BMF), o ne biologinio koncentravimo faktorius (BCF) [2]. Yra metodų, kuriuos taikant galima įvertinti kinetinį biologinio koncentravimo faktorių (BCF_K) pagal duomenis, gautus tiriant mitybą (kaip aptarta 8 priedėlyje), tačiau šie metodai turėtų būti taikomi atsargiai. Apskritai, taikant šiuos metodus daroma prielaida dėl pirmojo laipsnio kinetikos ir jie yra taikomi tik tam tikrų grupių junginiams. Mažai tikėtina, kad šiuos metodus galima taikyti paviršinio aktyvumo medžiagoms (žr. 12 pastraipą).

Veikimo per vandeninę terpę supaprastinto bandymo schemą, imant mažiau ėminių ėmimo taškų gyvūnų skaičiui ir (arba) ištekliams sumažinti (žr. 83 pastraipą), reikėtų taikyti tik toms cheminėms medžiagoms, iš kurių galima pagrįstai tikėtis, kad sugertis ir apsivalymas vyks maždaug pagal pirmojo laipsnio kinetiką (t. y. apskritai nejoninėms organinėms medžiagoms, žr. 88 pastraipą).

C.13 – I. **BIOLOGINIO KAUPIMOSI ŽUVYSE BANDYMAS VEIKIANT PER VANDENINĘ TERPĘ**

BANDYMO PRINCIPAS

Bandymą sudaro du tarpsniai – veikimo (sugerties) tarpsnis ir (apsivalymo) tarpsnis po veikimo. Sugerties tarpsniu vienos rūšies žuvų grupė veikiama vienos ar kelių koncentracijos verčių bandomąja chemine medžiaga, priklausomai nuo bandomosios cheminės medžiagos savybių (žr. 49 pastraipą). Vėliau apsivalymo tarpsniui jos pernešamos į terpę be bandomosios cheminės medžiagos. Apsivalymo tarpsnis yra būtinas visada, išskyrus atvejus, kai sugerties tarpsniu cheminės

[1] Apskritai, vandeninio tirpalo koncentracijos vertės, išmatuotos sugerties tarpsnio metu, turėtų būti bent viena eile didesnės nei kiekybinio nustatymo riba, kad tyrimo apsivalymo tarpsniu būtų galima matuoti kūno sugertą kiekį ilgiau nei viena pusėjimo trukmė.

[2] Apibrėžtys ir vienetai pateikti 1 priedėlyje.

▼M7

medžiagos sugertis buvo nereikšminga. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracija žuvyje ir (arba) jos paviršiuje (ar tam tikrame jos audinyje) stebima abiem bandymo tarpsniais. Be apdorotos grupės yra kontrolinė žuvų grupė, kuri laikoma tokiomis pačiomis sąlygomis, bet be bandomosios cheminės medžiagos, kad, atliekant biologinio koncentravimo bandymą, pastebėtą galimą neigiamą poveikį būtų galima palyginti su vienodos sudėties kontroline grupe ir gauti bandomosios cheminės medžiagos fonines koncentracijos vertes ([1]).

Atliekant veikimo per vandeninę terpę bandymą, sugerties tarpsnis paprastai trunka 28 paras. Prireikus galima bandyti ilgiau (žr. 18 pastraipą) arba trumpiau, jei įrodoma, kad nuostovioji būsena pasiekiama anksčiau (žr. 1 priedėlį, *Apibrėžtys ir vienetai*). Sugerties tarpsnio trukmę ir laiką nuostoviajai būsenai pasiekti galima prognozuoti pagal 5 priedėlio lygtis. Apsivalymo tarpsnis prasideda tada, kai žuvys nebeveikiamos bandomąja chemine medžiaga, žuvis pernešant į švarų indą su ta pačia terpe, bet be bandomosios cheminės medžiagos. Jei įmanoma, apskaičiuojamas biologinio koncentravimo faktorius, pageidautina kaip koncentracijos žuvyje (C_f) ir vandenyje santykis (C_w), esant nuostoviajai būsenai (BCF_{SS}; apibrėžtis pateikta 1 priedėlyje), ir kaip kinetinis biologinio koncentravimo faktorius (BCF_K; žr. 1 priedėlį, *Apibrėžtys ir vienetai*), kuris įvertinamas kaip sugerties (k_1) ir apsivalymo (k_2) greičio konstantų santykis, darant prielaidą dėl pirmojo laipsnio kinetikos ([2]).

Jei nuostovioji būsena nepasiekiama per 28 paras, BCF apskaičiuojamas taikant kinetinį metodą (žr. 38 pastraipą) arba galima prailginti sugerties tarpsnį. Jei dėl to sugerties tarpsnis nuostoviajai būsenai pasiekti būtų per ilgas (žr. 37 ir 38 pastraipas, 5 priedėlį), pirmenybė teikiama kinetiniam metodui. Arba reikėtų atsižvelgti į galimybę atlikti stipriai hidrofobinių cheminių medžiagų mitybos tyrimą ([3]), jei mitybos bandymas suderinamas su atitinkama reglamentavimo sistema.

Sugerties greičio konstanta, apsivalymo (netekimo) greičio konstanta (ar konstantos, jei naudojami sudėtingesni modeliai), biologinio koncentravimo faktorius (nuostovioji būsena ir (arba) kinetika) ir, jei įmanoma, kiekvieno šių parametrų pasikliovimo ribos apskaičiuojami pagal modelį, kuris geriausiai aprašo žuvyse ir vandenyje išmatuotas bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertes (žr. 5 priedėlį).

Dėl žuvies masės padidėjimo bandymo metu mažės bandomosios cheminės medžiagos koncentracija augančioje žuvyje (vadinamas praskiedimas dėl augimo), todėl kinetinio BCF įvertis būtų per mažas, jei nebūtų daroma pataisos dėl augimo (žr. 72 ir 73 pastraipas).

BCF yra pagrįstas sumine koncentracija žuvyje (t. y. suminės žuvies šlapios kūno masės atžvilgiu). Tačiau specialiems tikslams, jei žuvis yra pakankamai didelė, gali būti naudojami tam tikri audiniai ar organai (pvz., raumuo, kepenys) arba žuvis gali būti padalyta į valgomąją (filė) ir nevalgomą (viduriai) dalis. Kalbant apie daugelį organinių cheminių medžiagų yra aiški priklausomybė tarp jų biologinio koncentravimo gebos ir hidrofobiškumo, bet taip pat yra atitinkama priklausomybė tarp lipidų kiekio bandymo žuvyse ir stebimo tokių cheminių medžiagų

([1]) Būtų gerai, jei daugumos bandomųjų cheminių medžiagų nebūtų įmanoma aptikti kontrolinių ėminių vandenyje. Foninė koncentracija turėtų būti susijusi tik su natūraliai paplitusiomis medžiagomis (pvz., kai kuriais metalais) ir medžiagomis, kurių yra visur aplinkoje.

([2]) Jei pirmojo laipsnio kinetika aiškiai netinka, reikėtų taikyti sudėtingesnius modelius (žr. 5 priedėlio nuorodas) ir klausti biologinės statistikos specialisto patarimo.

([3]) Atliekant biologinio koncentravimo bandymą, sugertį gali riboti maža veikimo koncentracija dėl mažo tirpumo vandenyje, o taikant mitybos bandymą, galima pasiekti gerokai didesnes koncentracijos vertes.

▼M7

biologinio koncentravimo. Todėl, siekiant sumažinti šį medžiagų su dideliu lipofiliškumu (t. y. kurių log K_{OW} > 3) bandymų rezultatų kintamumo šaltinį, biologinį koncentravimą, gautą tiesiogiai atliekant tyrimą, papildomai reikėtų išreikšti kaip normalizuotą 5 % lipidų (viso šlapios kūno masės atžvilgiu) turinčiai žuviai. Tai yra būtina siekiant turėti galimybę tarpusavyje palyginti skirtingoms cheminėms medžiagoms ir (arba) bandymų rūšims gautus rezultatus. Skaičius – 5 % lipidų kiekiui buvo plačiai taikomas, nes jis atitinka bandymo metode dažniausiai naudojamų žuvų vidutinį lipidų kiekį (21).

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

Be įvade (3 pastraipa) pateiktų bandomosios cheminės medžiagos savybių, kita reikiama informacija yra toksiškumas žuvų rūšims, kurios turi būti naudojamos atliekant bandymus, pageidautina asimptotinė LC_{50} (t. y. nuo laiko nepriklausanti), ir (arba) toksiškumas, įvertintas atliekant ilgalaikius žuvų bandymus (pvz., C.47 (22), C.15 (23), C.14 (24) bandymų metodai).

Reikėtų turėti tinkamą žinomo tikslumo, preciziškumo ir jautrio analizės metodą cheminei medžiagai kiekybiškai nustatyti bandymo tirpaluose ir biologinėje medžiagoje, kartu su ėminių ruošimo ir laikymo duomenimis. Taip pat reikėtų žinoti bandomosios cheminės medžiagos kiekybinio analizinio nustatymo vandenyje ir žuvų audiniuose ribą. Jei naudojama žymėtoji bandomoji cheminė medžiaga, ji turėtų būti kuo grynesnė (pvz., pageidautina > 98 %) ir turėtų būti žinoma su priemaišomis susijusio radioaktyvumo procentinė dalis.

BANDYMO TINKAMUMAS

Taikomos šios bandymo tinkamumo sąlygos:

vandens temperatūra turėtų kisti mažiau kaip ± 2 °C, nes didelis nukrypimas gali turėti įtakos su sugertimi ir apsivalymu susijusiems biologiniams parametrams, taip pat gali sukelti stresą gyvūnams;

ištirpusio deguonies koncentracija neturi sumažėti iki mažesnės nei 60 % soties koncentracijos;

bandomosios cheminės medžiagos koncentracija kamerose yra lygi sugerties tarpsnio metu išmatuotoms vidutinėms vertėms ± 20 %;

bandomosios cheminės medžiagos koncentracija yra mažesnė nei jos tirpumo vandenyje ribinė vertė, atsižvelgiant į tai, kad bandymo vanduo gali turėti įtakos faktiniam tirpumui ([1]);

kontrolinių ir apdorotų ėminių žuvų gaištamumas arba kiti neigiami reiškiniai ir (arba) susirgimai bandymo pabaigoje yra mažesni nei 10 %; jei bandymas pratęsiamas kelioms savaitėms ar mėnesiams, žūtis arba kiti neigiami reiškiniai abiejuose žuvų rinkiniuose turėtų būti mažesni nei 5 % per mėnesį ir ne didesni kaip 30 % apskritai. Reikšmingi vidutinio augimo skirtumai tarp bandymo ir kontrolinių grupių ėminiams paimtų žuvų galėtų būti bandomosios cheminės medžiagos toksinio poveikio rodiklis.

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

Būtų naudinga naudoti žinomos biologinio koncentravimo gebos ir mažo metabolizmo etalonines chemines medžiagas tikrinant bandymo procedūrą, kai reikia (pvz., kai laboratorija neturi ankstesnės bandymų patirties ar pakito Bandymo sąlygos).

([1]) Jei bandomos daugiakomponentės medžiagos, UVCB ir mišiniai, galbūt reikėtų nustatyti kiekvieno susijusio komponento tirpumą vandenyje, kad būtų nustatytos reikiamos veikimo koncentracijos vertės.

▼M7

METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

Reikia užtikrinti, kad visoms įrangos dalims gaminti nebūtų naudojamos medžiagos, kurios gali tirpti, sugerti arba išsiplauti ir turėti neigiamą poveikį žuvims. Galima naudoti stačiakampio arba ritinio formos standartines talpyklas, kurios būtų pagamintos iš chemiškai inertiškų medžiagų ir kurių tūris atitiktų įkrovos dydį (žr. 43 pastraipą). Minkšti plastikiniai vamzdžiai turi būti kuo mažiau naudojami. Reikėtų naudoti politetrafluoretileno, nerūdijančiojo plieno ir (arba) stiklinius vamzdžius. Patirtis parodė, kad bandant chemines medžiagas su dideliu sugerties koeficientu, pvz., sintetinius piretroidus, gali prireikti silanizuoto stiklo. Šiomis sąlygomis įrangą po naudojimo reikėtų išmesti. Prieš dedant bandymų organizmus, bandymų sistemas pageidautina veikti tokių koncentracijos verčių bandomąja chemine medžiaga, kurias numatoma naudoti atliekant tyrimą, ir taip ilgai, kad būtų galima įrodyti veikimo koncentracijos verčių stabilumą.

Vanduo

Bandymuose dažniausiai naudojamas gamtinis vanduo, jis turi būti imamas iš neužteršto ir vienodos kokybės šaltinio. Vis dėlto, atkurtasis vanduo (t. y. demineralizuotas vanduo su žinomu tam tikrų mitybinių medžiagų kiekiu) galbūt tiktų labiau, siekiant laikui bėgant užtikrinti vienodą kokybę. Skiedimo vanduo, t. y. vanduo, su kuriuo bandomojo cheminė medžiaga maišoma prieš ją dedant į bandymo indą (žr. 30 pastraipą), turėtų būti tokios kokybės, kuri užtikrintų pasirinktų žuvų rūšių išgyvenamumą aklimatizavimo ir bandymo laikotarpiais, nepasireiškiant jokiems neįprastiems jų išvaizdos ar elgesio pokyčiams. Būtų gerai įrodyti, kad bandomosios rūšys skiedimo vandenyje gali išlikti, augti ir daugintis (pvz., laboratorinėje kultūroje arba atliekant gyvavimo ciklo trukmės toksiškumo bandymą). Skiedimo vandenį reikėtų apibūdinti nurodant bent pH vertę, kietumą, suminį kietųjų dalelių kiekį, suminį organinės anglies kiekį (TOC ([1])), taip pat būtų gerai nurodyti amonio bei nitrito jonų kiekį bei šarmingumą, o jūros žuvų rūšims – druskingumą. Parametrai, kurie būtų svarbūs žuvų optimaliai gerovei, nėra visiškai žinomi, tačiau 1 priedėlyje pateiktos kelių gėlo ir jūros vandens komponentų rekomenduojamos didžiausios koncentracijos vertės.

Skiedimo vanduo turėtų būti pastovios kokybės visą bandymo laikotarpį. pH vertė turėtų būti 6,0–8,5 intervale, tačiau atliekant tam tikrą bandymą, ji galėtų kisti ne daugiau kaip ± 0,5 pH vieneto. Siekiant užtikrinti, kad skiedimo vanduo per daug neturėtų įtakos bandymo rezultatui (pvz., sudarydamas kompleksinius junginius su bandomąja chemine medžiaga) arba neigiamai veiktų žuvų būrio elgesį, ėminius reikėtų imti analizei per tam tikrus laiko tarpus, bent jau bandymo pradžioje ir pabaigoje. Pagrindinių sunkiųjų metalų anijonų ir katijonų (pvz., Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} ir SO_4^{2-}), pesticidų (pvz., fosforo organinių ir chloro organinių pesticidų suminio kiekio), suminio organinės anglies kiekio ir suspenduotų kietųjų dalelių analizė turėtų būti atliekama, pvz., kas tris mėnesius, jei žinoma, kad skiedimo vandens kokybė yra gana pastovi. Jei buvo įrodyta, kad skiedimo vandens kokybė buvo pastovi bent metus, analizė gali būti daroma ne taip dažnai, o tarpai padidinti (pvz., kas šešis mėnesius).

Natūralus kietųjų dalelių kiekis, taip pat suminės organinės anglies (TOC) kiekis skiedimo vandenyje turėtų būti kuo mažesnis, kad būtų išvengta bandomosios cheminės medžiagos adsorbcijos ant organinės medžiagos, dėl ko gali sumažėti bandomosios cheminės medžiagos biologinis įsisavinamumas, todėl būtų gautas

([1]) TOC sudaro dalelių organinė anglis ir ištirpusi organinė anglis, t. y. TOC = POC + DOC.

▼M7

per mažas BCF įvertis. Didžiausias leidžiamas kietųjų dalelių kiekis yra 5 mg/l (sausos medžiagos, sulaikomos 0,45 μm filtru), o suminės organinės anglies kiekis – 2 mg/l (žr. 2 priedėlį). Jei reikia, prieš naudojant skiedimo vandenį reikėtų filtruoti. Bandymų žuvų (ekskrementų) ir maisto likučių bandymo vandenyje indėlis į organinės anglies kiekį turėtų būti kuo mažesnis (žr. 46 pastraipą).

Bandymų tirpalai

Ruošiamas reikiamos koncentracijos bandomosios cheminės medžiagos pradinis tirpalas. Pradinį tirpalą geriausiai būtų ruošti bandomąją cheminę medžiagą tiesiog maišant arba plakant skiedimo vandenyje. Kaip tinkama alternatyva kartais galėtų būti naudojama kietosios fazės desorbcijos dozavimo sistema. Naudoti tirpiklius arba dispergentus (soliubilizavimo agentus) paprastai nerekomenduojama (žr. (25)); tačiau juos leidžiama naudoti tinkamos koncentracijos pradiniam tirpalui gauti, bet reikėtų dėti visas pastangas tokių medžiagų naudojimui sumažinti, o jų ribinė micelių koncentracija neturėtų būti viršyta (jei tinka). Tirpikliai, kuriuos būtų galima naudoti, yra acetonas, etanolis, metanolis, dimetilformamidas ir trietilenglikolis; naudoti dispergentai yra Tween 80, metilceliuliozės 0,01 % tirpalas ir HCO-40. Tirpiklio koncentracija visų apdorotų ėminių galutinėje bandymų terpėje turėtų būti vienoda (t. y. neatsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją) ir neturėtų būti didesnė nei atitinkamos toksiškumo ribinės vertės, nustatytos tirpikliui Bandymo sąlygomis. Maksimali koncentracija – 100 mg/l (arba 0,1 ml/l). Maža tikimybė, kad 100 mg/l koncentracijos tirpiklis reikšmingai pakeistų ištirpusios bandomosios cheminės medžiagos maksimalią koncentraciją, kurią būtų galima pasiekti terpėje (25). Reikėtų žinoti, kokią viso organinės anglies kiekio bandymų vandenyje dalį sudaro tirpiklis (kartu su bandomąja chemine medžiaga). Suminės organinės anglies koncentracija bandymų induose visą bandymo laiką neturėtų viršyti bandomosios cheminės medžiagos ir tirpiklio ar soliubilizavimo agento ([1]), jei naudojamas, anglies koncentracijos daugiau kaip 10 mg/l (± 20 %) Organinės medžiagos koncentracija gali daryti reikšmingą įtaką laisvai ištirpintos bandomosios cheminės medžiagos kiekiui atliekant dinaminius žuvų bandymus, ypač – labai lipofilinių medžiagų. Mikroekstrahavimas kietąja faze (žr. 60 pastraipą) gali suteikti svarbios informacijos apie santykį tarp sujungtų ir laisvai ištirpintų junginių, iš kurių pastarieji, kaip manoma, ir yra biologiškai įsisavinama frakcija. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracija turėtų būti mažesnė nei jos tirpumo bandymų terpėje ribinė koncentracija, neatsižvelgiant į tirpiklio ar soliubilizavimo agento naudojimą. Naudojant lengvai biologiškai skaidžius tirpiklius, reikėtų imtis priemonių, kad neatsirastų problemų dėl bakterijų augimo atliekant dinaminius bandymus. Jei pradinio tirpalo neįmanoma paruošti nenaudojant soliubilizavimo agento, reikėtų atsižvelgti į tai, ar nebūtų tikslinga vietoj veikimo per vandeninę terpę tyrimo atlikti mitybos bandymo.

Atliekant dinaminius bandymus reikia turėti sistemą, kuri nuolat dozuoja ir skiedžia bandomosios cheminės medžiagos (pvz., dozavimo siurblį, proporcinį skiestuvą, sotintuvo sistemą), arba kietosios fazės desorbcijos dozavimo sistemą reikiamoms bandymo koncentracijos vertėms bandymų kamerose gauti. Pageidautina, kad bandymo kamerų tūris pasikeistų per parą ne mažiau kaip penkis kartus. Pirmenybė teikiama dinaminiam režimui, tačiau jei jis neįmanomas (pvz., kai tai kenkia bandymo organizmams), galima taikyti pusiau statinį metodą, jei jis atitinka tinkamumo kriterijus (žr. 24 pastraipą). Pradinio tirpalo ir skiedimo vandens srautas turi būti tikrinamas 48 h prieš bandymą ir vėliau bent kasdien visą bandymo laiką. Tikrinant nustatomas srautas per kiekvieną kamerą ir užtikrinama, kad kameroje arba tarp kamerų srautas nesiskirtų daugiau kaip 20 %.

([1]) Nors tai paprastai nerekomenduojama, jei yra naudojamas tirpiklis ar soliubilizavimo agentas, iš šio agento gautą organinės anglies kiekį reikėtų sudėti su bandomosios cheminės medžiagos organinės anglies kiekiu, kad būtų įvertinta organinės anglies koncentracija bandymų induose.

▼M7

Rūšių parinkimas

Pasirenkant rūšis svarbu yra tai, ar jas lengva gauti, ar jas galima gauti tinkamų matmenų ir ar galima tinkamai prižiūrėti laboratorijoje. Kitus žuvų rūšių atrankos kriterijus sudaro rekreacinė, komercinė, ekologinė svarba, taip pat palyginamas jautris, sėkmingas naudojimas praeityje ir kt. Rekomenduojamos žuvų rūšys nurodytos 3 priedėlyje. Galima naudoti kitas rūšis, tačiau tinkamoms bandymo sąlygoms užtikrinti gali tekti keisti bandymų procedūrą. Šiuo atveju ataskaitoje reikėtų pagrįsti rūšies pasirinkimą ir bandymo metodą. Apskritai, naudojant mažesnių žuvų rūšis trumpėja laikas, per kurį pasiekiama nuostovioji būsena, bet gali prireikti daugiau žuvų (ėminių), kad būtų galima tinkamai atlikti lipidų kiekio analizę ir cheminės medžiagos koncentraciją žuvyje. Be to, yra tikimybė, kad kvėpavimo spartos ir metabolizmo skirtumai tarp jaunų ir vyresnio amžiaus žuvų gali trukdyti palyginti skirtingų bandymų ir skirtingoms rūšims gautus rezultatus. Reikėtų pažymėti, kad bandant žuvų rūšis jų spartaus augimo (jauniklių) laikotarpiu, gali būti sunkiau aiškinti duomenis.

Žuvų laikymas (atsižvelgiant į veikimą per vandeninę terpę ir mitybą)

Pradinė populiacija bent dvi savaites aklimatizuojama vandenyje (žr. 28 pastraipą) bandymų temperatūroje ir visą laiką pakankamai maitinama (žr. 45 pastraipą). Vanduo ir maistas turėtų atitikti naudojamus atliekant bandymą.

Po 48 h stabilizacijos laikotarpio, registruojamas gaištamumas ir taikomi tokie kriterijai:

— jei populiacijos gaištamumas per septynias paras yra didesnis kaip 10 %, visa partija atmetama;

— jei populiacijos gaištamumas per septynias paras 5–10 %, aklimatizuojama dar septynias paras ir, jei gaištamumas per kitas septynias paras didesnis kaip 5 %, visa partija atmetama;

— jei populiacijos gaištamumas per septyniais paras yra mažesnis kaip 5 %, partija priimama.

Bandymams atlikti naudojamos žuvys neturėtų turėti pastebimų ligų ir išsigimimų. Visas ligotas žuvis reikėtų atmesti. Dvi savaites prieš bandymą ir visą bandymo laiką žuvys neturėtų būti gydomos vaistais.

BANDYMO EIGA

Parengiamasis bandymas

Gali būti naudinga atlikti parengiamąjį bandymą, kad būtų galima optimizuoti galutinio bandymo sąlygas, pvz., pasirinkti bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertę (-es) ir sugerties bei apsivalymo tarpsnių trukmę, arba nustatyti, ar reikia atlikti viso masto bandymą. Parengiamojo bandymo schema turėtų būti tokia, kad būtų galima gauti reikiamą informaciją. Būtų galima aptarti, ar BCF gauti pakaktų supaprastinto bandymo ar reikia atlikti viso masto tyrimą (žr. 83–95 pastraipas apie supaprastintą bandymą).

Veikimo sąlygos

Sugerties tarpsnio trukmė

Sugerties tarpsnio trukmę galima prognozuoti atsižvelgiant į praktinę patirtį (pvz., iš ankstesnio panašios struktūros cheminės medžiagos sugerties tyrimo) arba pagal tam tikras empirines priklausomybes, naudojant bandomosios cheminės medžiagos tirpumo vandenyje arba pasiskirstymo tarp oktanolio ir vandens koeficiento duomenis (jei sugertis vyksta pagal pirmojo laipsnio kinetiką, žr. 5 priedėlį).

▼M7

Sugerties tarpsnis turėtų trukti 28 paras, nebent galima įrodyti, kad nuostovioji būsena pasiekiama anksčiau (žr. 1 priedėlį, *Apibrėžtys ir vienetai*). Nuostovioji būsena pasiekiama, kai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos žuvyje (C_f) ir laiko priklausomybės kreivė tampa lygiagreti su laiko ašimi, kai bent kas dvi paras paimtų ėminių trijų nuoseklių C_f analizės rezultatai skiriasi ne daugiau kaip ± 20 % ir nėra reikšmingo C_f padidėjimo tarp pirmosios ir paskutinės nuoseklios analizės. Kai analizuojami jungtiniai ėminiai, reikia atlikti ne mažiau kaip keturias nuoseklias analizes. Jei bandomųjų cheminių medžiagų sugertis vyksta lėtai, labiau tiktų septynių parų intervalai. Jei nuostovioji būsena nebuvo pasiekta per 28 paras, BCF apskaičiuojamas taikant tik kinetinį metodą, kuris nėra pagrįstas pasiekiama nuostoviąja būsena, arba sugerties tarpsnį galima pratęsti atliekant papildomus matavimus tol, kol pasiekiama nuostovioji būsena, arba iki 60 parų, jei tai trumpiau. Be to, bandomosios cheminės medžiagos koncentracija žuvyje sugerties tarpsnio pabaigoje turi būti pakankamai didelė, kad būtų galima užtikrinti patikimą apsivalymo tarpsnio k_2 įvertį. Jei po 28 parų reikšmingos sugerties nėra, bandymą galima nutraukti.

Apsivalymo tarpsnio trukmė

Jei cheminių medžiagų apsivalymas vyksta pagal pirmojo laipsnio kinetiką, pusės sugerties tarpsnio trukmės paprastai pakanka, kad kūno sugertos cheminės medžiagos kiekis sumažėtų iki atitinkamos vertės (pvz., 95 %) (žr. 5 priedėlį dėl šio įverčio aiškinimo). Jei laikas 95 % netekčiai gauti yra praktiškai per ilgas ir, pvz., yra dvigubai ilgesnis nei įprastinė sugerties tarpsnio trukmė (t. y. ilgiau kaip 56 paros), galima naudoti trumpesnį laikotarpį (pvz., kai bandomosios cheminės medžiagos koncentracija yra mažesnė nei 10 % nuostoviosios būsenos koncentracijos). Tačiau ilgesnių apsivalymo tarpsnių gali prireikti cheminėms medžiagoms, turinčioms sudėtingesnį modelį, nei žuvims taikomas vienos aplinkos terpės sugerties ir apsivalymo modelis, kuris atitinka pirmojo laipsnio kinetiką. Jei yra stebimi ir (arba) numanomi tokie sudėtingi modeliai, reikėtų klausti biologinės statistikos ir (arba) farmakologinės kinetikos specialisto patarimo tinkamai bandymo schemai užtikrinti. Jei apsivalymo tarpsnis pratęsiamas, ribojančiu veiksniu gali tapti ėminiams imamų žuvų skaičius, o įtaką rezultatams gali daryti žuvų augimo skirtumai. Tačiau tarpsnio trukmę taip pat lems laikotarpis, kurį bandomosios cheminės medžiagos koncentracija žuvyse yra didesnė nei analizės kiekybinio nustatymo riba.

Bandymo žuvų skaičius

Vienai bandymo koncentracijai imamas toks žuvų skaičius, kad kiekvienam ėminiui tektų ne mažiau kaip keturios žuvys. Žuvis galima sujungti į vieną grupę tik tada, jei pavienių žuvų analizė neįmanoma. Jei numatoma gauti geresnį kreivių priderinimo (ir išvestų parametrų) tikslumą arba reikia atlikti metabolizmo tyrimus (pvz., atskirti metabolitus ir pradinę cheminę medžiagą, kai naudojamos žymėtosios bandomosios cheminės medžiagos), vienam ėminiui prireiks daugiau žuvų. Lipidų kiekį reikėtų nustatyti toje pačioje biologinėje medžiagoje, kurioje nustatoma bandomosios cheminės medžiagos koncentracija. Jei tai būtų neįmanoma, gali prireikti papildomų žuvų (žr. 56 ir 57 pastraipas).

Jei naudojamos suaugusios (t. y. lytiškai subrendusios) žuvys, prieš bandymą ar bandymo metu jos neturėtų būti neršto būsenos ar neseniai išleidusios ikrus (t. y. jau po neršto). Taip pat ataskaitoje reikėtų pateikti duomenis, ar atliekant bandymą buvo naudojami vyriškos ar moteriškos lyties ar abiejų lyčių žuvys. Jei naudojamos abiejų lyčių žuvys, reikėtų pateikti dokumentus, kurie rodytų nereikšmingus augimo ir lipidų kiekio skirtumus veikimo pradžioje, ypač jei numatoma, kad prireiks sujungti vyriškos ir moteriškos lyties žuvis aptinkamai cheminės medžiagos koncentracijai ir (arba) lipidų kiekiui užtikrinti.

▼M7

Kiekvienam atskiram bandymui parenkamos panašios masės žuvys, kad mažiausių žuvų masė būtų ne mažesnė kaip du trečdaliai didžiausios žuvies masės. Visos žuvys turėtų būti tų pačių metų ir iš to paties šaltinio. Kadangi masė ir amžius gali daryti reikšmingą įtaką BCF vertėms (12), šie duomenys turėtų būti tiksliai registruojami. Prieš pat bandymų pradžią rekomenduojama pasverti žuvų būrio poėminį, kad būtų gauta vidutinė masė (žr. 61 pastraipą).

Įkrova

Reikėtų naudoti didelius vandens ir žuvų kiekio santykius, kad dėl žuvų pridėjimo bandymo pradžioje kuo mažiau sumažėtų bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, taip pat būtų išvengta ištirpusio deguonies koncentracijos mažėjimo. Svarbu, kad įkrovos dydis atitiktų naudojamą bandymų rūšį. Bet kuriuo atveju paprastai rekomenduojamas įkrovos dydis yra 0,1–1,0 g žuvies (šlapios kūno masės) litrui vandens per parą. Galima naudoti didesnio žuvų ir vandens santykio įkrovas, jei žinoma, kad reikiamą bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją įmanoma užtikrinti ± 20 % tikslumu ir kad ištirpusio deguonies koncentracija nesumažėja daugiau kaip iki 60 % soties koncentracijos (žr. 24 pastraipą).

Pasirenkant tinkamus įkrovos režimus, atsižvelgiama į žuvų rūšies įprastosios gyvenimo aplinkos sąlygas. Pvz., dugne gyvenančioms žuvims tam pačiam vandens tūriui gali būti reikalingas didesnis akvariumo dugno plotas nei jūros žuvų rūšims.

Maitinimas

Aklimatizavimo ir bandymo laikotarpiu žuvys maitinamos tinkamu maistu, kurio lipidų ir baltymų suminis kiekis yra žinomas ir kurio pakanka, kad žuvys būtų sveikos ir būtų palaikoma jų kūno masė (galimas nedidelis augimas). Maitinama kasdien visą aklimatizavimo ir bandymo laikotarpį duodant nustatytą kiekį priklausomai nuo naudojamos rūšies, Bandymo sąlygų ir maisto energinės vertės (pvz., vaivorykštiniam upėtakiui per parą duodama nuo 1 iki 2 % kūno masės). Maisto norma turėtų būti parinkta taip, kad būtų išvengta greito augimo ir didelio lipidų kiekio padidėjimo. Siekiant užtikrinti tą pačią maisto normą, jo kiekis turėtų būti iš naujo apskaičiuojamas, jei reikia, pvz., vieną kartą per savaitę. Šiam apskaičiavimui atlikti žuvų masę kiekvienoje kameroje galima įvertinti pagal neseniai iš šios kameros ėminiams paimtų žuvų masę. Nereikia sverti kameroje likusių žuvų.

Nesuėstą maistą ir išmatas reikėtų išsiurbti iš kameros kasdien, netrukus po maitinimo (nuo 30 min iki vienos valandos). Kameros visą bandymų trukmę turėtų būti kiek įmanoma švarios, kad organinių medžiagų koncentracija būtų kuo mažesnė (žr. 29 pastraipą), nes organinės anglies buvimas gali riboti bandomosios cheminės medžiagos biologinį įsisavinamumą (12).

Kadangi dauguma maisto gaunama iš žuvų miltų, reikėtų užtikrinti, kad maistas neturėtų įtakos bandymų rezultatams arba nebūtų jokių nepageidaujamų reiškinių, pvz., dėl pesticidų, sunkiųjų metalų ir (arba) pačios bandomosios cheminės medžiagos (pėdsakų) buvimo.

Šviesa ir temperatūra

Rekomenduojama 12–16 h šviesiojo laikotarpio trukmė, o temperatūra (± 2 °C) turėtų atitikti bandymo rūšį (žr. 3 priedėlį). Reikėtų žinoti apšvietimo tipą ir jo charakteristikas. Reikėtų atkreipti dėmesį į galimą bandomosios cheminės medžiagos fotocheminį virsmą tyrimo metu naudoto apšvietimo sąlygomis. Reikėtų naudoti tinkamą apšvietimą ir vengti žuvis veikti negamtiniais fotocheminio virsmo produktais. Kai kuriais atvejais galbūt tiktų filtras, kuris nepraleistų trumpesnio nei 290 nm bangos ilgio UV spinduliuotę.

▼M7

Bandymų koncentracijos vertės

Bandymas iš pradžių buvo sumanytas nepolinėms organinėms medžiagoms. Manoma, kad šio tipo cheminėms medžiagos pakaktų žuvų paveikimo vienos vertės koncentracija, nes nesitikima jos poveikio, nors, atsižvelgiant į atitinkamą reglamentavimo sistemą, gali prireikti dviejų koncentracijos verčių. Jei bandomos kitokio tipo cheminės medžiagos arba yra duomenų apie galimą priklausomybę nuo koncentracijos, bandymą reikėtų atlikti naudojant dvi koncentracijos vertes arba daugiau. Jei bandoma tik viena koncentracija, reikėtų pagrįsti tokios koncentracijos pasirinkimą (žr. 79 pastraipą). Be to, bandoma koncentracija turėtų būti praktiškai ar techniškai kuo mažesnė (t. y. toliau nuo tirpumo ribinės koncentracijos).

Kai kuriais atvejais galima numanyti, kad cheminės medžiagos biologinis koncentravimas priklauso nuo koncentracijos vandenyje (pvz., metalų, kurių sugertis žuvimis gali būti bent iš dalies reguliuojama). Tokiu atveju būtina bandyti bent dvi, bet geriau daugiau koncentracijos verčių (žr. 49 pastraipą), kurios atitinka aplinkos sąlygas. Be to, jei dėl praktinių priežasčių cheminės medžiagos bandomos koncentracijos vertės yra arti tirpumo ribinės koncentracijos, rekomenduojama bandyti esant bent dviem koncentracijos vertėms, nes taip būtų galima susidaryti vaizdą apie veikimo koncentracijos verčių patikimumą. Reikėtų pasirinkti bandymo koncentracijos vertes, kurios aprėptų faktines aplinkos sąlygas atitinkančias vertes, taip pat koncentraciją, kuri atitiktų specifinio vertinimo tikslą.

Pasirinkta (-os) bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertė (-ės) turėtų būti mažesnė (-ės) nei lėtinio poveikio koncentracija arba lygi 1 % ūmaus poveikio asimptotinės LC_{50}, atitikti su aplinka susijusį intervalą ir būti bent viena eile didesnė nei taikomo analizės metodo kiekybinio nustatymo vandenyje riba. Didžiausią leidžiamą koncentraciją taip pat galima nustatyti, ūmaus poveikio 96 h LC_{50} padalijus iš atitinkamo ūmaus ir lėtinio poveikio koncentracijos santykio (pvz., kai kurių cheminių medžiagų reikiamas santykis yra didesnis kaip trys, bet keli yra didesni kaip 100). Jei naudojama antroji koncentracija, ji turėtų dešimt kartų skirtis nuo pirmosios. Jei tai neįmanoma atsižvelgiant į toksiškumo kriterijų (kuris riboja viršutinę bandymo koncentraciją) ir analizinio nustatymo ribą (ji nustato apatinę bandymo koncentraciją), galima naudoti mažesnį nei dešimt daugiklį ir reikėtų atsižvelgti į galimybę naudoti žymėtąją bandomąją cheminę medžiagą (didžiausio grynumo, pvz., pageidautina > 98 %). Reikėtų užtikrinti, kad nei viena naudota koncentracija nebūtų didesnė nei bandomosios cheminės medžiagos tirpumo bandymo terpėje ribinė koncentracija.

Kontroliniai ėminiai

Be bandomosios cheminės medžiagos serijos reikėtų bandyti vieną vandens kontrolinį ėminį arba, jei tinka (žr. 30 ir 31 pastraipas), vieną tirpiklio turintį kontrolinį ėminį.

Vandens kokybės matavimo dažnumas

Bandymo metu bandymo ir kontroliniuose induose reikėtų matuoti ištirpusį deguonį, TOC, pH ir temperatūrą. Reikėtų išmatuoti kontrolinio (-ių) ėminio (-ių) suminį kietumą ir druskingumą (jei tinka) ir tai daryti viename inde. Jei bandomos dvi koncentracijos vertės arba daugiau, šie parametrai matuojami didesnei (arba didžiausiai) koncentracijai. Reikėtų matuoti bent jau ištirpusį deguonį ir druskingumą (jei tinka), ir sugerties tarpsniu tai daryti tris kartus – pradžioje, maždaug per vidurį ir pabaigoje, o apsivalymo tarpsniu – kartą per savaitę. TOC reikėtų matuoti bandymo pradžioje (24 h ir 48 h iki bandymo sugerties tarpsnio pradžios) prieš dedant žuvis ir bent kartą per savaitę sugerties ir apsivalymo tarpsnių metu. Temperatūrą reikėtų matuoti ir registruoti kasdien, pH – kiekvieno tarpsnio pradžioje ir pabaigoje, o kietumą – kartą bandymo metu. Temperatūrą bent viename inde reikėtų kontroliuoti nuolat.

▼M7

Žuvų bei vandens ėminių ėmimas ir analizė

Žuvų ir vandens ėminių ėmimo tvarkaraštis

Vandens ėminius iš bandymo kamerų bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatyti reikėtų imti prieš dedant žuvis ir sugerties bei apsivalymo tarpsnių metu. Vandens ėminius reikėtų imti prieš maitinimą, tuo pačiu metu, kai imami žuvų ėminiai. Gali būti naudinga ėminius imti dažniau, kad būtų užtikrintos stabilios koncentracijos vertės įdėjus žuvis. Sugerties tarpsnio metu reikėtų matuoti bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją, kad būtų galima patikrinti atitikti tinkamumo kriterijams (24 pastrapa). Jei, atliekant vandens ėminių analizę apsivalymo tarpsnio pradžioje nepavyksta aptikti bandomosios cheminės medžiagos, tai galima būtų naudoti kaip įrodymą, kad visą likusį apsivalymo tarpsnio laiką nereikia analizuoti bandymo ir kontrolinių ėminių vandens bandomajai cheminei medžiagai nustatyti.

Žuvų ėminius bandomajai cheminei medžiagai nustatyti reikėtų imti bent penkis kartus sugerties tarpsniu ir ne mažiau kaip keturis kartus apsivalymo tarpsniu. Kadangi turint tokį ėminių skaičių kartais bus sunku gauti pakankamai tikslų BCF vertės įvertį (ypač kai yra požymių, kad sugerties ir apsivalymo kinetika nėra vien tik paprasto pirmojo laipsnio), būtų patartina ėminius imti dažniau abiem tarpsniais (žr. 4 priedėlį).

Lipidų kiekį reikėtų nustatyti bent jau sugerties tarpsnio pradžioje ir pabaigoje ir apsivalymo tarpsnio pabaigoje, jį nustatant toje pačioje biologinėje medžiagoje, kuri naudojama bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatyti. Jei tai būtų neįmanoma, reikėtų atskirai paimti bent tris žuvis lipidų kiekiui nustatyti kiekvienu nurodytu laiko momentu. Žuvų skaičius vienam indui bandymo pradžioje turėtų būti atitinkamai pakoreguotas ([1]). Arba, jei kontrolinio ėminio žuvyje (t. y. pradinės populiacijos žuvyje) nebuvo aptikta reikšmingų bandomosios cheminės medžiagos kiekių, bandymo kontrolinio ėminio žuvis gali būti analizuojama tik lipidų kiekiui nustatyti, o bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos bandymų grupės (-ių) žuvyse (ir susijusių sugerties greičio konstantos, apsivalymo greičio konstantos ir BCF verčių) pataisa gali būti daroma, atsižvelgiant į kontrolinės grupės lipidų kiekio pokyčius bandymo metu ([2]).

Negyvos ar ligotos žuvys neturėtų būti analizuojamos bandomosios cheminės medžiagos ar lipidų koncentracijai nustatyti.

Tinkamo ėminių ėmimo tvarkaraščio pavyzdys pateiktas 4 priedėlyje. Kitus tvarkaraščius būtų galima nesunkiai apskaičiuoti, naudojant kitas numatytas K_{OW} vertes skaičiuojant veikimo trukmę, atitinkančią 95 % sugertį (skaičiavimai pateikti 5 priedėlyje).

Ėminius reikėtų imti sugerties tarpsnio metu tol, kol pasiekiama nuostovioji būsena (žr. 1 priedėlį, *Apibrėžtys ir vienetai*) arba baigiasi sugerties tarpsnis (po 28 ar 60 parų, žr. 37 ir 38 pastraipas). Prieš pradedant apsivalymo tarpsnį žuvis reikėtų pernešti į švarius indus.

Ėminių ėmimas ir ėminių ruošimas

Vandens ėminius analizei reikėtų imti, pvz., siurbiant juos vamzdžiais iš inertinės medžiagos, įstatytais į bandymo kameros vidurį. Filtravimu ar centrifugavimu ne visada pasiseka atskirti biologiškai neįsisavinamas ir įsisavinamas bandomosios cheminės medžiagos frakcijas. Jei taikomas atskyrimo metodas, bandymo ataskaitoje, atsižvelgiant į biologinio įsisavinamumo sunkumus (25), reikėtų visada

([1]) Jei lipidų kiekis nustatomas ne toje pačioje žuvyje kaip bandomoji cheminė medžiaga, žuvis turėtų būti bent jau tokios pačios masės ir (jei tinka) tos pačios lyties.

([2]) Ši alternatyva galioja tik jei visų bandomųjų grupių žuvys laikomos panašaus dydžio grupėse, jos ėminiams imamos pagal tą pačią schemą ir maitinamos tuo pačiu būdu. Tai užtikrina, kad visų grupių žuvys auga panašiai, jei bandoma koncentracija yra mažesnė nei toksinio intervalo koncentracija. Manoma, kad, jei žuvys auga panašiai, lipidų kiekis turėtų būti panašus. Kitoks augimas kontroliniame ėminyje rodytų cheminės medžiagos poveikį ir tyrimo rezultatai būtų netinkami.

▼M7

pagrįsti arba patvirtinti atskyrimo metodo tinkamumą. Visų pirma stipriai hidrofobinių cheminių medžiagų (t. y. cheminių medžiagų, kurių log K_{OW} > 5) (12) (26), galinčių adsorbuotis ant filtro matricos ar ant centrifugavimo indų, ėminiai neturėtų būti apdorojami tokiais būdais. Vietoj to reikėtų imtis priemonių, kad indai būtų kuo švaresni (žr. 46 pastraipą), o suminės organinės anglies kiekį reikėtų kontroliuoti sugerties ir apsivalymo tarpsnio metu (žr. 53 pastraipą). Siekiant išvengti galimų mažesnio biologinio įsisavinamumo problemų, mažai tirpių ir stipriai hidrofobinių cheminių medžiagų ėminius galima imti mikroekstrahavimo kietąja faze metodais.

Paimtos ėminiams žuvys turėtų būti numarinamos akimirksniu, naudojant tinkamiausią ir humanišką būdą (atliekant su visu žuvies kūnu susijusius matavimus, nereikėtų daryti jokių papildomų veiksmų, išskyrus plovimą vandeniu (žr. 28 pastraipą) ir paviršiaus džiovinimą). Žuvys sveriamos ir matuojamas jų visas ilgis ([1]) Kiekvienos žuvies atskirai išmatuotą masę ir ilgį reikėtų susieti su analizuojamos cheminės medžiagos koncentracija (ir lipidų kiekiu, jei taikoma), pvz., kiekvienai ėminio žuviai naudojant unikalų identifikavimo kodą.

Žuvis ir vandenį geriausiai analizuoti iškart po ėminio paėmimo, kad būtų išvengta irimo arba kitų nuostolių, ir apskaičiuoti apytikres sugerties bei apsivalymo greičio konstantas bandymo eigoje. Be to, atliekant analizę iškart, laiku nustatoma, kai pasiekiama gulsčioji sritis (nuostovioji būsena).

Jei analizė iš karto neįmanoma, ėminius reikėtų laikyti taikant reikiamus metodus. Prieš pradedant tyrimą, reikėtų gauti informaciją apie tinkamą konkrečios bandomosios cheminės medžiagos laikymo metodą, pvz., užšaldymą, laikymą 4 °C temperatūroje, ekstrahavimą ir kt. Laikymo trukmę reikėtų parinkti taip, kad būtų užtikrintas laikomos cheminės medžiagos patvarumas.

Analizės metodo kokybė

Kadangi visa bandymo procedūra iš esmės priklauso nuo bandomajai cheminei medžiagai nustatyti taikomo analizės metodo tikslumo, preciziškumo ir jautrio, bandymų keliu patikrinama, ar cheminės medžiagos analizės tikslumas ir atkuriamumas, taip pat bandomosios cheminės medžiagos atgavimo iš vandens ir žuvies laipsnis yra patenkinami taikant tam tikrą metodą. Tai turėtų būti parengiamųjų bandymų dalis. Taip pat patikrinama, ar bandomoji cheminė medžiaga neaptinkama naudojamame skiedimo vandenyje. Jei būtina, bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vandenyje ir žuvyse vertės, gautos atliekant bandymą, taisomos atsižvelgiant į atgavimo laipsnius ir kontrolinių ėminių fonines vertes. Žuvų ir vandens ėminius reikėtų visą laiką apdoroti taip, kad tarša ir nuostoliai (pvz., dėl adsorbcijos ėminių ėmimo įtaisu) būtų kuo mažesni.

Žuvų ėminių analizė

Jei bandant naudojamos žymėtosios medžiagos, galima nustatyti jų suminį kiekį (t. y. pradinę medžiagą ir metabolitus) arba ėminiai gali būti gryninami, kad pradinę medžiagą galima būtų analizuoti atskirai. Jei BCF reikia skaičiuoti pagal pradinę cheminę medžiagą, pagrindinius metabolitus reikėtų apibūdinti bent jau sugerties tarpsnio pabaigoje (žr. 6 pastraipą). Pagrindiniai metabolitai yra tie junginiai, kurie sudaro ≥ 10 % likučių žuvies audiniuose suminio kiekio, kurie sudaro ≥ 5 % dviejose gretimose ėminių ėmimo vietose, kurių kiekiai didėja sugerties tarpsnio metu ir kurių žinomas toksiškumas kelia susirūpinimą. Jei visos žuvies BCF pagal suminį žymėtųjų likučių kiekį yra ≥ 500, būtų galima patarti, o dėl tam tikrų kategorijų cheminių medžiagų, pvz., pesticidų, primygtinai

([1]) Be masės reikėtų registruoti visą ilgį, nes ilgio padidėjimo palyginimas bandymo metu yra geras neigiamo poveikio buvimo rodiklis.

▼M7

rekomenduoti identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti svarbiausius metabolitus. Tokių metabolitų kiekybinio nustatymo gali reikalauti kai kurios priežiūros institucijos. Jei žuvų audiniuose identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti irimo produktai sudaro ≥ 10 % suminio žymėtųjų likučių kiekio, juos taip pat rekomenduojama identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti bandymo vandenyje. Jei nustatymas būtų neįmanomas, tai reikėtų paaiškinti bandymo ataskaitoje.

Bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją paprastai reikėtų nustatyti kiekvienoje atskirai pasvertoje žuvyje. Jei tai neįmanoma, kiekvienu atskiro ėmimo atveju paimti ėminiai gali būti sujungti, bet sujungimas riboja statistines procedūras, kurias būtų galima taikyti duomenims, todėl bandymui reikėtų paimti reikiamą žuvų skaičių, kad būtų galima užtikrinti norimą sujungimą, statistinę procedūrą ir galią. Kaip įvadą į atitinkamas sujungimo procedūras galima naudoti (27) ir (28) nuorodas.

Be vertės, gautos tiesiogiai atliekant tyrimą (žr. 21 pastraipą), BCF reikėtų išreikšti kaip normalizuotą žuviai, turinčiai 5 % lipidų (pagal šlapią kūno masę), nebent būtų galima įrodyti, kad ne lipidai sukaupia didžiausią bandomosios cheminės medžiagos kiekį. Jei įmanoma, žuvies lipidų kiekį reikėtų nustatyti kiekvienu ėminių ėmimo atveju ir pageidautina tame pačiame ekstrakte, kuris buvo gautas bandomajai cheminei medžiagai analizuoti, nes, prieš atliekant jo chromatografinę analizę, lipidus iš ekstrakto dažnai tenka pašalinti. Tačiau bandomųjų cheminių medžiagų analizei dažnai yra būtinos specifinės ekstrahavimo procedūros, kurios galėtų neatitikti lipidams nustatyti taikomų bandymo metodų. Šiuo atveju (iki bus sukurti tinkami neardomieji instrumentiniai metodai), rekomenduojama taikyti kitą žuvų lipidų kiekio nustatymo strategiją (žr. 56 pastraipą). Reikėtų taikyti tinkamus lipidų kiekio nustatymo metodus (20). Kaip standartinį metodą galima rekomenduoti (30) ekstrahavimo chloroformu ir metanoliu metodą (29), bet kaip alternatyvus metodas rekomenduojamas Smedes metodas (31). Pastarasis metodas pasižymi palyginamu ekstrahavimo efektyvumu, dideliu tikslumu, mažesnio toksiškumo organinių tirpiklių naudojimu ir atlikimo patogumu. Būtų galima taikyti kitus tinkamai pagrįstus metodus, kurių tikslumas palankiai skiriasi nuo rekomenduojamų metodų tikslumo. Svarbu pateikti taikomo metodo duomenis.

Žuvų augimo matavimas

Bandymo pradžioje atskirai pasveriama nuo penkių iki dešimties pradinės populiacijos žuvų ir išmatuojamas jų visas ilgis. Tai gali būti tos pačios žuvys, kurios būtų naudojamos lipidų analizei (žr. 56 pastraipą). Prieš atliekant cheminės medžiagos ar lipidų analizę, kiekvienu atskiro ėminių ėmimo atveju reikėti išmatuoti bandymo ir kontrolinių grupių žuvų masę ir ilgį. Šių ėminiams paimtų žuvų matavimai taip pat gali būti naudojami bandymo ir kontroliniuose induose likusių žuvų masei ir ilgiui įvertinti (žr. 45 pastraipą).

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

Bandomosios cheminės medžiagos sugerties kreivę aritmetinėje skalėje reikėtų gauti bandymu nustatytą koncentraciją žuvyje arba jos paviršiuje (arba tam tikruose audiniuose) pateikiant kaip laiko funkciją. Jei kreivė pasiekė gulsčiąją sritį, t. y. tapo maždaug asimptotinė laiko ašiai, nuostoviosios būsenos BCF (BCF_{SS}) reikėtų apskaičiuoti taip:

$$\frac{C_f \text{esant nuostoviajai būsenai} (\text{vidurkis})}{C_w \text{esant nuostoviajai būsenai} (\text{vidurkis})}$$

▼M7

C_f kitimui įtakos gali turėti žuvų augimas (žr. 72 ir 73 pastraipas). Vidutinei veikimo koncentracijai (C_w) įtaką daro jos kitimas laikui bėgant. Galima tikėtis, kad laikinė svertinė vidutinė koncentracija yra tinkamesnė ir tikslesnė vertė atliekant biologinio kaupimosi tyrimus, net jei kitimas atitinka reikiamą tinkamumo intervalą (žr. 24 pastraipą). Koncentracijos vandenyje laikinis svertinis vidurkis (LSV) gali būti apskaičiuotas pagal 5 priedėlio 1 skirsnį.

Kinetinį biologinio koncentravimo faktorių (BCF_K) reikėtų nustatyti kaip dviejų pirmojo laipsnio kinetikos greičio konstantų k_1/k_2 santykį. Greičio konstantas k_1 ir k_2 bei BCF_K galima išvesti atliekant vienalaikį sugerties ir apsivalymo tarpsnių vertinimą. Arba k_1 ir k_2 gali būti nustatytos nuosekliai (žr. 5 priedėlį, kuriame šie metodai aprašyti ir palyginti). Apsivalymo greičio konstantai (k_2) gali tekti daryti praskiedimo dėl augimo pataisą (žr. 72 ir 73 pastraipas). Jei apsivalymo kreivė akivaizdžiai yra ne pirmojo laipsnio, reikėtų taikyti sudėtingesnius modelius (žr. 5 priedėlio nuorodas, taip pat klausti biologinės statistikos ir (arba) farmakologinės kinetikos specialisto patarimo).

Žuvų masės ir ilgio duomenys

Atskirų žuvų šlapios kūno masės ir viso ilgio duomenys, gauti kiekvieną kartą imant ėminius sugerties tarpsniu (įskaitant pradinę populiaciją sugerties tarpsnio pradžioje) ir apsivalymo tarpsniu, įtraukiami į lenteles atskirai bandymo ir kontrolinių ėminių grupei. Kiekvienos žuvies atskirai išmatuotą masę ir ilgį reikėtų susieti su cheminės medžiagos koncentracija, pvz., naudojant unikalų identifikavimo kodą kiekvienai ėminio žuviai. Masei kaip augimo matui teikiama pirmenybė, kai reikia daryti kinetinio BCF verčių praskiedimo dėl augimo pataisą (žr. 73 pastraipą ir 5 priedėlį dėl metodo, taikomo darant praskiedimo dėl augimo pataisą).

Praskiedimo dėl augimo pataisa ir normalizavimas pagal lipidus

Dėl žuvų augimo apsivalymo tarpsniu gali būti gautos mažesnės išmatuotos cheminės medžiagos koncentracijos vertės, todėl visuminė apsivalymo greičio konstanta (k_2) yra didesnė nei būtų gauta vien tik pagal pašalinimo procesus (pvz., kvėpavimą, metabolizmą, šalinimą iš organizmo). Reikėtų daryti kinetinių biologinio koncentravimo faktorių praskiedimo dėl augimo pataisą. BCF_{SS} taip pat darys įtaką augimas, bet nėra sutartos procedūros BCF_{SS} pataisai dėl augimo daryti. Jei augimas reikšmingas, taip pat reikėtų apskaičiuoti BCF_K, pataisytą dėl augimo (BCF_{Kg}), nes jis gali būti tinkamesnis biologinio koncentravimo faktoriaus matas. Lipidų kiekis bandymo žuvyse (kuris yra labai susijęs su hidrofobinių cheminių medžiagų biologiniu kaupimusi) praktiškai gali gerokai keistis, todėl jį būtina normalizuoti pagal nustatytą žuvų lipidų kiekį (5 % masės), siekiant kinetinį ir nuostoviosios būsenos biologinio koncentravimo faktorius pateikti prasmingu būdu, nebent būtų galima įrodyti, kad ne lipidai sukaupia didžiausią bandomosios cheminės medžiagos kiekį (pvz., kai kurios perfluorintos cheminės medžiagos gali jungtis su baltymais). Šių skaičiavimų lygtys ir pavyzdžiai pateikti 5 priedėlyje.

Siekiant padaryti kinetinio BCF praskiedimo dėl augimo pataisą, reikėtų daryti apsivalymo greičio konstantos pataisą dėl augimo. Ši dėl augimo pataisyta apsivalymo greičio konstanta(k_{2g}) apskaičiuojama iš visuminės apsivalymo greičio konstantos (k_2) atimant augimo greičio konstantą (k_g, gautą iš išmatuotos masės duomenų). Paskui apskaičiuojamas dėl augimo pataisytas kinetinis biologinio koncentravimo faktorius sugerties greičio konstantą (k_1) dalijant iš dėl augimo pataisytos apsivalymo greičio konstantos (k_{2g}) (žr. 5 priedėlį). Kai kuriais atvejais šis metodas turi trūkumų. Pvz., jei labai lėtai pasišalinančios cheminės medžiagos bandomos greitai augančiose žuvyse, apskaičiuota k_{2g} gali būti labai maža, todėl labai svarbia tampa jai gauti naudojamų dviejų greičio konstantų paklaida ir kai kuriais atvejais k_g įverčiai gali būti didesni nei k_2. Alternatyvus

▼M7

metodas, kurį taikant nereikia daryti praskiedimo dėl augimo pataisos, kai apsivalymo duomenys gaunami naudojant bandomosios cheminės medžiagos masę vienoje žuvyje (pagal visos žuvies masę), o ne įprastiniai (koncentravimo) duomenys, gaunami kaip bandomosios cheminės medžiagos masė žuvies masės vienetui. Šiuos duomenis galima nesunkiai gauti, nes bandymai pagal šį bandymų metodą turėtų susieti audiniui registruotas koncentracijos vertes su atskirų žuvų mase. Paprasta šių veiksmų atlikimo procedūra apibūdinta 5 priedėlyje. Reikia pažymėti, kad k_2 vis tiek reikėtų pateikti ataskaitoje, jei taikomas šis alternatyvus metodas.

Kinetinį ir nuostoviosios būsenos biologinio koncentravimo faktorius taip pat reikėtų pateikti ataskaitoje numatytojo 5 % (masės) žuvų lipidų kiekio atžvilgiu, nebent būtų galima įrodyti, kad ne lipidai sukaupia didžiausią bandomosios cheminės medžiagos kiekį. Koncentravimo žuvyse duomenys arba BCF normalizuojami pagal santykį tarp 5 % ir faktinį (atskirą) vidutinį lipidų kiekį (% šlapios kūno masės) (žr. 5 priedėlį).

Jei cheminės medžiagos ir lipidų analizės buvo atliekamos su ta pačia žuvimi, atskirų žuvų pagal lipidus normalizuotus duomenis reikėtų naudoti pagal lipidus normalizuotam BCF apskaičiuoti. Arba, jei augimas kontroliniuose ir apdorotų žuvų ėminiuose yra panašus, pataisai dėl lipidų galima naudoti tik kontrolinių ėminių žuvų lipidų kiekį (žr. 56 pastraipą). Pagal lipidus normalizuoto BCF skaičiavimo metodas aprašytas 5 priedėlyje.

Rezultatų aiškinimas

Rezultatus reikėtų aiškinti atsargiai, jei išmatuotos bandymo tirpalų koncentracijos vertės yra arti analizės metodo aptikimo ribos.

Bandymo ir kontrolinių grupių vidutiniai augimo duomenys iš esmės neturėtų reikšmingai skirtis, kad būtų pašalintas toksinis poveikis. Abiejų grupių augimo greičio konstantas arba augimo kreives reikėtų lyginti taikant tinkamą procedūrą ([1])).

Aiškiai apibrėžtos sugerties ir apsivalymo kreivės yra biologinio koncentravimo duomenų geros kokybės ženklas. Greičio konstantoms gautas χ^2 suderinamumo kriterijaus rezultatas turėtų rodyti gerą suderinamumą su biologinio kaupimosi modeliu (t. y. mažą matavimo paklaidos procentinę dalį (32)), kad greičio konstantas būtų galima laikyti patikimomis (žr. 5 priedėlį). Jei naudojama daugiau kaip viena bandymo koncentracija, sugerties ir apsivalymo konstantų kitimas kintant bandymo koncentracijai turėtų būti mažesnis kaip 20 % ([2]). Jei taip nėra, reikėtų pažymėti priklausomybę nuo koncentracijos. Reikėtų registruoti stebimus didelius sugerties ir apsivalymo greičio konstantų skirtumus, kintant naudojamoms bandymo koncentracijos vertėms, ir pateikti galimus paaiškinimus. Jei tyrimo schema sukurta tinkamai, BCF 95 % pasikliovimo riba yra ± 20 % gauto BCF.

Jei bandomos dvi koncentracijos vertės arba jų yra daugiau, abiejų ar visų koncentracijos verčių rezultatai yra naudojami jų nuoseklumui patikrinti ir

([1]) Augimo greičio konstantas galima įvertinti taikant Stjudento *t* kriterijų, kad būtų galima patikrinti, ar yra skirtumas tarp kontrolinių ir bandymo grupių, arba*F* kriterijų, jei atliekama dispersinė analizė. Jei reikia, galima taikyti *F* kriterijų arba tikėtinumo santykio kriterijų, kad būtų lengviau pasirinkti tinkamą augimo modelį (EBPO monografija 54, (32)).

([2]) Šios procentinės vertės gautos darant prielaidą, kad analizės metodai yra patikimi ir pusėjimo trukmė yra < 14 parų. Jei analizės metodai yra ne tokie patikimi arba pusėjimo trukmė yra (gerokai) didesnė, šie skaičiai bus didesni.

▼M7

įrodyti, ar yra priklausomybė nuo koncentracijos. Jei bandoma tik viena koncentracija, siekiant sumažinti gyvūnų ir (arba) išteklių naudojimą, vienos koncentracijos naudojimą reikėtų pagrįsti.

Gautas BCF_{SS} kelia abejonių, jei BCF_K yra reikšmingai didesnis nei BCF_{SS}, nes tai gali rodyti, kad nebuvo pasiekta nuostovioji būsena arba nebuvo atsižvelgta į praskiedimo dėl augimo ir netekimo procesus. Tais atvejais, kai BCF_{SS} yra ypač daug didesnis nei BCF_K, reikėtų patikrinti sugerties ir apsivalymo greičių konstantų skaičiavimą dėl paklaidų ir jas įvertinti iš naujo. BCF_K galėtų pagerinti kitokia priderinimo procedūra (žr. 5 priedėlį).

Bandymo ataskaita

Be 3 pastraipoje nurodytos informacijos apie bandomąją cheminę medžiagą, bandymo ataskaitą sudaro ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

fizikinė būsena ir, jei tinka, fizikinės ir cheminės savybės;

— cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt. (įskaitant organinės anglies kiekį, jei tinka).

— aprašymas, kuo išsamesnis, atskirų komponentų cheminis pavadinimas ir kiekvieno jų procentinė dalis nuo suminės cheminės medžiagos masės, jei bandomos daugiakomponentės medžiagos, nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ir biologinės medžiagos (UVCB). Reikėtų apibendrinti, kodėl bandymams taikomas analizės metodas yra tinkamas cheminės medžiagos koncentracijos matui gauti; reikėtų aprašyti visas analizės procedūras, įskaitant metodo tikslumą, metodo aptikimo ribą ir kiekybinio nustatymo ribą;

— jei turi žymėtųjų atomų, tiksli žymėtojo atomo (-ų) padėtis ir su priemaišomis susijusio aktyvumo procentinė dalis;

— informacija apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą žuvims (būtų gerai nurodyti bandymo rūšį). Toksiškumą reikėtų pateikti ataskaitoje kaip ūmaus poveikio 96 h LC_{50} bei lėtinio poveikio tyrimo NOAEC ir LOAEC (t. y. pradinių gyvenimo stadijų bandymo ar viso gyvavimo ciklo bandymo, jei yra);

— bandomosios cheminės medžiagos ar bandomosios medžiagos laikymo sąlygos ir bandomosios cheminės medžiagos ar bandomosios medžiagos stabilumas laikymo sąlygomis, jei laikomos prieš naudojant.

Bandymo gyvūnų rūšys:

mokslinis pavadinimas, veislė, šaltinis, pradinis apdorojimas, aklimatizavimas, amžius, lytis (jei tinka), dydžių intervalas (masės ir ilgio), kt.

Bandymo sąlygos:

— taikyta bandymų procedūra (pvz., dinaminė ar pusiau statinė); viso masto tyrimas ar pagal supaprastintą schemą (įskaitant priežasčių aiškinimą ir pagrindimą);

— naudojamo apšvietimo tipas bei charakteristikos ir šviesiojo laikotarpio trukmė (-ės);

— bandymų schema (pvz., bandymo kamerų skaičius ir matmenys, vandens tūrio pakeitimo dažnumas, įkrovos dydis, kartotinių ėminių skaičius, kartotinio ėminio žuvų skaičius, bandyme naudotų koncentracijos verčių skaičius, sugerties ir apsivalymo tarpsnių trukmė, žuvų ir vandens ėminių ėmimo dažnumas);

▼M7

— pradinių tirpalų ruošimo metodas ir atnaujinimo dažnumas (reikėtų nurodyti tirpiklį, jei naudojamas, jo koncentraciją ir jam tenkančią bandymo vandens organinės anglies dalį) arba alternatyvios dozavimo sistemos aprašymas;

— nominalios bandymų koncentracijos vertės, bandymų induose išmatuotų verčių vidurkiai ir jų standartiniai nuokrypiai, jų nustatymo metodas ir dažnumas;

— skiedimo vandens šaltinis, parengtinio apdorojimo aprašymas, bandymų žuvų gebėjimo gyventi vandenyje įrodymo rezultatai ir vandens charakteristikos: bandymų terpės pH, kietumas, temperatūra, ištirpusio deguonies koncentracija, liekamojo chloro koncentracija (jei matuojama), suminė organinė anglis, suspenduotos kietosios dalelės (jei tinka) ir visi kiti atlikti matavimai);

— vandens kokybė bandymų induose, pH, kietumas, TOC, temperatūra ir ištirpusio deguonies koncentracija; jų nustatymo metodai ir matavimų dažnumas;

— išsami informacija apie maitinimą, pvz., maisto produkto (-ų) tipas, šaltinis, sudėtis (bent lipidų ir baltymų kiekis, jei įmanoma), pasirinkta maisto norma, duodamas kiekis ir dažnumas;

— informacija apie žuvų ir vandens ėminių apdorojimą, įskaitant bandomosios cheminės medžiagos ir lipidų ruošimo, laikymo, ekstrahavimo ir analizės procedūrų (ir tikslumo) duomenis;

— taikyti apdorojimo randomizavimo ir žuvų paskirstymo tarp bandymų indų metodai;

— bandymų organizmų įleidimo į bandymų tirpalus data ir bandymo trukmė;

— intervalo nustatymo bandymų ir rezultatų, jei yra, aprašymas.

Rezultatai:

— visų parengiamųjų tyrimų rezultatai;

— kontrolinių ėminių žuvų ir žuvų kiekvienoje veikimo kameroje gaištamumas bei jų neįprastas elgesys;

— visų pastebėtų neigiamų reiškinių aprašymas;

— visų taikytų cheminės analizės procedūrų aprašymas, įskaitant aptikimo ir kiekybinio nustatymo ribas, kintamumą ir atgavimo laipsnį;

— žuvų lipidų kiekis, įskaitant taikytą metodą ir, jei apskaičiuotas, normalizavimo pagal lipidus faktorius (L_n faktorius rezultatams išreikšti pagal 5 % žuvų lipidų kiekį).

— kontrolinės ir veikiamosios grupių žuvų masės (ir ilgio) duomenų, susijusių su atskirų žuvų cheminės medžiagos koncentracijos vertėmis (ir lipidų kiekiu, jei taikoma), lentelės (pvz., naudojant unikalų kiekvienos ėminio žuvies identifikavimo kodą) ir gautos (-ų) augimo greičio konstantos (-ų) skaičiavimai;

▼M7

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos žuvyse (C_f, susijusios su atskira žuvimi) ir vandenyje (C_w) duomenų, gautų kiekvieną kartą imant ėminius, lentelės (nurodant bandymo ir kontrolinių grupių vidutines vertes, standartinį nuokrypį ir intervalą, jei tinka) (C_f išreikšta mg/kg visos šlapios kūno masės ar tam tikrų jo audinių, pvz., lipidų, ir C_w – mg/l); kontrolinių ėminių serijos C_w vertės (taip pat reikėtų pateikti foninę vertę);

— kreivės (įskaitant visus matavimo duomenis), kurios vaizduoja (jei taikoma, koncentracijos vertes galima išreikšti viso gyvūno kūno masės atžvilgiu, o lipidų kiekį – normalizuotą 5 % gyvūno ar jo audinių masės):

  — augimą, t. y. žuvies masę arba į natūralųjį logaritmą transformuotą masę kaip laiko funkciją (įskaitant apskaičiuotą augimo greičio konstantą k_g),

  — bandomosios cheminės medžiagos sugerties ir apsivalymo žuvyje eigą (viename grafike),

  — nuostoviosios būsenos pasiekimo trukmę (jei pasiekiama),

  — į natūralųjį logaritmą transformuotą koncentraciją kaip laiko funkciją (įskaitant apskaičiuotą sugerties greičio konstantą k_1),

  — į natūralųjį logaritmą transformuotą koncentraciją (ln koncentracijos) kaip apsivalymo trukmės funkciją (įskaitant apskaičiuotą apsivalymo greičio konstantą k_2), ir

  — sugerties ir apsivalymo tarpsnių kreives, kuriose pateikti duomenys ir priderintas modelis;

— jei apžiūrint kreives aiškiai matomi riktai, galima taikyti statistiškai pagrįstą riktų kriterijų, kad būtų pašalinti klaidingi duomenų taškai, taip pat galima pateikti dokumentuotą jų pašalinimo pagrindimą;

— nuostoviosios būsenos biologinio koncentravimo faktorius, (BCF_{SS}), jei nuostovioji būsena yra (beveik) pasiekta;

— kinetinis biologinio koncentravimo faktorius (BCF_K) bei apskaičiuotos sugerties ir apsivalymo greičio konstantos k_1 ir k_2, kartu su k_2 kitimo duomenimis (kampinio koeficiento ir atkarpos), jei taikomas nuoseklusis priderinimas;

— pasikliovimo ribos, standartinis nuokrypis (jei žinomas) ir kiekvienos naudotos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kiekvieno parametro duomenų apdorojimo ar duomenų analizės metodai;

  — visa informacija apie žymėtosios bandomosios cheminės medžiagos metabolitus ir jų kaupimąsi;

  — augimo greičio konstantos (-ų) (įskaitant 95 % pasikliovimo intervalą (-us))) ir apskaičiuotos apsivalymo greičio konstantos su pataisa dėl augimo (k_{2g}), pusėjimo trukmės ir BCF (BCF_{Kg}) vertės;

  — visi neįprasti reiškiniai bandymo metu, visi nukrypimai nuo šių procedūrų ir kita tinkama informacija;

  — tokia reikiamų išmatuotų ir apskaičiuotų duomenų suvestinė lentelė:

▼M7

Cheminės medžiagos sugerties ir apsivalymo greičio konstantos bei biologinio koncentravimo faktoriai (BCF)

k_g (augimo greičio konstanta, paros^{-1}):	Įrašyti vertę (95 % PI) ([1])
k_1 (visuminė sugerties greičio konstanta, l kg^{-1} paros^{-1}):	Įrašyti vertę (95 % PI) ([1])
k_2 (visuminė apsivalymo greičio konstanta, paros^{-1}):	Įrašyti vertę (95 % PI) ([1])
k_{2g} (apsivalymo greičio konstanta su pataisa dėl augimo, paros^{-1}):	Įrašyti vertę (95 % PI) ([1])
C_f (cheminės medžiagos koncentracija žuvyje, esant nuostoviajai būsenai, mg kg^{-1}):	Įrašyti vertę ± SN ([2])
C_w (cheminės medžiagos koncentracija vandenyje, mg l^{-1}):	Įrašyti vertę ± SN ([2])
L_n (normalizavimo pagal lipidus faktorius):	Įrašyti vertę ([3])
BCF_{SS} (nuostoviosios būsenos BCF, l kg^{-1})	Įrašyti vertę ± SN ([2])
BCF_{SSL} (pagal lipidus normalizuotas nuostoviosios būsenos BCF, l kg^{-1}):	Įrašyti vertę ([3]) ± SN ([2])
BCF_K (kinetinis BCF, l kg^{-1})	Įrašyti vertę (95 % PI) ([1])
BCF_{Kg} (kinetinis BCF su pataisa dėl augimo, l kg^{-1})	Įrašyti vertę (95 % PI) ([1])
$t_{1/2g}$ (pusėjimo trukmė su pataisa dėl augimo, paros):	Įrašyti vertę (95 % PI) ([1])
BCF_{KL} (pagal lipidus normalizuotas kinetinis BCF, l kg^{-1}):	Įrašyti vertę
BCF_{KLG} (pagal lipidus normalizuotas kinetinis BCF su pataisa dėl augimo, l kg^{-1}):	Įrašyti vertę

([1]) 1PI – pasikliovimo intervalas (jei įmanoma įvertinti);
([2]) SN – standartinis nuokrypis (jei įmanoma įvertinti).

Kuriant parengiamąjį bandymų metodą ir bandymų schemą, reikėtų vengti rezultatų, kurie ataskaitoje būtų pateikti kaip neaptikti arba kiekybiškai nustatyti arti aptikimo ar kiekybinio nustatymo ribos, nes tokie rezultatai negali būti panaudoti greičio konstantoms skaičiuoti.

C.13 -II. **II. ŽUVŲ VEIKIMO PER VANDENINĘ TERPĘ SUPAPRASTINTAS BANDYMAS**

ĮVADAS

Vis didesnė laboratorijų ir reglamentavimo institucijų patirtis, įgyta atliekant viso masto bandymą ir aiškinant jo rezultatus, rodo, kad, esant kai kurioms išimtims, galioja pirmojo laipsnio kinetika skaičiuojant sugerties ir apsivalymo greičio konstantas. Todėl įvertinti sugerties ir apsivalymo greičio konstantas ir apskaičiuoti kinetinį BCF galima pagal minimalų ėminių ėmimo taškų skaičių.

Pradinis tikslas tiriant alternatyvias BCF tyrimų schemas buvo sukurti nedidelio masto bandymą, kuris būtų naudojamas kaip tarpinis bandymo etapas pagal K_{OW} ir QSAR gautiems BCF įverčiams atmesti arba patvirtinti ir taip atsisakyti daugelio cheminių medžiagų viso masto tyrimo ir sumažinti sąnaudas bei

▼M7

naudojamų gyvūnų skaičių, imant mažiau ėminių ir atliekant mažiau analizės procedūrų. Laikantis pagrindinės pirmiau taikyto bandymų metodo schemos, kad bandymo rezultatus būtų galima apjungti su esamais BCF duomenimis ir palengvinti bandymų atlikimą ir duomenų aiškinimą, buvo siekiama gauti reikiamo tikslumo ir preciziškumo BCF įverčius rizikos vertinimo sprendimams priimti. Galioja dauguma viso masto bandymo aspektų, pvz., tinkamumo patvirtinimo kriterijai (žr. 24 pastraipą) ir bandymo nutraukimas, jei sugerties tarpsnio pabaigoje stebima nereikšminga sugertis (žr. 16 ir 38 pastraipas).

Cheminės medžiagos, kurioms būtų galima pasirinkti supaprastinto bandymo schemą, turėtų priklausyti bendrajai grupei, kuriai jis buvo sukurtas, t. y. nepolinėms organinėms medžiagoms (žr. 49 pastraipą). Jei yra kokių nors požymių, kad cheminė medžiaga, kurią reikia bandyti, gali elgtis kitaip (pvz., aiškiai nukrypsta nuo pirmojo laipsnio kinetikos), viso masto bandymas turėtų būti atliekamas reglamentavimo tikslais.

Paprastai, supaprastinto bandymo trukmė nėra mažesnė nei standartinio BCF bandymo, bet jį atliekant imama mažiau žuvų ėminių (žr. pagrindimą 6 priedėlyje). Tačiau sparčiai pasišalinančių cheminių medžiagų apsivalymo laikotarpį galima sutrumpinti, kad prieš bandymo pabaigą būtų išvengta koncentracijos žuvyse verčių, mažesnių nei aptikimo ar kiekybinio nustatymo riba. Galima naudoti supaprastintą žuvų veikimo vienos vertės koncentracija bandymą, jei reikia nustatyti, ar būtinas viso masto bandymas, ir, jei gauti duomenys, naudojami greičio konstantoms ir BCF apskaičiuoti, yra patikimi (žr. 93 pastraipą), viso masto bandymo galima atsisakyti, jei gauta BCF vertė yra labai nutolusi nuo susirūpinimą keliančių reglamentavimo verčių.

Kai kuriais atvejais kaip parengiamąjį bandymą gali būti naudinga atlikti supaprastintą bandymą pagal schemą su daugiau kaip viena bandymo koncentracija, siekiant nustatyti, ar cheminei medžiagai gauti BCF įverčiai priklauso nuo koncentracijos. Jei BCF įverčiai, gauti atliekant supaprastintą bandymą, rodo priklausomybę nuo koncentracijos, būtina atlikti viso masto bandymą. Jei pagal tokio supaprastinto bandymo rezultatus BCF įverčiai nepriklauso nuo koncentracijos, bet rezultatai nėra laikomi galutiniais, galima atlikti vienos koncentracijos viso masto bandymą, taip sumažinant naudojamų gyvūnų skaičių palyginti su dviejų (ar daugiau) koncentracijos verčių viso masto bandymu.

Cheminės medžiagos, kurias būtų galima pasirinkti supaprastintam bandymui, turėtų:

— rodyti maždaug pirmojo laipsnio sugerties ir apsivalymo kinetiką, pvz., gautą atsižvelgiant į kryžmines nuorodas dėl panašių cheminių medžiagų;

— turėti log K_{OW} < 6, jei nelaukiama greito metabolizmo ([1]);

— pakankamai gerai tirpti vandenyje atsižvelgiant į analizės metodą (žr. 24 pastraipą);

— būti aiškiai kiekybiškai nustatomos (t. y. koncentracijos vertės turėtų būti bent viena eile didesnės nei kiekybinio nustatymo riba) žuvyje ir vandenyje, taip pat rekomenduojamos žymėtosios medžiagos (žr. 23 pastraipą); ir

— turėti apsivalymo laikotarpį, ilgesnį nei prognozuojama pusėjimo trukmė (žr. 5 priedėlį dėl skaičiavimų), arba apsivalymo trukmę reikėtų atitinkamai reguliuoti (žr. 91 pastraipą). Šiai taisyklei galima taikyti išimtį, jei laukiamas greitas cheminės medžiagos metabolizmas.

([1]) Supaprastintas bandymas faktiškai gali būti naudojamas greitam metabolizmui įrodyti, kai žinoma, kad yra greito metabolizmo tikimybė.

▼M7

ĖMINIŲ ĖMIMO PROGRAMA ATLIEKANT TYRIMUS PAGAL SUPAPRASTINTĄ SCHEMĄ

Žuvų ėminių ėmimas

Žuvų ėminių ėmimo kartų skaičius sumažintas iki keturių:

— sugerties tarpsnio viduryje ir pabaigoje (jo pabaiga kartu būtų apsivalymo tarpsnio pradžia), pvz., po 14 ir 28 parų (33).

— apsivalymo tarpsnio viduryje ir tyrimo pabaigoje (kai cheminės medžiagos koncentracija yra < 10 % didžiausios koncentracijos, arba aiškiai ne anksčiau kaip cheminės medžiagos pusėjimo trukmė), pvz., praėjus 7 ir 14 parų nuo apsivalymo pradžios (33). Jei laukiamas ar stebimas spartus apsivalymas, apsivalymo laikotarpį gali tekti sutrumpinti, kad koncentracija žuvyse nesumažėtų iki mažesnės nei kiekybinio nustatymo riba;

— lipidų kiekis matuojamas kaip ir atliekant viso masto tyrimą;

— pataisa dėl augimo kaip ir atliekant viso masto tyrimą;

— BCF apskaičiuojamas kaip kinetinis BCF.

Vandens ėminių ėmimas

Taikant supaprastintą schemą, vandens ėminiai imami kaip atliekant viso masto tyrimą (žr. 54 pastraipą) arba bent penkis kartus vienodais tarpais sugerties tarpsniu ir kas savaitę apsivalymo tarpsniu.

Schemos pakeitimai

Atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos savybes, pagrįstas QSAR prognozes ir specifinį tyrimo tikslą, galima nuspręsti dėl kai kurių schemos pakeitimų:

— jei reikia geresnio tikslumo, sugerties tarpsnio pabaigoje galima imti didesnio žuvų skaičiaus ėminį (6 arba 8, o ne 4);

— įtraukti „papildomą“ naudojamų žuvų grupę, jei po 14 parų (arba prognozuojamoje apsivalymo tarpsnio pabaigoje) apsivalymas buvo nepakankamas (t. y. > 50 %). Jei prognozuojama apsivalymo tarpsnio trukmė yra trumpesnė arba ilgesnė nei 14 parų, reikėtų derinti ėminių ėmimo tvarkaraštį (t.y.vieną žuvų grupę imti prognozuojamoje apsivalymo tarpsnio pabaigoje ir vieną – praėjus pusei to laiko);

— naudoti dvi bandymo koncentracijos vertes galimai priklausomybei nuo koncentracijos tirti. Jei supaprastinto bandymo naudojant dvi bandymo koncentracijos vertes rezultatai rodo, kad BCF nepriklauso nuo koncentracijos (t. y. skiriasi mažiau kaip 20 %), galima laikyti, kad pakanka vienos koncentracijos viso masto bandymui atlikti, jei jis yra atliekamas;

— tikėtina, kad planuojant sugerties ir apsivalymo tarpsnių trukmę gali padėti biologinio kaupimosi modeliai, pvz., pasiūlyti Arnot *et al.* (35) (taip pat žr. 5 priedėlį).

Skaičiavimai

Šio metodo pagrindinis argumentas yra tas, kad atliekant viso mato bandymą biologinio koncentravimo faktorius gali būti nustatytas kaip nuostoviosios būsenos biologinio koncentravimo faktorius (BCF_{SS}), skaičiuojant bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos žuvies audinyje ir bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vandenyje santykį, arba skaičiuojant kinetinį biologinio koncentravimo faktorių (BCF_K) kaip sugerties greičio konstantos k_1 ir apsivalymo greičio konstantos k_2 santykį. BCF_K yra tikras netgi nepasiekus cheminės medžiagos nuostoviosios būsenos koncentracijos sugerties tarpsniu, jei sugertis ir

▼M7

apsivalymas vyksta maždaug kaip pirmojo laipsnio kinetikos procesai. Sugerties ir apsivalymo greičio konstantoms įvertinti būtinai reikia turėtų ne mažiau kaip du taškus, kurių vienas būtų sugerties tarpsnio pabaigoje (t. y. apsivalymo tarpsnio pradžioje), o kitas – apsivalymo tarpsnio pabaigoje (arba praėjus reikšmingai jo daliai). Rekomenduojamas tarpinis ėminių ėmimo taškas sugerties ir apvalymo tarpsnių kinetikai patikrinti ([1]). Dėl skaičiavimų žr. 5 ir 6 priedėlį.

Rezultatų aiškinimas

Siekiant įvertinti bandymo tinkamumą ir informacinę vertę, reikia patikrinti, ar apsivalymo laikotarpis yra ilgesnis nei viena pusėjimo trukmė. Be to, BCF_{Km} (kinetinį BCF, gautą atliekant supaprastintą bandymą) reikėtų palyginti su supaprastinto bandymo BCF_{SS} verte (kuri yra lygi BCF_{SS}, apskaičiuotam sugerties tarpsnio pabaigoje, darant prielaidą, kad nuostovioji būsena buvo pasiekta. Galima daryti tik prielaidą, nes ėminių ėmimo taškų yra per mažai, kad tai būtų galima įrodyti). Jei BCF_{Km} < supaprastinto bandymo BCF_{SS}, supaprastinto bandymo BCF_{SS} reikėtų teikti pirmenybę. Jei BCF_{Km} yra mažesnis nei 70 % supaprastinto bandymo BCF_{SS}, rezultatai netinka ir reikėtų atlikti viso masto bandymą.

Jei atliekant supaprastintą bandymą gautas BCF_{Km} atitinka kurios nors susirūpinimą keliančios reglamentavimo vertės sritį, reikėtų atlikti viso masto bandymą. Jei rezultatas visiškai neatitinka kurios nors susirūpinimą keliančios reglamentavimo vertės (gerokai didesnis arba mažesnis), viso masto bandymas gali būti nebūtinas, arba galima atlikti vienos koncentracijos viso masto bandymą, jei to reikalauja atitinkama reglamentavimo sistema.

Jei, atlikus vienos koncentracijos supaprastintą bandymą, nustatoma, kad būtinas viso masto bandymas, jį galima atlikti naudojant kitą koncentraciją. Jei rezultatai yra suderinami, tolesnio viso masto bandymo naudojant skirtingas koncentracijos vertes galima atsisakyti, nes nesitikima, kad cheminės medžiagos biologinis koncentravimas priklausytų nuo koncentracijos. Jei supaprastintas bandymas buvo atliktas naudojant dvi koncentracijos vertes ir rezultatai nerodo priklausomybės nuo koncentracijos, viso masto bandymą galima atlikti naudojant tik vieną koncentraciją (žr. 87 pastraipą).

Bandymo ataskaita

Į supaprastinto bandymo ataskaitą reikėtų įtraukti viso masto bandymui reikiamą informaciją (žr. 81 pastraipą), išskyrus tą informaciją, kurios neįmanoma gauti (t. y. kreivę, rodančią nuostoviosios būsenos pasiekimo trukmę, ir nuostoviosios būsenos biologinio koncentravimo faktorių; vietoj pastarojo reikėtų pateikti supaprastinto bandymo BCF_{ss}). Be to, į ją turėtų būti įtrauktas supaprastinto bandymo naudojimo priežasčių aptarimas ir gautas BCF_{Km}.

C.13 – III. **BIOLOGINIO KAUPIMOSI ŽUVYSE BANDYMAS VEIKIANT PER MITYBĄ**

ĮVADAS

Šiame skyriuje aprašytą metodą reikėtų taikyti cheminėms medžiagoms, kurioms neįmanoma taikyti veikimo per vandeninę terpę metodo (pvz., kai neįmanoma užtikrinti stabilios išmatuojamos koncentracijos vandenyje arba per 60 veikimo parų neįmanoma pasiekti reikiamo kūno sugerto kiekio; žr. ankstesnius veikimo per vandeninę terpę metodo skirsnius). Visgi reikėtų aiškiai suvokti, kad šio bandymo vertinamoji baigtis bus mitybos biomagnifikacijos faktorius (BMF), o ne biologinio koncentravimo faktorius (BCF) ([2]).

2001 m. gegužę Madride vykusioje Aplinkos toksikologijos ir chemijos draugijos (angl. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*) Europos skyriaus konferencijoje buvo pristatytas naujas vandenyje mažai tirpių organinių cheminių medžiagų biologinio kaupimosi bandymo metodas (36). Šis darbas pagrįstas įvairiais literatūroje pateiktais biologinio kaupimosi tyrimais, kuriuos atliekant taikomas dozavimo metodas naudojant sodrintą maistą (pvz. (37)). 2004 m. pradžioje ES PBT darbo grupei buvo pateiktas mažai vandenyje tirpių organinių

([1]) Kai yra tik du duomenų taškai, BCF_{Km} pasikliovimo ribų įverčius galima gauti taikant savirankos metodus. Kai taip pat yra tarpiniai duomenų taškai, BCF_{Km} pasikliovimo ribų įverčius galima gauti taip, kaip jie gaunami atliekant viso masto bandymą.

([2]) Apibrėžtys ir vienetai pateikti 1 priedėlyje.

▼M7

cheminių medžiagų, kurioms neįmanoma taikyti etaloninio veikimo per vandeninę terpę metodo, biologinio kaupimosi gebos matavimo protokolo projektas (38) ir jį patvirtinančių nuorodų dokumentas (39). Papildomai metodui pagrįsti buvo nurodyta, kad galimas aplinkos poveikis esant tokioms mažai vandenyje tirpioms cheminėms medžiagoms (t. y. log K_{OW} > 5) daugiausia gali vykti per maistą (žr. (40) (41) (42) (43) (44)). Dėl šios priežasties mitybos bandymai buvo nurodyti kai kuriuose paskelbtuose cheminių medžiagų reglamentuose ([1]). Tačiau reikėtų suvokti, kad šiame skyriuje aprašytame bandymų metode griežtai vengiama veikti per vandeninę terpę, todėl šio bandymų metodo BMF vertė negali būti tiesiogiai lyginama su BMF verte, gauta atliekant tyrimą lauko sąlygomis (kai galima sujungti veikimą per vandeninę terpę ir mitybą).

Šis bandymų metodo skyrius atitinka šį protokolą (38) ir yra naujas metodas, kurio nėra ankstesnėje C.13 bandymų metodo versijoje. Taikant šį alternatyvų bandymą, galima tiesiogiai tirti mitybos kelią kontroliuojamomis laboratorinėmis sąlygomis.

Galimi tyrėjai turėtų remtis šio bandymų metodo 1–14 pastraipomis dėl informacijos apie tai, kada mitybos bandymui gali būti teikiama pirmenybė palyginti su veikimo per vandeninę terpę bandymu. Pateikta informacija apie įvairius cheminių medžiagų aspektus ir į juos reikėtų atsižvelgti prieš atliekant bandymą.

Galima atsižvelgti į galimybę naudoti žymėtąsias bandomąsias chemines medžiagas dėl panašių priežasčių, kurios buvo naudojamos taikant veikimo per vandeninę terpę metodą (žr. 6 ir 65 pastraipas).

Mitybos metodas gali būti taikomas daugiau kaip vienai cheminei medžiagai patikrinti atliekant vieną bandymą, jei jos atitinka tam tikrus kriterijus; jie nagrinėjami 112 pastraipoje. Procedūroms supaprastinti čia aprašomas bandymas, kurį atliekant tiriama tik viena cheminė medžiaga.

Mitybos bandymas daugeliu aspektų yra panašus į veikimo per vandeninę terpę bandymą, išskyrus, aišku, veikimo būdą. Taigi daugelis čia aprašyto metodo aspektų sutampa su veikimo per vandeninę terpę metodu, aprašytu pirmiau pateiktame skyriuje. Kiek įmanoma, pateikiamos kryžminės nuorodos į atitinkamas to skyriaus pastraipas, bet dėl skaitomumo ir supratimo priežasčių tam tikri pasikartojimai yra neišvengiami.

BANDYMO PRINCIPAS

Galima naudoti dinamines arba pusiau statines sąlygas (žr. 4 pastraipą); dinaminės sąlygos rekomenduojamos, kad būtų ribojamas galimas veikimas per vandenį bandomąja chemine medžiaga dėl desorbcijos nuo sodrinto maisto ar išmatų. Bandymą sudaro du tarpsniai – sugerties (bandomąja chemine medžiaga sodrintas maistas) ir apsivalymo (švarus, neapdorotas maistas) (žr. 16 pastraipą). Sugerties tarpsniu žuvų bandymo grupė kasdien šeriama nustatytos žinomos sudėties komerciniu žuvų maistu, sodrintu bandomąja chemine medžiaga. Būtų gerai, jei žuvys suėstų visą duodamą maistą (žr. 141 pastraipą). Apsivalymo etapu žuvys šeriamos grynu, neapdorotu komerciniu žuvų maistu. Esant poreikiui, galima naudoti daugiau negu vieną tyrimo grupę su skirtingomis tiriamomis

([1]) Atsižvelgiant į Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH) OL L 396, 2006 12 30, p. 1), šis klausimas nagrinėjamas *Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment,* R.7c, R.7.10.3.1 skyriuje; R.7.10.4.1 ir R7.10-2 paveiksle.

▼M7

cheminių medžiagų koncentracijomis, kaip veikimo per vandeninę terpę metode, tačiau daugumai stipraus hidrofobiškumo organinių cheminių medžiagų tyrimui vienos tyrimo grupės užtenka (žr. 49 ir 107 pastraipas). Jei naudojamos pusiau statinės sąlygos, sugerties tarpsnio pabaigoje žuvis reikėtų perkelti į naują terpę ir (arba) į naują bandymų kamerą (tuo atveju, kai naudojama įsisavinimo etape terpė ir / arba aparatūra buvo užteršta tiriamąja chemine medžiaga). Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos žuvyse vertės matuojamos abiem bandymo tarpsniais. Be sodrintu maistu šeriamos žuvų grupės (bandymo grupės) yra kontrolinė žuvų grupė, laikoma vienodomis sąlygomis ir vienodai šeriama, išskyrus tai, kad komercinis žuvų maistas nesodrinamas bandomąja chemine medžiaga. Galima kiekybiškai įvertinti bandomosios cheminės medžiagos foninę koncentraciją tokios kontrolinės grupės neapdorotose žuvyse ir tą grupę naudoti palyginimui su nepageidaujamais reiškiniais, stebimais bandymo grupėje (-ėse) dėl apdorojimo ([1]). Taip pat galima lyginti augimo greičio konstantas tarp grupių, kaip būdą patikrinti, ar buvo suvartoti panašūs duodamo maisto kiekiai (aiškinant skirtingas augimo greičio konstantas, reikia atsižvelgti į galimus maisto skonio skirtumus; žr. 138 pastraipą). Svarbu, kad sugerties ir apsivalymo tarpsniais bandymo ir kontrolinės grupės būtų maitinamos vienodos mitybinės vertės maistu.

Atsižvelgiant į metodo kūrėjų patirtį, sugerties tarpsnis turėtų trukti 7–14 parų (38) (39). Toks laikotarpis turėtų kiek įmanoma sumažinti bandymo atlikimo kainą, bet kartu užtikrinti pakankamą daugelio tiriamų cheminių medžiagų poveikį. Tačiau kai kuriais atvejais sugerties tarpsnis gali būti pratęstas (žr. 127 pastraipą). Per sugerties tarpsnį cheminės medžiagos koncentracija žuvyse gali nepasiekti nuostoviosios būsenos, todėl duomenų apdorojimas ir šiuo metodu gauti rezultatai paprastai yra pagrįsti likučių audiniuose kinetikos analize. (Pastaba. Šiuo atveju kaip ir veikimo per vandeninę terpę metodui galima naudoti nuostoviosios būsenos pasiekimo trukmės nustatymo lygtis, žr. 5 priedėlį). Apsivalymo tarpsnis prasideda žuvims pirmą kartą davus nesodrinto maisto ir jis paprastai trunka iki 28 parų arba trumpiau, kai bandomosios cheminės medžiagos nebegalima kiekybiškai nustatyti visoje žuvyje. Apsivalymo tarpsnį galima sutrumpinti ar tęsti ilgiau kaip 28 paras, priklausomai nuo cheminės medžiagos koncentracijos ir žuvų dydžio pokyčių laikui einant.

Šiuo metodu galima nustatyti cheminės medžiagos būdingą pusėjimo trukmę žuvyse ($t_{1/2}$, pagal apsivalymo greičio konstantą k_2), bandomosios cheminės medžiagos žuvyje įsisavinimo efektyvumą (absorbciją per virškinimo traktą *a*), kinetinį mitybos biomagnifikacijos faktorių (BMF_K), kinetinį mitybos biomagnifikacijos faktorių su pataisa dėl augimo (BMF_{Kg}), kinetinį mitybos biomagnifikacijos faktorių su pataisa dėl lipidų ([2]) (BMF_{KL}) (ir (arba) kinetinį mitybos biomagnifikacijos faktorių su pataisa dėl augimo ir lipidų BMF_{KgL}). Kaip ir veikimo per vandeninę terpę metodo atveju, dėl žuvies masės padidėjimo bandymo metu vyksta bandomosios cheminės medžiagos praskiedimas dėl žuvies augimo, todėl (kinetinio) BMF reikšmė bus per maža, jei nebūtų daroma pataisa dėl augimo (žr. 162 ir 163 pastraipas). Be to, jei įvertinama, kad sugerties tarpsniu buvo pasiekta nuostovioji būsena, galima apskaičiuoti būdingąjį nuostoviosios būsenos BMF. Naudojant šiuos metodus galima apskaičiuoti kinetinį biologinio koncentravimo faktorių (BKF_K) iš mitybos tyrimo duomenų (pvz., (44) (45) (46) (47) (48). 8 priedėlyje yra aptariami šių metodų privalumai ir trūkumai.

([1]) Būtų labai gerai, jei daugumos bandomųjų cheminių medžiagų nebūtų aptinkama kontroliniuose vandens ėminiuose. Foninė koncentracija turėtų būti susijusi tik su natūraliai paplitusioms medžiagoms (pvz., kai kuriais metalais) ir medžiagomis, kurios aplinkoje yra labai paplitusios.

([2]) Kadangi BMF yra apibrėžiamas kaip cheminės medžiagos koncentracijos organizme ir jos koncentracijos maiste santykis, esant nuostoviajai būsenai, į lipidų kiekį yra atsižvelgiama darant pataisą dėl jų kiekio organizme ir maiste, todėl vartojamas tikslesnis terminas „pataisa“. Šis metodas skiriasi nuo „normalizavimo“ pagal nustatytą organizmo lipidų kiekį, kaip tai daroma atliekant veikimo per vandeninę terpę biologinio koncentravimo bandymą.

▼M7

Bandymas buvo pirmiausia skirtas mažai tirpioms nepolinėms organinėms cheminėms medžiagoms, kurių sugerties ir apsivalymo kinetika žuvyse yra maždaug pirmojo laipsnio. Jei bandoma cheminė medžiaga, kurios sugerties ir apsivalymo kinetika nėra maždaug pirmojo laipsnio, reikėtų taikyti sudėtingesnius modelius (žr. 5 priedėlio nuorodas), taip pat klausti biologinės statistikos ir (arba) farmakologinės kinetikos specialisto patarimo.

BMF paprastai yra nustatomas atliekant bandomosios cheminės medžiagos kiekio analizę visoje žuvyje (šlapios kūno masės atžvilgiu). Tačiau jei tai atitinka tyrimo tikslus, gali būti imami tam tikrų audinių (pvz., raumenų, kepenų) ėminiai, jei žuvis padalyta į valgomąją ir nevalgomą dalis (žr. 21 pastraipą). Be to, galima pašalinti virškinimo traktą ir jį analizuoti atskirai, kad būtų nustatytas jo indėlis į visos žuvies koncentracijos vertę, imant ėminius sugerties tarpsnio pabaigoje ir prieš apsivalymo tarpsnio pradžią, arba šį būdą galima naudoti kaip masių balanso metodo dalį.

Reikėtų išmatuoti visos žuvies ėminio lipidų kiekį, kad būtų galima daryti koncentracijos pataisą dėl lipidų, atsižvelgiant į jų kiekį maiste ir žuvyje (žr. 56 bei 57 pastraipas ir 7 priedėlį).

Reikėtų matuoti ir registruoti ėminiams paimtų atskirų žuvų masę, kuri būtų susieta su analizuojamos cheminės medžiagos koncentracija toje žuvyje (pvz., naudojant unikalų identifikavimo kodą kiekvienai ėminio žuviai), kad būtų galima apskaičiuoti galimą augimą bandymo metu. Jei įmanoma, reikėtų išmatuoti visą žuvies ilgį ([1]). Masės duomenys taip pat yra būtini vertinant BKF pagal mitybos bandymo apsivalymo duomenis.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

Reikėtų turėti informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą, kaip aprašyta 3 ir 22 pastraipose. Analizės metodas bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vandenyje analizės metodas paprastai nėra būtinas; reikia turėti tinkamo jautrio metodus koncentracijai žuvų maiste ir žuvų audiniuose matuoti.

Atliekant vieną bandymą, gali būti taikomas metodas daugiau kaip vienai cheminei medžiagai nustatyti. Tačiau bandomosios cheminės medžiagos turėtų būti suderinamos, kad negalėtų vykti jų sąveika ir nepakistų jų cheminė sudėtis sodrinant jomis žuvų maistą. Siekiama, kad išmatuoti kiekvienos cheminės medžiagos rezultatai neturėtų labai skirtis nuo rezultatų, gautų kiekvieną cheminę medžiagą bandant atskirai. Atliekant parengiamuosius analizės darbus, reikėtų nustatyti, ar kiekvieną cheminę medžiagą galima atgauti iš daugeliu cheminių medžiagų sodrinto maisto ir žuvies audinių ėminio, esant i) dideliam atgavimo laipsniui (pvz., > 85 % nominalaus kiekio) ir ii) bandymui atlikti reikiamam jautriui. Suminė kartu bandytų cheminių medžiagų dozė turėtų būti mažesnė nei jungtinė koncentracija, kuri galėtų sukelti toksinį poveikį (žr. 51 pastraipą). Be to, kuriant bandymų schemą, reikėtų atsižvelgti į galimus nepageidaujamus reiškinius žuvyse ir į interaktyvių poveikių potencialą (pvz., metabolizmo reiškinių), susijusius su daugelio cheminių medžiagų bandymu, vienu metu. Reikėtų vengti kartu bandyti jonizuojančias chemines medžiagas. Kalbant apie veikimą, metodas taip pat tinka kompleksiniams mišiniams (žr. 51 pastraipą), nors galioja tie patys analizės apribojimai, kaip ir taikant bet kurį kitą metodą.

BANDYMO TINKAMUMAS

Taikomos šios bandymo tinkamumo sąlygos (žr. 24 pastraipą):

— Tiriamosioms ir kontrolinėms grupėms vandens temperatūros svyravimai mažiau kaip ± 2 °C;

([1]) Visą ilgį taip pat reikėtų matuoti ir registruoti bandymo metu, nes jis yra geras rodiklis, ar nebuvo nepageidaujamo poveikio.

▼M7

— ištirpusio deguonies koncentracija neturi būti žemesnė nei 60 % soties ore vertės;

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracija žuvų maiste prieš sugerties tarpsnį ir jo pabaigoje skiriasi ne daugiau kaip ± 20 % (pagrįsta bent trijų ėminių rezultatais paimtais prieš ir po sugerties tarpsnio;

— didelį cheminės medžiagos homogeniškumo laipsnį maiste reikia įrodyti, atliekant preliminarinius parengiamuosius sodrinto maisto analizės darbus; bent trijų bandymo pradžioje paimtų ėminių cheminės medžiagos koncentracija neturėtų skirtis daugiau kaip ± 15 % nuo vidurkio;

— nesodrintame maiste arba kontroliniuose žuvų audiniuose bandomosios cheminės medžiagos neaptinkama arba jos kiekis atitinka tipinius pėdsakų lygius palyginus su apdorotais ėminiais;

— kontrolinių ir apdorotų ėminių žuvų gaištamumas arba kiti neigiami reiškiniai ir (arba) susirgimai bandymo pabaigoje turėtų būti mažesni nei 10 %; jei dėl kokios nors priežasties bandymas pratęsiamas, neigiami reiškiniai abiejose žuvų grupėse turėtų būti mažesni nei 5 % per mėnesį ir apskritai ne didesni kaip 30 %. Reikšmingi vidutinio augimo skirtumai tarp bandymo ir kontrolinių žuvų grupių ėminių galėtų būti bandomosios cheminės medžiagos toksinio poveikio rodiklis.

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

Jei laboratorija anksčiau nė karto nebuvo atlikusi tokio tyrimo arba buvo padaryti reikšmingi pakeitimai (pvz., pakeista žuvų veislė ar tiekėjas, kita žuvų rūšis, reikšmingi žuvų dydžio pasikeitimai, maisto ar sodrinimo metodo pakeitimai ir kt.), patartina atlikti techninės kvalifikacijos tyrimą, naudojant etaloninę cheminę medžiagą. Pagrindinis etaloninės medžiagos naudojimo tikslas – nustatyti, ar tinka taikomas maisto sodrinimo metodas, kad būtų užtikrintas maksimalus bandomųjų cheminių medžiagų homogeniškumas ir biologinis įsisavinamumas. Vienas iš naudojamų nepolinių hidrofobinių medžiagų pavyzdžių yra heksachlorbenzenas (HCB), bet dėl jo pavojingų savybių būtų galima pagalvoti apie kitas chemines medžiagas, jei yra patikimų duomenų apie sugertį ir biologinį koncentravimą per maistą ([1]). Jei naudojama etaloninė cheminė medžiaga, bandymo ataskaitoje apie ją reikėtų pateikti pagrindinę informaciją kaip ir apie bandomąsias chemines medžiagas, įskaitant pavadinimą, grynumą, CAS numerį, struktūrą, toksiškumo duomenis (jei yra) (žr. 3 ir 22 pastraipas).

METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

Medžiagos ir aparatūra turi būti naudojamos kaip nurodyta veikimo per vandeninę terpę metodo aprašyme (žr. 26 pastraipą). Reikėtų naudoti dinaminio ar statinio atnaujinimo sistemą, kuri užtikrina pakankamą į bandymo indus tiekiamo skiedimo vandens tūrį. Reikėtų registruoti srautą.

Vanduo

Vanduo turi būti naudojamos kaip nurodyta veikimo per vandeninę terpę metodo aprašyme (žr. 27–29 pastraipas). Bandymo terpė turėtų būti apibūdinta, kaip aprašyta, ir jos kokybė turėtų būti pastovi visą bandymo trukmę. Natūralus kietųjų dalelių kiekis ir suminės organinės anglies (TOC) kiekis prieš bandymo pradžią turėtų būti kuo mažesnis (≤ 5 mg/l kietųjų dalelių; ≤ 2 mg/l suminės organinės anglies). TOC, kaip vieną iš vandens charakteristikų, reikia matuoti tik prieš bandymą (žr. 53 pastraipą).

([1]) HCB yra įtrauktas į Stokholmo konvencijos A ir C priedus ir į Reglamento (EB) Nr. 850/2004 dėl patvariųjų organinių teršalų I ir III priedus (OL L 158, 2004 4 30, p. 7).

▼M7

Maistas

Rekomenduojama naudoti pirktinį žuvų maistą (plūduriuojančias ir (arba) lėtai skęstančias maisto granules), kuris yra apibūdinamas, nurodant bent baltymų ir riebalų kiekį. Maisto granulės turėtų būti vienodo dydžio, kad būtų didesnis mitybos poveikio efektyvumas, t. y. žuvys suėstų daugiau maisto, nei ėsdamos tik didesnius gabalus ir nematydamos mažesnių. Granulių matmenys turėtų atitikti žuvų dydį bandymo pradžioje (pvz., galima naudoti granules, kurių skersmuo yra maždaug 0,6–0,85 mm, kai visas žuvų ilgis yra 3–7 cm, ir 0,85–1,2 mm, kai visas ilgis yra 6–12 cm). Granulių dydį, atsižvelgiant į žuvų augimą, apsivalymo tarpsnio pradžioje galima keisti. Tinkamos pirktinio maisto sudėties pavyzdys yra pateiktas 7 priedėlyje. Kuriant šį bandymų metodą, paprastai buvo naudojamas maistas, kurio suminis lipidų kiekis buvo 15–20 % (w/w)). Kai kuriuose regionuose gali nebūti maisto su tokia didele lipidų koncentracija. Tokiais atvejais tyrimai turėtų būti atliekami esant mažesnei tiekiamo maisto lipidų koncentracijai, bet prireikus reikėtų tinkamai reguliuoti maitinimo dažnumą, kad būtų užtikrinta gera žuvų sveikata (atsižvelgiant į parengiamuosius bandymus). Suminį lipidų kiekį bandymo grupės ir kontrolinės grupės maiste reikia matuoti ir registruoti prieš bandymo pradžią ir sugerties tarpsnio pabaigoje. Tyrimo ataskaitoje reikėtų pateikti maistinių medžiagų, drėgmės, ląstelienos, pelenų ir, jei įmanoma, mineralų bei pesticidų likučių (pvz., tipinių ypač pavojingų teršalų) analizės duomenis, kuriuos pateikia pirktinio maisto tiekėjas.

Sodrinant maistą bandomąja chemine medžiaga, reikia imtis visų priemonių maisto homogeniškumui užtikrinti viso bandymo metu. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracija bandymo grupės maiste turėtų būti pasirinkta atsižvelgiant į analizės metodo jautrį, bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą (NOEC, jei žinoma) ir atitinkamus fizikinius ir cheminius duomenis. Naudojant etaloninę cheminę medžiagą, ją reikėtų įterpti esant koncentracijai, kuri būtų maždaug 10 % bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos (arba kiek įmanoma mažesnė), atsižvelgiant į analizės jautrį (pvz., buvo nustatyta, kad priimtina heksachlorbenzeno koncentracija maiste yra 1–100 μg/g; daugiau informacijos apie HCB įsisavinimo efektyvumą pateikta (47).

Žuvų maistą galima sodrinti bandomąja chemine medžiaga keliais būdais, atsižvelgiant į fizikines charakteristikas ir tirpumą (daugiau duomenų apie sodrinimo metodus pateikta 7 priedėlyje):

— jei cheminė medžiaga yra tirpi ir stabili trigliceriduose, ją prieš sumaišant su žuvų maistu reikėtų ištirpinti nedideliame žuvų taukų arba maistinio augalinio aliejaus kiekyje. Šiuo atveju reikėtų pasirūpinti, kad, atsižvelgiant į natūralų lipidų kiekį sodrintame maiste, nebūtų gaminamas per daug lipidų turintis racionas, pridedant žinomą minimalų aliejaus kiekį, kurio reikia bandomosios cheminės medžiagos paskirstymui ir homogeniškumui pasiekti; arba

— maistą reikėtų sodrinti naudojant tinkamą organinį tirpiklį, jei tai neblogina homogeniškumo ir biologinio įsisavinamumo (yra tikimybė, kad dėl tirpiklio garavimo gali susidaryti bandomosios cheminės medžiagos (mikro) kristalai ir nėra lengvo būdo įrodyti, kad taip neįvyko; žr. (49)); arba

— Neklampius skysčius reikėtų tiesiogiai įterpti į žuvų maistą, tačiau juos reikėtų gerai sumaišyti, kad būtų užtikrintas homogeniškumas ir palengvintas geras įsisavinamumas. Maišymo metodas turėtų užtikrinti sodrinto maisto homogeniškumą.

▼M7

Kai kuriais atvejais, pvz., kadangi mažiau hidrofobinių bandomųjų cheminių medžiagų desorbcija iš maisto yra labai tikėtina, paruoštas maisto granules reikėtų padengti plonu kukurūzų aliejaus ar žuvų taukų sluoksniu (žr. 142 pastraipą). Tokiais atvejais, kontrolinių ėminių maistas turėtų būti apdorojamas panašiai ir galutinai paruoštas maistas naudojamas lipidų kiekiui nustatyti.

Jei naudojamos etaloninės medžiagos, jų rezultatai turėtų būti palyginami su literatūroje pateiktais panašiomis sąlygomis atliktų tyrimų, naudojant palyginamą maisto normą, duomenimis (žr. 45 pastraipą), o etaloninei cheminei medžiagai būdingi parametrai turėtų atitikti taikytinus 113 pastraipos (3, 4 ir 5 punktų) kriterijus.

Jei kaip bandomosios cheminės medžiagos nešiklis naudojamas aliejus arba tirpiklis, to paties nešiklio (be bandomosios cheminės medžiagos) lygiavertį kiekį reikėtų sumaišyti su kontrolinio ėminio maistu, kad būtų užtikrintas lygiavertiškumas su sodrintu maistu. Svarbu, kad sugerties ir apsivalymo tarpsniais bandymo ir kontrolinės grupės būtų maitinamos vienodos mitybinės vertės maistu.

Sodrintą maistą reikėtų laikyti sąlygomis, kurios užtikrina bandomosios cheminės medžiagos stabilumą maisto mišinyje (pvz., laikyti šaldytuve), ir šias sąlygas pateikti ataskaitoje.

Žuvų rūšių parinkimas

Galima naudoti žuvų rūšis, nurodytas atliekant veikimo per vandeninę terpę metodą (žr. 32 pastraipą ir 3 priedėlį). Atliekant organinių cheminių medžiagų biologinio kaupimosi per maistą tyrimus prieš šio bandymų metodo paskelbimą, dažniausiai naudojamos rūšys buvo vaivorykštinis upėtakis (*Oncorhynchus mykiss*), karpis (*Cyprinus carpio*) ir juodoji drūtagalvė rainė (*Pimephales promelas*). Bandymo žuvų rūšys turėtų kuo sparčiau suėsti duodamą maisto normą, siekiant užtikrinti, kad visi veiksniai, kurie daro įtaką bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai maiste (pvz., išplovimas į vandenį ir veikimo per vandeninę terpę galimybė) pasireikštų kuo mažiau. Reikėtų naudoti žuvis, kurios atitiktų rekomenduojamą dydžio ir masės intervalą (žr. 3 priedėlį). Žuvys neturėtų būti per mažos, kad nebūtų apsunkinta atskirų žuvų analizė. Gyvavimo ciklo metu sparčiai augančios bandymų žuvų rūšys gali apsunkinti duomenų aiškinimą, o didelis augimo greitis gali daryti įtaką įsisavinimo efektyvumo skaičiavimui ([1]).

Žuvų laikymas

Priimtinumo kriterijai, susiję su aklimatizavimu, gaištamumu ir susirgimais, atitinka veikimo per vandeninę terpę metodo kriterijus, išmatavus laidumą prieš tyrimą (žr. 33–35 pastraipas).

BANDYMŲ EIGA

Pasirengimo tyrimui darbai ir intervalo nustatymo bandymas

Pasirengimo tyrimui analizės darbai yra būtini, kad būtų galima įrodyti cheminės medžiagos atgavimą iš prisodrinto maisto ar prisodrinto žuvų audinio. Intervalo nustatymo bandymas tinkamai koncentracijai maiste pasirinkti ne visada būtinas. Būtų galima atlikti parengiamuosius maisto davimo bandymus, turint tikslą įrodyti neigiamo poveikio nebuvimą, įvertinti sodrinto maisto skonines savybes

([1]) Dėl spartaus augimo sugerties tarpsnio metu tikroji maisto norma bus mažesnė nei nustatyta veikimo pradžioje.

▼M7

ir žuvų audinių bei maisto analizės metodo jautrį ir pasirinkti tinkamą maisto normą bei ėminių ėmimo intervalus apsivalymo tarpsnio metu ir kt., tačiau jie nėra privalomi. Parengiamasis tyrimas gali būti naudingas įvertinant apsivalymo tarpsniu imamų ėminių žuvų skaičių. Taip būtų galima žymiai sumažinti naudojamų žuvų skaičių, ypač jautrioms metabolizmui tiriamosioms cheminėms medžiagoms.

Veikimo sąlygos

Sugerties tarpsnio trukmė

Paprastai pakanka 7–14 parų trukmės sugerties tarpsnio, kurio metu viena žuvų grupė maitinama kontroliniu maistu, o kita žuvų grupė kasdien maitinama bandymo maistu esant nustatytam daviniui, kuris priklauso nuo žuvų bandymų rūšies ir bandymo sąlygų, pvz., vaivorykštiniam upėtakiui – nuo 1 iki 2 % kūno masės (šlapios kūno masės). Maisto norma turėtų būti parinkta taip, kad būtų išvengta greito augimo ir didelio lipidų kiekio padidėjimo. Jei reikia, atsižvelgiant į praktinę ankstesnių tyrimų patirtį ar turint bandomosios cheminės medžiagos (arba jos analogų) sugerties ir (arba) apsivalymo žuvyse duomenų, sugerties tarpsnis gali būti pratęstas. Bandymo pradžia nustatoma kaip laikas, kai žuviai pirmą kartą duodama sodrinto maisto. Bandymo para trunka nuo maisto davimo iki truputį anksčiau (pvz., viena valanda) nei kitas maisto davimo momentas. Taigi pirmoji bandymo sugerties tarpsnio para prasideda nuo pirmo sodrinto maisto davimo momento ir baigiasi beveik prieš pat sodrinto maisto davimą antrą kartą. Praktiškai sugerties tarpsnis baigiasi beveik prieš pat (pvz., viena valanda) pirmą kartą duodant bandomąja chemine medžiaga nesodrinto maisto, nes žuvis ir toliau virškina sodrintą maistą ir sugeria bandomąją cheminę medžiaga per tarpines 24 h. Svarbu užtikrinti, kad, atsižvelgiant į analizės metodą, sugertų pakankamai didelį (netoksinį) bandomosios cheminės medžiagos kiekį, kad apsivalymo metu būtų galima matuoti bent vienos eilės dydžio sumažėjimą. Specialiais atvejais sugerties tarpsnį galima pratęsti (iki 28 parų), imant papildomus ėminius, kad būtų galima įsigilinti į sugerties kinetiką. Per sugerties tarpsnį cheminės medžiagos koncentracija žuvyse gali nepasiekti nuostoviosios būsenos. Siekiant įvertinti nuostoviosios būsenos pasiekimo trukmę, kaip reikšmingos koncentracijos žuvyje gavimo tikėtinos trukmės rodiklį, galima taikyti veikimo per vandeninę terpę metodo skirtas lygtis (žr. 5 priedėlį).

Kartais gali būti žinoma, kad, dėl per mažo analizės jautrio ar įsisavinimo efektyvumo, per 7–14 parų žuvies sugertas cheminės medžiagos kiekis, esant naudojamai koncentracijai maiste, gali būti per mažas gauti koncentraciją, kuri leistų išmatuoti bent vienos eilės jos mažėjimą apsivalymo. Tokiais atvejais gali būti naudinga pratęsti pradinį maitinimo tarpsnį ilgiau nei 14 parų arba reikėtų atsižvelgti į galimybę padidinti koncentraciją maiste, ypač tų cheminių medžiagų, kurios yra labai jautrios metabolizmui. Tačiau reikėtų imtis priemonių užtikrinti, kad sugerties tarpsniu kūno sugertos medžiagos kiekis būtų mažesnis nei (įvertinta) lėtinio poveikio nebuvimo koncentracija (NOEC) žuvies audinyje (žr. 138 pastraipą).

Apsivalymo tarpsnio trukmė

Apsivalymas paprastai trunka ne ilgiau kaip 28 paras ir prasideda, kai bandymo grupės žuvys po sugerties tarpsnio gauna gryno, neapdoroto maisto. Apsivalymas prasideda ne iš karto po paskutinio sodrinto maisto davimo, bet pirmą kartą davus nesodrinto maisto, nes žuvis toliau virškins maistą ir įsisavins bandomąją cheminę medžiagą per tarpines 24 h, kaip nurodyta 126 pastraipoje. Todėl pirmasis apsivalymo tarpsnio ėminys imamas beveik prieš pat antrąjį maitinimą nesodrintu maistu. Per šį apsivalymo laikotarpį numatoma aptikti medžiagas, kurių galima pusėjimo trukmė yra iki 14 parų, nes ji atitinka biologiškai kauptis galinčių cheminių medžiagų savybes, todėl ([1]) 28 paros sudaro dvi tokių cheminių medžiagų pusėjimo

([1]) Atliekant veikimo per vandeninę terpę, 14 parų pusėjimo trukmė atitiktų maždaug 10 000 l/kg BCF, jei naudojamos 1 g žuvys ir atitinkamas sugerties greitis yra 500 l/kg/parai (pagal Sijm *et al* (46) lygtį).

▼M7

trukmes. Jei cheminių medžiagų biologinio kaupimosi geba yra labai didelė, gali būti naudinga pratęsti apsivalymo tarpsnį (jei tai rodo preliminarūs parengiamieji bandymai).

Jei cheminė medžiaga pasišalina labai lėtai, pvz., kai apsivalymo tarpsniu neįmanoma nustatyti tikslios pusėjimo trukmės, informacijos vis dar gali pakakti vertinimo tikslams, kad būtų pažymėta didelė biologinio kaupimosi geba. Ir atvirkščiai, jei cheminė medžiaga pasišalina taip greitai, kad patikima nulinio laiko koncentracija (koncentracija sugerties tarpsnio pabaigoje ar apsivalymo tarpsnio pradžioje $C_{0,d}$) ir k_2 negali būti apskaičiuotos, galima gauti sumažintą k_2 įvertį (žr. 7 priedėlį).

Jei žuvų analizė ankstesniais laikotarpiais (pvz., 7 arba 14 parą) rodo, kad cheminė medžiaga pasišalino ir jos kiekis sumažėjo iki mažesnės nei kiekybinio nustatymo koncentracija greičiau nei per 28 paras, ėminių galima nebeimti ir bandymą nutraukti.

Kartais gali būti taip, kad sugerties tarpsnio pabaigoje (ar antrame apsivalymo tarpsnio ėminyje) nenustatoma matuoti tinkama bandomosios cheminės medžiagos sugertis. Jei galima įrodyti, kad: i) yra atitiktis 113 pastraipoje nurodytiems tinkamumo kriterijams ir ii) sugerties nebuvimas nėra susijęs su kai kuriais kitais bandymo atlikimo trūkumais (pvz., nepakankama sugerties trukmė, dėl netinkamo maisto sodrinimo metodo yra per mažas biologinis įsisavinamumas, nepakankamas analizės metodo jautris, žuvys nevartoja maisto ir kt.), tyrimą galima nutraukti ir nekartoti taikant ilgesnę sugerties trukmę. Jei atliekant parengiamąjį darbą buvo įrodyta, kad tai yra būtent toks atvejis, būtų galima patarti atlikti, jei įmanoma, išmatų analizę, kaip masių balanso metodo dalį, neįsisavintai bandomajai cheminei medžiagai nustatyti.

Bandomųjų žuvų skaičius

Kaip ir atliekant veikimo per vandeninę terpę metodą, reikėtų pasirinkti panašios masės ir ilgio žuvis, kad mažiausios žuvies masė būtų ne mažesnė nei dvi trečiosios didžiausios žuvies masės (žr. 40–42 pastraipas).

Suminis tyrimo žuvų skaičius turėtų būti pasirinktas pagal ėminių ėmimo tvarkaraštį (ne mažiau kaip po vieną ėminį sugerties tarpsnio pabaigoje ir nuo keturių iki šešių ėminių apsivalymo tarpsnio metu, bet priklausomai nuo tarpsnių trukmės), atsižvelgiant į analizės metodo jautrį, koncentraciją, kuri galėtų būti sugerties tarpsnio pabaigoje (pagal ankstesnius duomenis) ir apsivalymo tarpsnio trukmę (jei galima įvertinti turint ankstesnių duomenų). Kiekvienu ėminio ėmimo atveju reikėtų ištirti nuo penkių iki dešimties žuvų, kurių augimo parametrai (masė ir visas ilgis) būtų išmatuoti prieš cheminės medžiagos ar lipidų analizę.

Dėl žuvų dydžio, augimo greičio bei fiziologijos ir galbūt dėl duodamo maisto kiekio, kurį suvartoja kiekviena žuvis, būdingo kintamumo, kiekvieną kartą reikėtų imti ne mažiau kaip penkių žuvų bandymo grupės ėminį ir penkių žuvų kontrolinės grupės ėminį, kad būtų tinkamai nustatyta vidutinė koncentracija ir jos kintamumas. Naudojamų žuvų parametrų kintamumas gali turėti daugiau įtakos visuminiam nekontroliuojamam bandymo kintamumui, nei taikomoms analizės metodikoms būdingas kintamumas, todėl kartais pasiteisina iki dešimties žuvų ėminys vienam ėminių ėmimo kartui. Tačiau, jei apsivalymo tarpsnio pradžioje neįmanoma išmatuoti kontrolinių žuvų foninės bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, gali pakakti tik dviejų ar trijų žuvų cheminės analizės galutiniu ėminių ėmimo laikotarpiu, jei likusių kontrolinių žuvų ėminiai būtų imami visuose taškuose masei ir visam ilgiui nustatyti (taigi augimui nustatyti imamas vienodas bandymo ir kontrolinių grupių žuvų skaičius). Žuvis reikėtų sukaupti, atskirai pasverti (netgi jei būtų taip, kad ėminio rezultatus reikėtų vėliau sujungti) bei išmatuoti jų visą ilgį.

▼M7

Atliekant tipinį bandymą, pvz., esant 28 parų apsivalymo trukmei ir apsivalymo tarpsnio metu imant penkis ėminius, reikėtų 59–120 žuvų bandymo grupei ir 50–110 žuvų kontrolinei grupei, darant prielaidą, kad cheminės medžiagos analizės metodas duoda galimybę nustatyti lipidų kiekį toje pačioje žuvyje. Jei lipidų analizei negalima panaudoti cheminės medžiagos analizei paimtos žuvies ir taip pat yra neįmanoma kontrolines žuvis naudoti vien tik lipidų analizei (žr. 56 pastraipą), reikėtų paimti papildomai dar 15 žuvų (tris iš pradinės populiacijos bandymo pradžioje, po tris iš kontrolinės ir bandymo grupės apsivalymo tarpsnio pradžioje ir po tris iš kontrolinės ir bandymo grupės bandymo pabaigoje). Žuvų ėmimo tvarkaraščio ir žuvų skaičiaus pavyzdys pateiktas 4 priedėlyje.

Įkrova

Panašiai kaip taikant veikimo per vandeninę terpę metodą (žr. 43 ir 44 pastraipas), reikėtų naudoti didelius vandens ir žuvų santykius. Nors atliekant šį bandymą žuvų įkrovos dydis neturi įtakos veikimo koncentracijai, rekomenduojamas įkrovos dydis yra 0,1–1,0 g žuvies (šlapios kūno masės) litrui vandens per parą, kad būtų galima užtikrinti reikiamą ištirpusio deguonies koncentraciją ir sumažinti bandymo organizmams keliamą stresą.

Bandymų maistas ir maitinimas

Aklimatizavimo laikotarpiu žuvis reikėtų maitinti tinkamu maistu, kaip aprašytą pirmiau (117 pastraipa). Jei bandymas atliekamas dinaminėmis sąlygomis, srautą reikėtų stabdyti žuvų maitinimo metu.

Bandymo grupės maistas atliekant bandymą turėtų atitikti pirmiau aprašytą (116–121 pastraipa). Pasirenkant tikslinę sodrinimo koncentraciją, reikėtų atsižvelgti ne tik į cheminei medžiagai būdingus veiksnius, analizės jautrį, tikėtiną koncentraciją maiste aplinkos sąlygomis ir lėtinio toksiškumo koncentracijos vertes ar kūno sugertą kiekį, bet ir į maisto skonines savybes (kad žuvis nenustotų jo ėsti). Ataskaitoje reikėtų pateikti bandomosios cheminės medžiagos nominalią sodrinimo koncentraciją. Atsižvelgiant į patirtį, sodrinimo koncentracija 1–1 000 μg/g yra praktinis darbinis intervalas, taikomas bandomosioms cheminėms medžiagoms, kurios nerodo specifinio toksiškumo mechanizmo. Jei cheminė medžiaga veikia ne pagal specifinį mechanizmą, likučių audiniuose koncentracija neturėtų būti didesnė kaip 5 μmol/g lipidų, nes dėl didesnio nei šis likučių kiekio gali pasireikšti lėtinis poveikis (19) (48) (50) ([1]). Dėl kitų cheminių medžiagų reikėtų imtis priemonių, kad dėl kaupiamojo poveikio nebūtų jokių neigiamų reiškinių (žr. 127 pastraipą). Tai ypač galioja tam atvejui, kai vienu metu bandoma daugiau kaip viena cheminė medžiaga (žr. 112 pastraipą).

Reikiamu bandomosios cheminės medžiagos kiekiu galima sodrinti žuvų maistą vienu iš trijų būdų, kaip aprašyta 119 pastraipoje ir 7 priedėlyje. Maisto sodrinimo metodus ir procedūras reikėtų aprašyti ataskaitoje. Kontrolinėms žuvims duodamas neapdorotas maistas, turintis lygiavertį nesodrinto aliejaus nešiklio kiekį, jei sugerties tarpsniu aliejus buvo naudojamas sodrintam maistui, arba apdorotas grynu tirpikliu, jei bandymo grupių maistui ruošti kaip nešiklis buvo naudojamas tirpiklis. Bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją apdorotame ir neapdorotame maiste reikėtų nustatyti sugerties tarpsnio pradžioje ir pabaigoje, atliekant ne mažiau kaip trijų kartotinių ėminių analizę. Nustojus žuvis veikti apdorotu maistu (sugerties tarpsniui), žuvys (abi grupės) maitinamos neapdorotu maistu (apsivalymo tarpsniu).

Žuvys maitinamos duodant nustatytą kiekį (kuris priklauso nuo rūšies; pvz., vaivorykštiniam upėtakiui – nuo 1 iki 2 % šlapios kūno masės per parą). Maisto norma turėtų būti parinkta taip, kad būtų išvengta greito augimo ir didelio lipidų kiekio padidėjimo. Reikėtų registruoti tikslią bandymui nustatytą maisto normą. Pradinė maisto norma turėtų būti pagrįsta reguliariu pradinės populiacijos masės

([1]) Kadangi faktinę vidinę koncentraciją galima nustatyti tik atlikus bandymą, būtinas tikėtinos vidinės koncentracijos įvertis (pvz., pagrįstas tikėtinu BMF ir koncentracija maiste; žr. 5 priedėlio A5.8 5 lygtį).

▼M7

matavimu prieš pat bandymo pradžią. Maisto kiekį reikėtų koreguoti, atsižvelgiant į ėminių žuvų šlapią kūno masę kiekvieną kartą imant ėminius bandymo metu. Bandymo ir kontrolinių indų žuvų masę ir ilgį galima įvertinti pagal žuvų, paimtų kiekvieną kartą imant ėminį, masę ir ilgį; bandymo ir kontroliniame inde likusių žuvų masė ir ilgis nematuojami. Svarbu visą bandymą užtikrinti vienodą nustatytą maisto normą.

Maitinimo procesą reikėtų stebėti, siekiant įsitikinti, ar žuvys akivaizdžiai suvartoja visą duotą maistą, nes tai užtikrintų, kad atliekant skaičiavimus bus naudojamos reikiamos suvartojimo normos. Reikėtų atsižvelgti į parengiamuosius maitinimo bandymus ar į ankstesnę patirtį, renkantis maisto normą, kuri užtikrintų, kad suvartojamas visas vienos paros maistas. Tuo atveju, kai maistas nuolat lieka nesuėstas, galbūt reikėtų paskirstyti dozę ilgesniam maitinimo laikotarpiui kiekvieną bandymo dieną (pvz., vietoj vienkartinio maitinimo duoti pusę kiekio du kartus per parą). Jei būtina maitinti antrą kartą, tai reikėtų daryti nustatytu laiku ir tokiu momentu, kad iki žuvų ėminių ėmimo būtų maksimalus laiko tarpas (pvz., antrąjį kartą maitinti bandymo paros pirmoje pusėje).

Nors paprastai žuvys suėda maistą greitai, svarbu užtikrinti, kad cheminė medžiaga liktų adsorbuota ant maisto Reikėtų imtis priemonių bandomosios cheminės medžiagos išsiskyrimui iš maisto į vandenį išvengti, nes tada, be veikimo per maistą, žuvis veiktų tam tikros koncentracijos bandomoji cheminė medžiaga vandenyje. Tai galima pasiekti pašalinant visus nesuėsto maisto likučius (ir išmatas) iš bandymo ir kontrolinių indų ne vėliau kaip per valandą, bet geriau, per 30 min nuo maitinimo. Be to, galima naudoti nuolatinio vandens valymo per aktyvintųjų anglių filtrą sistemą, kad būtų absorbuoti visi „ištirpę“ teršalai. Naudojant dinaminio bandymo sistemas, būtų lengviau greitai nuplauti maisto daleles ir ištirpusias chemines medžiagas ([1]). Kai kuriais atvejais problemą galėtų sumažinti šiek tiek pakeistas sodrinto maisto paruošimo metodas (žr. 119 pastraipą).

Šviesa ir temperatūra

Kaip ir taikant veikimo per vandeninę terpę metodą (žr. 48 pastraipą), rekomenduojama 12–16 h šviesiojo laikotarpio trukmė ir naudojamoms bandymų rūšims tinkama temperatūra (± 2 °C) (žr. 3 priedėlį). Reikėtų žinoti ir dokumentuoti apšvietimo tipą bei jo charakteristikas.

Kontroliniai ėminiai

Reikėtų naudoti vieną kontrolinę grupę, kurios žuvys maitinamos tuo pačiu maisto kiekiu kaip bandomosios grupės žuvys, bet be bandomosios cheminės medžiagos maiste. Jei kaip nešiklis bandymo grupės maistui sodrinti naudojamas aliejus ar tirpiklis, kontrolinės grupės maistas turėtų būti apdorotas visiškai vienodai, bet be bandomosios cheminės medžiagos, taigi bandymo grupės ir kontrolinės grupės maistas yra lygiavertis (žr. 121 ir 139 pastraipas).

([1]) Neįmanoma visiškai išvengti bandomosios cheminės medžiagos buvimo bandymo terpėje dėl žuvų išmatų ar dėl išplovimo iš maisto. Todėl viena iš galimybių būtų cheminės medžiagos koncentracijos vandenyje matavimas sugerties tarpsnio pabaigoje, ypač jei naudojama pusiau statinio bandymo schema, kad būtų galima nustatyti, ar paveikta per vandeninę terpę.

▼M7

Vandens kokybės matavimo dažnumas

Čia taip pat taikomos sąlygos, aprašytos veikimo per vandeninę terpę metodui, išskyrus tai, kad TOC reikia matuoti tik prieš bandymą, kaip bandymo vandens charakteristikų dalį (žr. 53 pastraipą).

Žuvų bei vandens ėminių ėmimas ir analizė

Žuvų maisto ėminių analizė

Reikėtų analizuoti bent tris kartotinius bandymo ir kontrolinio maisto ėminius bent sugerties tarpsnio pradžioje ir pabaigoje. Analizės metodai ir procedūros maisto homogeniškumui užtikrinti turėtų būti įtrauktos į ataskaitą.

Bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti analizuojama taikant nustatytą ir patvirtintą metodą. Reikėtų atlikti pasirengimo tyrimui darbus, kad būtų nustatyta kiekybinio nustatymo riba, atgavimo laipsnis procentais, trukdžiai ir numatomo ėminio matricos analizinis kintamumas. Jei bandoma žymėtoji medžiaga, reikėtų atsižvelgti į panašius aspektus kaip ir taikant veikimo per vandeninę terpę metodą, vandens analizę pakeičiant maisto analize (žr. 65 pastraipą).

Žuvų analizė

Kiekvieną kartą imant žuvų ėminį reikia imti po 5–10 žuvų iš poveikio ir kontrolinio apdorojimo indų (kai kuriais atvejais kontrolinio ėminio žuvų skaičių galima sumažinti; žr. 134 pastraipą).

Ėminius reikėtų imti kiekvieną bandymų dieną tuo pačiu metu (maitinimo laiko atžvilgiu), ir tokiu laiku, kad būtų kuo mažesnė tikimybė maistui likti virškinimo trakte sugerties tarpsnio metu ir pačioje apsivalymo tarpsnio pradžioje, siekiant išvengti klaidingo suminės bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos padidėjimo (t. y. žuvų ėminius reikėtų imti bandymų paros pabaigoje, turint omenyje, kad bandymų para prasideda maitinimo momentu ir baigiasi kito maitinimo momentu, maždaug po 24 h. Apsivalymo tarpsnis prasideda pirmą kartą davus nesodrinto maisto; žr. 128 pastraipą). Pirmasis apsivalymo tarpsnio ėminys (paimtas prieš pat antrąjį maitinimą nesodrintu maistu) yra svarbus, nes ekstrapoliavimas vieną parą atgal nuo šio matavimo naudojamas nulinio laiko koncentracijai įvertinti ($C_{0,d}$, koncentracija žuvyje sugerties tarpsnio pabaigoje ar apsivalymo tarpsnio pradžioje). Arba galima pašalinti virškinimo traktą ir jį analizuoti atskirai sugerties tarpsnio pabaigoje bei 1 ir 3 apsivalymo tarpsnio parą.

Kiekvieną kartą imant ėminį, žuvis reikėtų paimti iš abiejų bandymo indų ir apdoroti veikimo per vandeninę terpę metode taikytu būdu (žr. 61–63 pastraipas).

Kontrolinių ir bandymo grupių ėminių bandomosios cheminės medžiagos koncentracija visoje žuvyje (šlapios kūno masės atžvilgiu) matuojama bent sugerties tarpsnio pabaigoje ir visą apsivalymo etapą. Apsivalymo etapu rekomenduojama matuoti nuo keturių iki šešių kartų (pvz., 1, 3, 7, 14 ir 28 parą). Pasirinktinai galima imti papildomai dar vieną kartą 1–3 sugerties tarpsnio parą, kad būtų galima įvertinti įsisavinimo žuvimis efektyvumą tiesiniu sugerties tarpsniu,, kai dar esama beveik poveikio laikotarpio pradžioje. Yra du pagrindiniai nukrypimai nuo tvarkaraščio: i) jei sugerties kinetikai tirti sugerties tarpsnis pratęsiamas, bus papildomi ėminių ėmimo taškai sugerties tarpsnio metu, todėl reikės turėti papildomų žuvų (žr. 126 pastraipą); ii) jei tyrimas buvo nutrauktas sugerties tarpsnio pabaigoje dėl neišmatuojamos sugerties (žr. 131 pastraipą). Ėminiams imamas žuvis reikėtų atskirai pasverti (ir išmatuoti visą ilgį), kad būtų galima nustatyti

▼M7

augimo greičio konstantas. Cheminės medžiagos koncentraciją tam tikruose žuvų audiniuose (valgomų ir nevalgomų dalių) taip pat galima išmatuoti sugerties tarpsnio pabaigoje ir pasirinktais apsivalymo etapo tarpsnio momentais. Jei bandoma žymėtoji medžiaga, reikėtų atsižvelgti į panašius aspektus kaip ir taikant veikimo per vandeninę terpę metodą, vandens analizę pakeičiant maisto analize (žr. 65 pastraipą).

Jei periodiškai naudojama etaloninė cheminė medžiaga (žr. 25 pastraipą), pageidautina, kad koncentracija bandymo grupės žuvyse būtų matuojama sugerties tarpsnio pabaigoje ir visus bandomajai cheminei medžiagai nurodytus kartus apsivalymo tarpsniu (visos žuvies); koncentraciją kontrolinės grupės žuvyse reikėtų nustatyti sugerties tarpsnio pabaigoje (visos žuvies). Tam tikromis aplinkybėmis (pvz., jei nesutampa bandomosios cheminės medžiagos ir etaloninės cheminės medžiagos analizės metodai ir dėl to reikės papildomų žuvų, kad būtų galima atitikti ėminių ėmimo tvarkaraštį) galima taikyti kitą toliau nurodytą metodą, siekiant kiek įmanoma sumažinti papildomų žuvų skaičių. Etaloninės cheminės medžiagos koncentracijos vertės yra matuojamos tik 1 ir 3 apsivalymo tarpsnio parą ir dar du kartus, laiką pasirenkant taip, kad būtų gauti patikimi etaloninės cheminės medžiagos nulinio laiko koncentracijos ($C_{0,d}$) ir k_2 įverčiai.

Jei įmanoma, atskirų žuvų lipidų kiekį reikėtų nustatyti kiekvienu ėminių ėmimo atveju arba bent sugerties tarpsnio pradžioje bei pabaigoje ir apsivalymo tarpsnio pabaigoje (žr. 56 ir 67 pastraipas). Priklausomai nuo analizės metodo (žr. 67 pastraipą ir 4 priedėlį), galima naudoti tą pačią žuvį lipidų kiekiui ir bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatyti. Tokiems metodams teikiama pirmenybė dėl galimybės sumažinti žuvų skaičių. Tačiau, jei tai būtų neįmanoma, galima taikyti metodą, kuris aprašytas veikimo per vandeninę terpę bandymui (žr. 56 pastraipą dėl šių alternatyvių lipidų matavimo būdų). Bandymo ataskaitoje reikėtų pateikti lipidų kiekybinio nustatymo metodą.

Analizės metodo kokybė

Bandymų keliu reikėtų patikrinti, ar užtikrinamas cheminei medžiagai būdingo analizės metodo specifiškumas, tikslumas, preciziškumas ir atkuriamumas, taip pat bandomosios cheminės medžiagos atgavimo iš maisto ir žuvies laipsnis.

Žuvų augimo matavimas

Bandymo pradžioje reikia pasverti nuo penkių iki dešimties pradinės populiacijos žuvų ėminį ir išmatuoti jų visą ilgį. Šios žuvys turėtų būti imamos prieš pat pirmą sodrinto maisto davimą (pvz., likus vienai valandai) ir ėmimą priskirti 0 bandymų parai. Šio ėminio žuvų skaičius turėtų būti bent jau toks pat, kaip atliekant bandymą imamų ėminių. Kai kurios iš šių žuvų gali būti tos pačios žuvys, kurios buvo naudojamos lipidų analizei prieš sugerties tarpsnio pradžią (žr. 153 pastraipą). Kiekvieną kartą imant ėminius, žuvys sveriamos ir matuojamas jų ilgis. Kiekvienos žuvies atskirai išmatuotą masę ir ilgį reikėtų susieti su analizuojamos cheminės medžiagos koncentracija (ir lipidų kiekiu, jei taikoma), pvz., naudojant unikalų identifikavimo kodą kiekvienai ėminio žuviai. Šių ėminiams paimtų žuvų matavimai taip pat gali būti naudojami bandymo ir kontroliniuose induose likusių žuvų masei ir ilgiui įvertinti.

Įvertinimas atliekant bandymus

Gaištamumą reikėtų stebėti ir registruoti kasdien. Reikėtų papildomai stebėti neigiamus reiškinius, pvz., nenormalų elgesį ar pigmentines dėmes, ir duomenis registruoti. Žuvis laikoma negyva, jei negalima aptikti kvėpavimo judesių ir reakcijos į nestiprius mechaninius dirgiklius. Visas negyvas arba aiškiai gaištančias žuvis reikėtų pašalinti.

▼M7

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

Bandymų rezultatai naudojami apsivalymo greičio konstantai (k_2) kaip žuvies visos šlapios kūno masės funkcijai gauti. Prireikus apskaičiuojama augimo greičio konstanta, k_g, pagrįsta žuvies masės vidutiniu padidėjimu, ir ji naudojama apsivalymo greičio konstantai su pataisa dėl augimo k_{2g} gauti. Be to, reikėtų pateikti įsisavinimo efektyvumą (a; absorbciją iš virškinimo trakto), kinetinį biomagnifikacijos faktorių (BMF_K) (jei būtina, su pataisa dėl augimo BMF_{Kg}), jo vertę su pataisa dėl lipidų (BMF_{KL} arba BMF_{KgL}, jei daroma praskiedimo dėl augimo pataisa) ir maisto normą. Taip pat, jei galima gauti nuostoviosios būsenos pasiekimo sugerties tarpsniu trukmės įvertį (pvz., 95 % nuostoviosios būsenos arba $t_{95} = 3{,}0/k_2$), galima įtraukti nuostoviosios būsenos BMF (BMF_{SS}) (žr. 105 bei 106 pastraipas ir 5 priedėlį), jei t_{95} vertė rodo, kad galėjo būti pasiektos nuostoviosios būsenos sąlygos. Šiam BMF_{SS} reikėtų taikyti tą pačią pataisą dėl lipidų, kaip ir kinetiniu metodu gautam BMF (BMF_K), kad būtų gauta vertė su pataisa dėl lipidų BMF_{SSL} (reikia pažymėti, kad nėra sutartos procedūros kaip gauti nuostoviosios būsenos BMF praskiedimo dėl augimo pataisą). Formulės ir skaičiavimo pavyzdžiai pateikti 7 priedėlyje. Yra metodų, kuriuos taikant įmanoma įvertinti kinetinį biologinio koncentravimo faktorių (BCF_K) pagal veikimo per maistą tyrimo duomenis. Tai aptariama 8 priedėlyje.

Žuvų masės ir ilgio duomenys

Atskirų žuvų šlapios kūnomasės ir viso ilgio duomenys, gauti kiekvieną kartą imant ėminius sugerties tarpsniu (pradinės populiacijos – sugerties tarpsnio pradžioje, kontrolinės grupės ir bandymo grupės – sugerties tarpsnio pabaigoje ir, jei atliekama, sugerties tarpsnio pačioje pradžioje, pvz., sugerties tarpsnio 1–3 parą) ir apsivalymo tarpsniu (kontrolinės ir bandymo grupės – pvz., 1, 2, 4, 7, 14, 28 parą) įtraukiami į lenteles atskirai bandymo ir kontrolinių ėminių grupei. Masei kaip augimo matui teikiama pirmenybė darant praskiedimo dėl augimo pataisą. Metodai, taikomi darant duomenų praskiedimo dėl augimo pataisą, pateikti toliau (162 ir 163 pastraipos) ir 5 priedėlis.

Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos žuvyje duomenys

Bandomosios cheminės medžiagos likučių atskiroje žuvyje (arba jungtinių žuvų ėminių, jei atskirų žuvų matavimas neįmanomas) kiekiai, gauti kiekvieną kartą imant ėminius ir išreikšti koncentracija (w/w) šlapios kūno masės atžvilgiu, įtraukiami į lenteles atskirai bandymo ir kontrolinių ėminių grupei. Jei buvo atlikta kiekvienos ėminio žuvies lipidų analizė, galima gauti ir įtraukti į lenteles atskiras koncentracijos vertes su pataisa dėl lipidų, išreikštas lipidų koncentracija (w/w lipidų).

— Bandomosios cheminės medžiagos likučių atskiroje žuvyje (arba jungtinių žuvų ėminių, jei atskirų žuvų matavimas neįmanomas, žr. 66 pastraipą) kiekiai, gauti apsivalymo tarpsniu, perskaičiuojami į natūraliuosius logaritmus ir pateikiami kaip laiko (paros) funkcijos kreivė. Jei apžiūrint kreives aiškiai matomi riktai, galima taikyti statistiškai pagrįstą riktų kriterijų, kad būtų pašalinti klaidingi duomenų taškai, taip pat pateikti dokumentuotą jų pašalinimo pagrindimą;

— Mažiausiųjų kvadratų metodu skaičiuojama tiesinė ln(koncentracijos) kaip apsivalymo trukmės (paros) duomenų koreliacija. Tiesės krypties koeficientas ir atkarpa yra pateikiami ataskaitoje kaip visuminė apsivalymo greičio konstanta (k_2) ir kaip gautos nulinio laiko koncentracijos ($C_{0,d}$) natūralusis logaritmas (daugiau duomenų pateikta 5 ir 7 priedėliuose). Jei tai būtų neįmanoma dėl tos priežasties, kad antrojo apsivalymo tarpsnio ėminio koncentracija yra mažesnė nei kiekybinio nustatymo riba, galima pateikti sumažintą k_2 įvertį (žr. 7 priedėlį).

— Taikant standartines statistines procedūras, apskaičiuojamos tiesės krypties koeficiento ir atkarpos dispersijos ir įvertinami bei pateikiami 90 % (ar 95 %) pasikliovimo intervalai apie šiuos rezultatus.

▼M7

— Taip pat apskaičiuojama vidutinė žuvų koncentracija paskutinę sugerties dieną (išmatuota nulinio laiko koncentracija $C_{0,m}$) ir palyginama su $C_{0,d}$ apskaičiuota vertė. Jei apskaičiuota vertė yra mažesnė nei išmatuota vertė, skirtumas gali reikšti nesuvirškinto sodrinto maisto buvimą virškinimo trakte. Jei apskaičiuota vertė yra gerokai didesnė nei išmatuota vertė, tai gali rodyti, kad vertė, gauta atliekant apsivalymo duomenų tiesinę regresiją, yra klaidinga ir ją reikėtų įvertinti iš naujo (žr. 7 priedėlį).

Apsivalymo greitis ir biomagnifikacijos faktorius

Turint duomenis biomagnifikacijos faktoriui apskaičiuoti, iš pradžių reikėtų gauti įsisavinimo efektyvumo vertę (bandomosios cheminės medžiagos absorbciją per virškinimo traktą, α). Šią vertę reikėtų gauti pagal 7 priedėlio A7.1 lygtį, pagal kurią reikia žinoti apskaičiuotą apsivalymo tarpsnio nulinio laiko koncentraciją žuvyje ($C_{0,d}$), (visuminę) apsivalymo greičio konstantą (k_2), koncentraciją maiste (C_{maisto}), maisto suvartojimo normą (I) ir sugerties tarpsnio trukmę (t). Gautas tiesinės priklausomybės tarp ln(koncentracijos) ir apsivalymo trukmės krypties koeficientas ir atkarpa ataskaitoje pateikiami kaip visuminė apsivalymo greičio konstanta (k_2 = krypties koeficientui) ir nulinio laiko koncentracija ($C_{0,d}$ = $e^{atkarpa}$), kaip minėta pirmiau. Apskaičiuotas vertes reikėtų tikrinti dėl biologinio patikimumo (pvz., ar įsisavinimo efektyvumas kaip trupmena nėra didesnis už 1). *(I)* skaičiuojamas maisto masę dalijant iš kasdien maitinamos žuvies masės (jei dozė – 2 % kūno masės, (*I)* bus 0,02). Tačiau skaičiavimams naudojamai maisto normai gali prireikti pataisos dėl žuvies augimo (tai galima daryti, naudojant žinomą augimo greičio konstantą žuvies masės įverčiui gauti kiekviename sugerties tarpsnio laiko taške; žr. 7 priedėlį). Tais atvejais, kai k_2 ir $C_{0,d}$ negali būti apskaičiuotos, pvz., dėl to, kad antrojo apsivalymo tarpsnio ėminio koncentracija yra mažesnė nei kiekybinio nustatymo riba, galima gauti mažesnį k_2 įvertį ir BMF_k „viršutinę ribą“ (žr. 7 priedėlį).

Gavus įsisavinimo efektyvumo vertę (α), galima apskaičiuoti biomagnifikacijos faktorių, dauginant α iš suvartojimo normos (I) ir dalijant iš (visuminės) apsivalymo greičio konstantos (k_2). Biomagnifikacijos faktorius su pataisa dėl augimo yra apskaičiuojamas tokiu pat būdu, bet naudojant apsivalymo greičio konstantą su pataisa dėl augimo (k_{2g}; žr. 162 ir 163 pastraipas. Galima gauti alternatyvų įsisavinimo efektyvumo įvertį, jei žuvų audinių analizė buvo atliekama sugerties tarpsnio ankstyvuoju tiesiniu tarpsniu; žr. 151 pastraipą ir 7 priedėlį. Ši vertė atitinka nepriklausomą įsisavinimo efektyvumo įvertį, gauta iš esmės tada, kai organizmas dar nebuvo paveiktas (t. y. žuvis yra pačioje sugerties tarpsnio pradžioje). Įsisavinimo efektyvumo įvertis, gautas pagal apsivalymo duomenis, paprastai naudojamas BMF skaičiuoti.

Pataisa dėl lipidų ir praskiedimo dėl augimo pataisa

Dėl žuvų augimo apsivalymo tarpsniu išmatuota cheminės medžiagos koncentracija žuvyje gali būti mažesnė, dėl to visuminė apsivalymo greičio konstanta k_2 yra didesnė nei jį būtų vien dėl pašalinimo procesų (pvz., metabolizmo, šalinimo iš organizmo) (žr. 72 pastraipą). Bandymo žuvų lipidų kiekis (kuris yra labai susijęs su hidrofobinių cheminių medžiagų biologiniu kaupimusi) ir maisto lipidų kiekis praktiškai gali gerokai skirtis, todėl būtina jų kiekio pataisa biomagnifikacijos faktoriams pateikti prasmingu būdu. Reikėtų daryti biomagnifikacijos faktoriaus dėl augimo praskiedimo pataisą (kuri daroma kinetiniam BCF, taikant veikimo per vandeninę terpę metodą) ir pataisą dėl maisto lipidų kiekio palyginti su žuvies lipidų kiekiu (pataisos dėl lipidų faktorius). Šių skaičiavimų lygtys ir pavyzdžiai pateikti 5 ir 7 priedėliuose.

Reikėtų apskaičiuoti apsivalymo greičio konstantą su pataisa dėl augimo (k_{2g}), kad būtų galima daryti praskiedimo dėl augimo pataisą (lygtys pateiktos 5 priedėlyje). Vėliau ši apsivalymo greičio konstanta su pataisa dėl augimo (k_{2g}) naudojama biomagnifikacijos faktoriui su pataisa dėl augimo skaičiuoti kaip 73 pastraipoje. Kai kuriais atvejais šis metodas netinka. Alternatyvus metodas, kurį taikant nereikia daryti praskiedimo dėl augimo pataisos, kai apsivalymo duomenys gaunami naudojant bandomosios cheminės medžiagos masę vienoje žuvyje (pagal visos žuvies masę), o ne įprastiniai (koncentravimo) duomenys,

▼M7

gaunami kaip bandomosios cheminės medžiagos masė žuvies masės vienetui. Šiuos duomenis galima nesunkiai gauti, nes bandymai pagal šį metodą turėtų susieti audiniui registruotas koncentracijos vertes su atskirų žuvų mase. Paprasta šių veiksmų atlikimo procedūra apibūdinta 5 priedėlyje. Reikia pažymėti, kad, netgi taikant šį alternatyvų metodą, k_2 vis tiek reikėtų įvertinti ir pateikti ataskaitoje.

Jei reikia daryti pataisą dėl žuvų ir maisto lipidų kiekio, kai buvo atliekama ne visų ėminiams paimtų žuvų lipidų analizė, gaunamos vidutinės žuvų ir maisto lipidų dalys (masės w/w) ([1]). Paskui, žuvų lipidų dalies vidurkį dalijant iš maisto lipidų dalies vidurkio, apskaičiuojamas pataisos dėl lipidų faktorius (L_c). Biomagnifikacijos faktorius, su pataisa dėl augimo arba be jos, jei taikoma, dalijamas iš pataisos dėl lipidų faktoriaus biomagnifikacijos faktoriui su pataisa dėl lipidų gauti.

Jei cheminės medžiagos ir lipidų analizė buvo atliekama su ta pačia žuvimi kiekviename ėminių ėmimo taške, atskirų žuvų pagal lipidus pataisytus duomenis galima naudoti pagal lipidus pataisytam BMF tiesiogiai apskaičiuoti (žr. (37)). Pagal koncentracijos su pataisa dėl lipidų duomenis gaunama $C_{0,d}$ ir k_2. Matematinę analizę galima tęsti naudojant tas pačias 7 priedėlio lygtis, bet įsisavinimo efektyvumas (a) apskaičiuojamas imant pagal lipidus normalizuotą maisto suvartojimo normą (I_{lipidai}) ir koncentraciją maiste pagal lipidus ($C_{\text{maistas-lipidai}}$). Tada parametrai su pataisa dėl lipidų panašiu būdu naudojami BMF apskaičiuoti (reikia pažymėti, kad augimo greičio konstantos pataisa turėtų būti taikoma pagal lipidų dalį, o ne pagal žuvies šlapią kūno masę, kad būtų apskaičiuotas BMF_{KgL} su pataisa dėl lipidų ir dėl augimo).

Rezultatų aiškinimas

Bandymo ir kontrolinių grupių vidutiniai augimo duomenys iš esmės neturėtų reikšmingai skirtis, kad būtų pašalintas toksinis poveikis. Abiejų grupių augimo greičio konstantas arba augimo kreives reikėtų lyginti taikant tinkamą procedūrą ([2])

Bandymo ataskaita

Baigus tyrimą, rengiama galutinė ataskaita, kurioje pateikiama informacija apie *bandomąją cheminę medžiagą*, *bandymų rūšis* ir *Bandymo sąlygas*, kaip išvardyta 81 pastraipoje (taikant veikimo per vandeninę terpę metodą). Be to, būtina ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— Visa informacija apie bandomosios cheminės medžiagos stabilumą paruoštame maiste;

([1]) Šis metodas taikomas tik mitybos tyrimui, kuris skiriasi nuo veikimo per vandeninę terpę metodo, todėl, siekiant nesupainioti, taikomas žodis „pataisa“, o ne „normalizavimas“, taip pat žr. išnašą 106 pastraipoje.

([2]) Augimo greičio konstantas galima įvertinti taikant Stjudento t kriterijų, kad būtų galima patikrinti, ar yra skirtumas tarp kontrolinių ir bandymo grupių, arba F kriterijų, jei atliekama dispersinė analizė. Jei reikia, galima taikyti F kriterijų arba tikėtinumo santykio kriterijų, kad būtų lengviau pasirinkti tinkamą augimo modelį (EBPO monografija 54 (32)).

▼M7

Bandymo sąlygos

— Cheminės medžiagos nominali koncentracija maiste, sodrinimo būdas, (lipidų) nešiklio kiekis, naudotas sodrinant maistą (jei taikoma), bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos sodrintame maiste matavimo duomenys, atliekant kiekvieną analizę (ne mažiau kaip trys kartotiniai ėminiai prieš tyrimo pradžią ir sugerties tarpsnio pabaigoje), ir vidutinės vertės;

— aliejaus ar tirpiklio tipas ir kokybė (rūšis, tiekėjas ir kt.), jei naudojamas kaip nešiklis maistui sodrinti;

— naudoto maisto tipas (apytikriai analizės duomenys [1]), rūšis ar kokybė, tiekėjas ir kt.), maisto norma sugerties tarpsniu, maisto porcijos dydis ir dažnumas (įskaitant visas pataisas dėl ėminių žuvų masės);

— žuvų surinkimo ir numarinimo laikas kiekvieną kartą imant ėminius cheminei analizei atlikti (pvz., vieną valandą iki kitos dienos maitinimo);

Rezultatai:

— visų parengiamųjų tyrimų rezultatai;

— visų pastebėtų neigiamų reiškinių aprašymas;

— visų taikytų cheminės analizės procedūrų aprašymas, įskaitant aptikimo ir kiekybinio nustatymo ribas, kintamumą ir atgavimo laipsnį;

— išmatuota lipidų koncentracija maiste (sodrintame ir kontroliniame maiste), atskiros vertės, vidutinės vertės ir standartiniai nuokrypiai;

— kontrolinės ir veikiamosios grupių žuvų masės (ir ilgio) duomenų, susijusių su atskira žuvimi, lentelės (pvz., naudojant unikalų kiekvienos žuvies identifikavimo kodą), skaičiavimai ir gautos (-ų) augimo greičio konstantos (-ų) bei 95 % pasikliovimo intervalas (-ai);

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos žuvyse, vidutinės koncentracijos, išmatuotos sugerties tarpsnio pabaigoje ($C_{0,m}$), apskaičiuotos (visuminės) apsivalymo greičio konstantos (k_2) ir koncentracijos žuvyje apsivalymo tarpsnio pradžioje ($C_{0,d}$) duomenų lentelės kartu su šių verčių dispersija (krypties koeficientas ir atkarpa);

— žuvų lipidų kiekio (pateikto tam tikrų cheminės medžiagos koncentracijos verčių atžvilgiu, jei taikoma), bandymo grupės ir kontrolinės grupės vidutinių verčių bandymo pradžioje, sugerties pabaigoje ir apsivalymo tarpsnio pabaigoje duomenų lentelės;

— kreivės (įskaitant visus matavimo duomenis), kurios vaizduoja (jei taikoma, koncentracijos vertes galima išreikšti viso gyvūno kūno masės ar jo audinių masės atžvilgiu):

  — augimą, t. y. žuvies masę (ir ilgį) arba į natūralųjį logaritmą transformuotą masę kaip laiko funkciją;

[1] Maisto analizės metodas baltymų, lipidų, ląstelienos ir pelenų kiekiui nustatyti; šią informaciją paprastai galima gauti iš maisto tiekėjo.

▼M7

— bandomosios cheminės medžiagos apsivalymo žuvyje eigą; ir

— į natūralųjį logaritmą transformuotą koncentraciją (ln koncentracijos) kaip apsivalymo trukmės funkciją (įskaitant apskaičiuotą apsivalymo greičio konstantą k_2), ir iš natūraliojo logaritmo apskaičiuotą koncentraciją žuvyje apsivalymo tarpsnio pradžioje ($C_{0,d}$).

— jei apžiūrint kreives aiškiai matomi riktai, galima taikyti statistiškai pagrįstą riktų kriterijų, kad būtų pašalinti klaidingi duomenų taškai, taip pat galima pateikti dokumentuotą jų pašalinimo pagrindimą;

— apskaičiuota apsivalymo greičio konstanta su pataisa dėl augimo ir pusėjimo trukmė su pataisa dėl augimo;

— apskaičiuotas įsisavinimo efektyvumas (α).

— „neapdorotas“ mitybos BMF, kinetinis BMF su pataisa dėl lipidų ir praskiedimo dėl augimo pataisa („neapdorotas“ ir su pataisa dėl lipidų pagal viso žuvies šlapią kūno masę), audiniams būdingas BMF, jei taikomas;

— visa informacija apie žymėtosios bandomosios cheminės medžiagos metabolitus ir jų kaupimąsi;

— visi neįprasti reiškiniai bandymo metu, visi nukrypimai nuo šių procedūrų ir kita tinkama informacija;

— tokia reikiamų išmatuotų ir apskaičiuotų duomenų suvestinė lentelė:

Cheminės medžiagos apsivalymo greičio konstantos ir biomagnifikacijos faktoriai (BMF_K)

k_g (augimo greičio konstanta, paros^{-1}):	Įrašyti vertę (95 % PI) (1)
k_2 (visuminė apsivalymo greičio konstanta, paros^{-1}):	Įrašyti vertę (95 % PI)
k_{2g} (apsivalymo greičio konstanta su pataisa dėl augimo, paros^{-1}):	Įrašyti vertę (95 % PI) (1)
$C_{0,m}$ (išmatuota nulinio laiko koncentracija, koncentracija žuvyje sugerties tarpsnio pabaigoje) (μg/g):	Įrašyti vertę ± SN (2)
$C_{0,d}$ (apsivalymo tarpsnio apskaičiuota nulinio laiko koncentracija, μg/g):	Įrašyti vertę ± SN (2)
I (nustatyta maisto suvartojimo norma, g maisto/g žuvies/parai):	Įrašyti vertę
I_g (efektyvioji maisto norma su pataisa dėl augimo, g maisto/g žuvies/parai) (2):	Įrašyti vertę ± SN (2)
C_{food} (cheminės medžiagos koncentracija maiste, μg/g):	Įrašyti vertę ± SN (2)
α (cheminės medžiagos įsisavinimo efektyvumas):	Įrašyti vertę ± SN (2)
BMF_K (kinetinis mitybos BMF):	Įrašyti vertę (95 % PI) (2)
BMF_{Kg} (kinetinis mitybos BMF su pataisa dėl augimo):	Įrašyti vertę (95 % PI) (1)

▼M7

Cheminės medžiagos apsivalymo greičio konstantos ir biomagnifikacijos faktoriai (BMF_K)

$t_{1/2g}$ (pusėjimo trukmė su pataisa dėl augimo, paros):	Įrašyti vertę ± SN ([2])
*L*c (pataisos dėl lipidų faktorius):	Įrašyti vertę
BMF_{KgL} (kinetinis mitybos BMF su pataisa dėl lipidų):	Įrašyti vertę
$BMF_{SS\text{-}L}$ (nuostoviosios būsenos būdingasis BMF su pataisa dėl lipidų) ([2]):	Įrašyti vertę ± SN ([2])

([1]) PI – pasikliovimo intervalas (jei įmanoma įvertinti);
([2]) SN – standartinis nuokrypis (jei įmanoma įvertinti).

LITERATŪRA

(1) Šio priedo C.13 skyrius. Biologinis koncentravimas. Dinaminis bandymas su žuvimis.

(2) Šio priedo A.6 skyrius. Tirpumas vandenyje.

(3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. Environ Toxicol Chem 12: 2031-2035

(4) *Šio priedo A.8 skyrius.* Pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolio / vandens*). Kratomos kolbos metodas.*

(5) *Šio priedo A.24 skyrius.* Pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolio / vandens*). Didelio slėgio skysčių chromatografijos (HPLC) metodas.*

(6) *Šio priedo A.23 skyrius.* Pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolio / vandens*). Lėto maišymo metodas.*

(7) Šio priedo C.7 skyrius. Hidrolizė kaip pH funkcija.

(8) (OECD (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

(9) *Šio priedo A.5 skyrius.* Paviršiaus įtemptis. Vandeninių tirpalų paviršiaus įtemptis.

(10) Šio priedo A.4 skyrius. Garų slėgis.

(11) Šio priedo C.4 skyrius. Lengvas biologinis skaidumas.

(12) Šio priedo C.29 skyrius. Lengvas biologinis skaidumas. CO_2 sandariuose induose.

(13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102: 117-156.

(14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

(15) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

▼M7

(16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35: 4097-4102.

(17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelletized fish food. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2058-2062.

(18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2′, 5,5′-tetrachlorobiphenyl. Toxicol. Sci. 77: 206-218.

(19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. Integr. Environ. Assess. Manag. 4: 139-155.

(20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2436-2448.

(21) Schlechtriem C., Fliedner A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. Environmental Sciences Europe 2012, 24:13. published: 3 April 2012.

(22) *Šio priedo C.47 skyrius.* Toksiškumo ankstyvųjų gyvenimo stadijų žuvims bandymas.

(23) Šio priedo C.15 skyrius. Trumpalaikio toksiškumo žuvims bandymas embriono ir trynio maišelio stadijose.

(24) Šio priedo C.14 skyrius. Žuvų mailiaus augimo bandymas.

(25) OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

(26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.

(27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.

(28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA

(29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.

(30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. Limnol. Oceanogr. 30: 1099-1105.

(31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. Analyst. 124: 1711-1718.

(32) OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/-MONO(2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

(33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

(34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.

(35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

(36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.

(37) Fisk A.T., Cymbalisty C.D., Bergman Ã. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C_{12}- and C_{16}-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem. 15: 1775-1782.

(38) Anonymous (2004), Fish, dietary bioaccumulation study – Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(39) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, Toxicol. Environ. Chem. 7: 173-189.

(41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. Chemosphere. 14: 829-833.

(42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

(43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. Toxicol. Sci. 77: 219-229.

(44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

(45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. Environ. Sci. Technol. 29: 2769-2777.

(46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. Environ. Toxicol. Chem. 17: 951-961.

(48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2503-2517.

(49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.

▼M7

(50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. Environ. Sci. Technol. 27: 1718-1728.

(51) OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I – Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II – Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO(2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Įsisavinimo efektyvumas (α) – iš virškinimo trakto į organizmą absorbuotos cheminės medžiagos santykinio kiekio matas (α yra nedimensinis dydis, bet dažnai išreiškiamas procentais, o ne dalimi).

Biologinis kaupimasis – paprastai nurodomas kaip procesas, kuriam vykstant cheminės medžiagos koncentracija organizme pasiekia lygį, didesnį nei kvėpavimo terpėje (pvz., žuvims – vandenyje, žinduoliams – ore), maiste ar abiejose terpėse (1).

Biologinis koncentravimas – bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos didėjimas organizme (ar tam tikruose jo audiniuose) arba organizmo paviršiuje palyginti su bandomosios cheminės medžiagos koncentracija aplinkinėje terpėje.

Biologinio koncentravimo faktorius (BCF ar K_B) yra bandomosios cheminės medžiagos koncentracija žuvies viduje ir jos paviršiuje ir (arba) tam tikruose audiniuose bet kuriuo šio kaupimosi bandymo įsisavinimo etapo momentu (C_f, išreikšta mg/kg), padalyta iš cheminės medžiagos koncentracijos aplinkinėje terpėje (C_w, išreikšta mg/l). BCF yra išreiškiamas $l \cdot kg^{-1}$. Reikia atkreipti dėmesį į tai, kad neatsižvelgiama į pataisas dėl augimo ir (arba) etaloninio lipidų kiekio.

Biomagnifikacija yra yra bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos didėjimas organizme ar organizmo paviršiuje (arba tam tikruose jo audiniuose), susijęs su bandomosios cheminės medžiagos koncentracija maiste.

Biomagnifikacijos faktorius (BMF) yra bandomosios cheminės medžiagos koncentracija plėšrūne palyginti su jos koncentracija plėšrūno grobyje (ar maiste) esant nuostoviajai būsenai. Taikant šiose gairėse aprašytą bandymų metodą, griežtai vengiama veikimo per vandeninę terpę metodo, todėl šio bandymų metodo BMF vertė negali būti tiesiogiai lyginama su BMF verte, gauta atliekant tyrimą lauko sąlygomis (kai galima sujungti veikimą per vandeninę terpę ir mitybą).

Mitybos biomagnifikacijos faktorius (mitybos BMF) yra terminas, taikomas šiame bandymų metode mitybos bandymo rezultatui apibūdinti, kai griežtai vengiama veikimo per vandeninę terpę metodo, todėl šio bandymų metodo mitybos BMF negali būti tiesiogiai lyginamas su BMF verte, gauta atliekant lauko tyrimą (kai galima sujungti veikimą per vandeninę terpę ir mitybą).

Apsivalymo arba (netekimo) tarpsnis po veikimo yra laikas nuo to momento, kai bandymo žuvis buvo pernešta iš terpės su bandomąja chemine medžiaga į jos neturinčią terpę, kuomet tiriamas apsivalymas nuo šios medžiagos žuvyje (arba tam tikruose audiniuose) (arba suminis sumažėjimas).

Apsivalymo (netekimo) greičio konstanta (k_2) yra skaitinė vertė, apibūdinanti bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos žuvyje arba jos paviršiuje (arba tam tikruose jos audiniuose) mažėjimo greitį, bandymo žuvį pernešus iš terpės su bandomąja chemine medžiaga į jos neturinčią terpę (k_2 išreiškiama $para^{-1}$).

Ištirpusi organinė anglis (DOC) yra anglies, gautos iš bandymų terpėje ištirpusių organinių anglies šaltinių, koncentracijos matas.

Veikimo arba sugerties tarpsnis yra laikas, kurį žuvis yra veikiama bandomąja chemine medžiaga.

Maisto suvartojimo norma (I) yra per parą kiekvienos žuvies suvartoto maisto vidutinio kiekio santykis su žuvies viso kūno masės įverčiu (išreiškiamas g maisto/g žuvies/parai).

▼M7

Kinetinis biologinio koncentravimo faktorius (BCF_K) yra sugerties greičio konstantos k_1 santykis su apsivalymo greičio konstanta k_2 (t. y. k_1/k_2 – žr. atitinkamas šio priedėlio apibrėžtis). Iš esmės ši vertė turėtų būti palyginama su BCF_{SS} (žr. pirmiau pateiktą apibrėžtį), bet gali būti nuokrypių, jei nuostovioji būsena buvo neapibrėžta arba jei kinetiniam BCF buvo taikomos pataisos dėl augimo.

Pagal lipidus normalizuotas kinetinis biologinio koncentravimo faktorius (BCF_{KL}) yra normalizuotas pagal žuvį, kurioje lipidų kiekis sudaro 5 %.

Pagal lipidus normalizuotas kinetinis biologinio koncentravimo faktorius su pataisa dėl augimo (BCF_{KgL}) yra normalizuotas pagal žuvį, kurioje lipidų kiekis sudaro 5 %, ir pataisytas dėl augimo tyrimo laikotarpiu, kaip aprašyta 5 priedėlyje.

Pagal lipidus normalizuotas nuostoviosios būsenos biologinio koncentravimo faktorius (BCF_{SSL}) yra normalizuotas pagal žuvį, kurioje lipidų kiekis sudaro 5 %.

REACH tikslams daugiakomponentė medžiaga apibrėžiama kaip medžiaga, sudaryta iš daugiau kaip vienos sudedamosios dalies, kurios koncentracija yra nuo 10 % iki 80 % (masės).

Pasiskirstymo tarp oktanolio ir vandens koeficientas (K_{OW}) yra cheminės medžiagos tirpumo *n*-oktanolyje ir vandenyje pusiausvyrasis santykis (A.8 (2), A.24 (3), A.23 metodai(4)); taip pat išreiškiamas kaip P_{OW}. K_{OW} logaritmas naudojamas kaip cheminės medžiagos biologinio koncentravimo vandens organizmuose gebos rodiklis.

Kietųjų dalelių organinė anglis (POC) yra anglies, gautos iš bandymų terpėje suspenduotų organinių anglies šaltinių, koncentracijos matas.

Mikroekstrahavimas kietąja faze – (angl. *Solid-phase microextraction*, SPME) yra praskiestoms sistemoms sukurtas analizės metodas, kuriame nenaudojami tirpikliai. Pagal šį metodą polimeru dengtas pluoštas veikiamas dujine arba skystąja faze, turinčia tiriamą analitę. Paprastai minimali analizės trukmė nustatoma taip, kad tarp kietosios ir takiosios fazės matuojamų junginių atžvilgiu nusistovi pusiausvyros sąlygos. Vėliau tiriamos analitės koncentracija gali būti nustatyta tiesiogiai pluošte arba ekstrahavus ją iš pluošto į tirpiklį, priklausomai nuo nustatymo metodo.

Nuostovioji būsena pasiekiama, kai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos žuvyje (C_f) ir laiko priklausomybės kreivė tampa lygiagreti su laiko ašimi, kai bent kas dvi paras paimtų ėminių trijų nuoseklių C_f analizės rezultatai skiriasi ne daugiau kaip ± 20 % ir nėra reikšmingo C_f padidėjimo tarp pirmosios ir paskutinės nuoseklios analizės. Kai analizuojami jungtiniai ėminiai, reikia atlikti ne mažiau kaip keturias nuoseklias analizes. Jei bandomųjų cheminių medžiagų sugertis vyksta lėtai, labiau tiktų septynių parų intervalai.

Nuostoviosios būsenos biologinio koncentravimo faktorius (BCF_{SS}) žymiai nekinta ilgesnį laiko tarpą, bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai aplinkinėje terpėje šį laiko tarpą esant pastoviai (žr. nuostoviosios būsenos apibrėžtį).

Suminė organinė anglis (TOC) yra anglies, gautos iš visų bandymų terpės organinių anglies šaltinių, įskaitant kietąsias daleles ir ištirpusius šaltinius, koncentracijos matas.

Sugerties greičio konstanta (k_1) yra skaitinė vertė, apibūdinanti bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos žuvyje arba jos paviršiuje (arba tam tikruose jos audiniuose) didėjimo greitį, kai žuvis yra veikiama ta bandomąja chemine medžiaga (k_1 yra išreiškiama l kg^{-1} $para^{-1}$).

Nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ir biologinės medžiagos žinomos kaip UVCB.

▼**M7**

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Bandomoji cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys, kurie buvo bandyti pagal šį bandymo metodą.

LITERATŪRA

(1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

(2) *Šio priedo A.8 skyrius.* Pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolio / vandens*). Kratomos kolbos metodas*

(3) *Šio priedo A.24 skyrius*. Pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolio / vandens*). Didelio slėgio skysčių chromatografijos (HPLC) metodas*.

(4) *Šio priedo A.23 skyrius*. Pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolio / vandens*). Lėto maišymo metodas*.

▼M7

2 priedėlis

KAI KURIOS TINKAMO SKIEDIMO VANDENS CHEMINĖS CHARAKTERISTIKOS

Komponentas	Ribinė koncentracija
Kietosios dalelės	5 mg/l
Suminė organinė anglis	2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	1 µg/l
Liekamasis chloras	10 µg/l
Suminis organinių fosforo pesticidų kiekis	50 ng/l
Suminis chloro organinių pesticidų ir polichlorintųjų bifenilų kiekis	50 ng/l
Suminis organinio chloro kiekis	25 ng/l
Aliuminis	1 µg/l
Arsenas	1 µg/l
Chromas	1 µg/l
Kobaltas	1 µg/l
Varis	1 µg/l
Geležis	1 µg/l
Švinas	1 µg/l
Nikelis	1 µg/l
Cinkas	1 µg/l
Kadmis	100 ng/l
Gyvsidabris	100 ng/l
Sidabras	100 ng/l

▼M7

3 priedėlis

BANDYMAMS REKOMENDUOJAMOS ŽUVŲ RŪŠYS

Rekomenduojamos rūšys	Rekomenduojamas bandymų temperatūros intervalas (°C)	Rekomenduojamas bandomojo gyvūno visas ilgis (cm) (2)
Danio rerio (1) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebrinė danija	20 – 25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Juodoji drūtagalvė rainė	20 – 25	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Paprastasis karpis	20 – 25	8,0 ± 4,0 (3)
Oryzias latipes (Teleostei, Poecilliidae) (Temminck and Schlegel) Japoninė medaka	20 – 25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Paprastasis gupis	20 – 25	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque) Melsvažiaunis saulešeris	20 – 25	5,0 ± 2,0
Oncorhynchus mykiss (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) Vaivorykštinis upėtakis	13 – 17	8,0 ± 4,0
Gasterosteus aculeatus (Teleostei, (Gasterosteidae) (Linnaeus) Trispyglė dyglė	18 – 20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer *et al.* (1)

(2) Reikėtų pažymėti, kad atliekant patį bandymą, masei teikiama pirmenybė kaip dydžio matui ir augimo greičio konstantai išvesti. Tačiau pripažįstama, kad ilgis yra praktiškesnis matas, jei žuvį reikia pasirinkti vizualiai bandymo pradžioje (t. y. iš pradinės populiacijos).

(3) Šis ilgio intervalas yra nurodytas *Naujų cheminių medžiagų bandymo metodai* ir kt., pagrįstas Japonijos cheminių medžiagų kontrolės įstatymu (CSCL).

Ne taip plačiai naudojamos įvairios upių žiočių ir jūros žuvų rūšys, pvz:

Spotas	(*Leiostomus xanthurus*)
Lėlžuvė	(*Cyprinodon variegatus*)
Priekrantinė menidija	(*Menidia beryllina*)
Gyvavedis šaineris	(*Cymatogaster aggregata*)
Kalifornijos jūrų liežuvis	(*Parophrys vetulus*)
Siauragalvė plernė	(*Leptocottus armatus*)
Trispyglė dyglė	(*Gasterosteus aculeatus*)
Paprastasis vilkešeris	(*Dicentracus labrax*)
Paprastoji aukšlė	(*Alburnus alburnus*)

▼**M7**

(Lentelėje nurodytas gėlųjų vandenų žuvis lengva auginti ir (arba) jų visur galima gauti ištisus metus, o jūros ir upių žiočių žuvų iš dalies galima gauti tik atitinkamose šalyse. Žuvis galima auginti ir veisti žuvų fermose arba laboratorijoje, ligų ir parazitų kontrolės sąlygomis, kad bandymo gyvūnai būtų sveiki ir būtų žinoma jų kilmė. Šių žuvų yra daugelyje pasaulio kraštų.

LITERATŪRA

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

▼M7

4 priedėlis

ĖMINIŲ ĖMIMO TVARKARAŠČIAI ATLIEKANT VEIKIMO PER VANDENINĘ TERPĘ IR MITYBOS BANDYMUS

1. **Ėminių ėmimo tvarkaraščio, atliekant cheminės medžiagos, kurios log K_{OW} = 4, visą veikimo per vandeninę terpę biologinio koncentravimo bandymą, teorinis pavyzdys**

Žuvų ėminių ėmimas	Ėminių ėmimo tvarkaraštis		Vandens ėminių skaičius (1)	Žuvų skaičius ėminyje (1)
	Mažiausias reikiamas dažnumas (paros)	Papildomas ėminių ėmimas (paros) (2)		
Sugerties tarpsnis				
1	– 1		2 (3)	4 (4)
	0		(2)	(3 (6))
2	0,3		2	4
		0,4	(2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	(2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	(2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	(2)	(4)
6	4,7		2	4 – 8 (5)
				(3 (6))
Apsivalymo tarpsnis				Pernešti žuvis į vandenį be bandomosios cheminės medžiagos
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)
10	14,0		2	4 – 8 (5)
		17,5		(4+3 (6))
VISO				40 – 72 (48 – 80) (5)

(1) Vertės skliausteliuose yra ėminių (vandens, žuvų), kuriuos reikia paimti, skaičius, jei imami papildomi ėminiai.
(2) Prieš bandymą gautas k_2 įvertis, kai log K_{OW} yra lygus 4,0, yra 0,652 paros^{-1}. Nustatyta suminė bandymo trukmė yra 3 × t_{SS} = 3 × 4,6 paros, t. y. 14 parų. Dėl t_{SS} įvertinimo žr. 5 priedėlį.
(3) Vandens ėminys imamas po to, kai kameros vandens tūris buvo pakeistas mažiausiai tris kartus.
(4) Šios žuvys yra imamos iš pradinės populiacijos.
(5) Jei būtinas didesnis tikslumas ar metabolizmo tyrimai, kuriems atlikti reikia daugiau žuvų, jas reikėtų imti visų pirma sugerties ir apsivalymo tarpsnių pabaigoje (žr. 40 pastraipą).
(6) Lipidų kiekiui analizuoti gali prireikti ne mažiau kaip 3 papildomų žuvų, jei neįmanoma naudoti žuvų, kurios buvo paimtos cheminės medžiagos koncentracijos vertėms nustatyti bandymo pradžioje, sugerties tarpsnio pabaigoje ir apsivalymo tarpsnio pabaigoje. Reikėtų pažymėti, kad daugumoje atvejų galima naudoti tik tris kontrolines žuvis (žr. 56 pastraipą).

▼M7

2. **Ėminių ėmimo tvarkaraščio, atliekant cheminės medžiagos biologinio kaupimosi per maistą bandymą esant 10 parų sugerties ir 42 parų apsivalymo tarpsniui, teorinis pavyzdys**

Ėminių ėmimas	Ėminių ėmimo tvarkaraštis		Maisto ėminių skaičius	Žuvų skaičius ėminyje	
	Tarpsnio para	Ar reikia papildomų žuvų ėminių?		Bandymo grupė	Kontrolinė grupė
Sugerties tarpsnis					
1	0	Galbūt (1) (2)	3 – bandymo grupė	0	5 – 10
			3 – kontrolinė grupė (1)		(8 – 13) (2)
1A (3)	1-3			5 – 10	5 – 10
2	10	Taip (4)	3 – bandymo grupė	10 – 15 (4)	5 – 10
			3 – kontrolinė grupė (1)	(13 – 18) (5)	(8 – 13) (5)
Apsivalymo tarpsnis					
3	1	Taip (4)		10 – 15 (4)	5 – 10
4	2			5 – 10	5 – 10
5	4			5 – 10	5 – 10
6	7	Taip (4)		10 – 15 (4)	5 – 10
7	14			5 – 10	5 – 10
8	28			5 – 10	5 – 10
9	42	Taip (4)		10 – 15 (4) (13 – 18) (5)	5 – 10 (8 – 13) (5)
VISO				59 – 120 (63 – 126) (4) (5)	50 – 110 (56 – 116) (4) (5)

(1) Analizuojami 3 maisto ėminiai, paimti iš kontrolinių grupių ir bandymo grupių, bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai ir lipidų kiekiui nustatyti.

(2) Žuvys imamos iš pradinės populiacijos kuo arčiau tyrimo pradžios; bandymo pradžioje paimamos bent 3 žuvys iš pradinės populiacijos lipidų kiekiui nustatyti.

(2) Imant (neprivalomai) ėminius sugerties tarpsniu, gaunami duomenys bandomosios medžiagos įsisavinimui su maistu apskaičiuoti, kad jį būtų galima palyginti su įsisavinimo efektyvumu, apskaičiuotu pagal apsivalymo tarpsnio duomenis.

(4) Galima paimti papildomai 5 žuvis audinių specifinei analizei atlikti.

(5) Lipidų kiekiui analizuoti gali prireikti ne mažiau kaip 3 papildomų žuvų, jei neįmanoma naudoti žuvų, kurios buvo paimtos cheminės medžiagos koncentracijos vertėms nustatyti bandymo pradžioje, sugerties tarpsnio pabaigoje ir apsivalymo tarpsnio pabaigoje. Reikėtų pažymėti, kad daugumoje atvejų galima naudoti tik tris kontrolines žuvis (žr. 56 ir 153 pastraipas).

Pastaba dėl tarpsnio trukmės ir ėminių ėmimo laiko nustatymo. Sugerties tarpsnis prasideda pirmą kartą davus sodrinto maisto. Bandymų para trunka nuo vieno maisto davimo iki šiek tiek anksčiau nei kito maitinimo po 24 h. Pirmą kartą ėminiai imami (lentelėje pažymėta 1) prieš pat pirmą maitinimą (pvz., likus vienai valandai). Būtų gerai, jei atliekant tyrimą ėminiai būtų imami prieš pat kitos paros maitinimo laiką (t. y. maždaug 23 h po maitinimo ėminių ėmimo dieną). Sugerties tarpsnis baigiasi prieš pat pirmą maitinimą nesodrintu maistu, kai prasideda apsivalymo tarpsnis (tikėtina, kad bandymo grupės žuvys vis dar virškina sodrintą maistą per tas tarpines 24 h po paskutinio sodrinto maisto davimo). Tai reiškia, kad sugerties tarpsnio pabaigos ėminį reikėtų imti prieš pat pirmą maitinimą nesodrintu maistu, o pirmąjį apsivalymo tarpsnio ėminį reikėtų imti maždaug 23 h po pirmo maitinimo nesodrintu maistu.

▼M7

5 priedėlis

BENDRIEJI SKAIČIAVIMAI

1. Įvadas

2. Sugerties tarpsnio trukmės prognozavimas

3. Apsivalymo tarpsnio trukmės prognozavimas

4. Nuoseklusis metodas. Apsivalymo (netekimo) greičio konstantos k_2 nustatymas

5. Nuoseklusis metodas. Sugerties greičio konstantos k_1 nustatymas (tik veikimo per vandeninę terpę metodas)

6. Vienalaikis metodas sugerties ir apsivalymo (netekimo) greičio konstantoms apskaičiuoti (tik veikimo per vandeninę terpę metodas)

7. Kinetinio BCF ir BMF pataisa atsižvelgiant į praskiedimą dėl augimo

8. Lipidų normalizavimas pagal 5 % lipidų kiekį (tik veikimo per vandeninę terpę metodas)

1. ĮVADAS

Bendrasis biologinio kaupimosi žuvyse veikimo per vandeninę terpę modelis gali būti aprašytas kaip sugerties ir netekimo procesai, neatsižvelgiant į sugertį per maistą. Diferencialinė lygtis (dC_f/dt), kuria aprašomas koncentracijos žuvyje kitimo greitis (mg·kg^{-1}·day^{-1}) atrodo taip (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \qquad \text{[A5.1 lygtis]}$$

Čia

k_1 pirmojo laipsnio sugerties žuvimi greičio konstanta (l·kg^{-1}·paros^{-1});

k_2 pirmojo laipsnio žuvies apsivalymo greičio konstanta (paros^{-1});

k_g pirmojo laipsnio žuvies augimo greičio konstanta („praskiedimas dėl augimo“) (paros^{-1});

k_m pirmojo laipsnio metabolinio virsmo greičio konstanta (paros^{-1});

k_e pirmojo laipsnio išmatų šalinimo iš organizmo greičio konstanta (paros^{-1});

C_w koncentracija vandenyje·l^{-1});

C_f koncentracija žuvyje (mg·kg^{-1} šlapios kūno masės).

Jei cheminės medžiagos biologiškai kaupiasi, galima tikėtis, kad laikinis svertinis vidurkis (LSV) yra tinkamiausia veikimo per vandeninę terpę koncentracija (C_w), atsižvelgiant į leidžiamą svyravimų intervalą (žr. 24 pastraipą). Koncentracijos vandenyje LSV rekomenduojama skaičiuoti pagal C.20 bandymų metodo 6 priedėlio procedūrą (2). Reikėtų pažymėti, kad yra patogu transformuoti koncentraciją vandenyje į natūralųjį logaritmą, jei laukiama eksponentinio skaidymo tarp atnaujinimo laikotarpių, pvz., taikant pusiau statinio bandymo schemą. Jei naudojama dinaminė sistema, veikimo koncentracijos verčių transformavimas į natūralųjį logaritmą gali būti nebūtinas. Jei gaunami koncentracijos vandenyje LSV, juos reikėtų pateikti ataskaitoje ir naudoti vėlesniems skaičiavimams.

Taikant tipinį žuvų BCF bandymą, sugertį ir apsivalymą galima aprašyti kaip du pirmojo laipsnio kinetinius procesus.

▼M7

Sugerties greitis = $k_1 \times C_w$ [A5.2 lygtis]

Visuminis netekimo greitis = $(k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f$ [A5.3 lygtis]

Darant prielaidą, kad augimas ir metabolizmas yra nykstamai maži (t. y. k_g ir k_m vertės yra arti nulio), esant nuostoviajai būsenai sugerties greitis yra lygus apsivalymo greičiui, todėl jungiant A5.2 ir A5.3 lygtis gaunama tokia priklausomybė:

$$BCF = \frac{C_{f-SS}}{C_{w-SS}} = \frac{k_1}{k_2}$$ [Εξίσωση A5.4]

Čia

$C_{f\text{-}SS}$ koncentracija žuvyje esant nuostoviajai būsenai (mg kg^{-1} šlapios kūno masės);

$C_{w\text{-}SS}$ koncentracija vandenyje esant nuostoviajai būsenai (mg l^{-1}).

Santykis k_1/k_2 yra žinomas kaip kinetinis BCF (BCF_K) ir turėtų būti lygus nuostoviosios būsenos BCF (BCF_{SS}) yra gaunamas kaip nuostoviosios būsenos koncentracijos žuvyje ir vandenyje santykis, bet gali būti nukrypimų, jei nuostovioji būsena buvo neapibrėžta arba jei kinetiniam BCF buvo taikomos pataisos dėl augimo. Tačiau, kadangi k_1 ir k_2 yra konstantos, nuostoviosios būsenos pasiekti nebūtina, kad būtų gautas BCF_K.

Į šį 5 priedėlį įtraukti bendrieji skaičiavimai pagal šias pirmojo laipsnio kinetikos lygtis, kurie yra būtini taikant veikimo per vandeninę terpę mitybos biologinio kaupimosi metodus. Tačiau 5, 6 ir 8 skirsniai tinka tik veikimo per vandeninę terpę metodui, bet jie įtraukti į šį priedėlį, nes yra „bendrosios“ procedūros. Taikant nuosekliuosius (4 ir 5 skirsniai) ir vienalaikius (6 skirsnis) metodus, galima apskaičiuoti sugerties ir apsivalymo konstantas, kurios naudojamos kinetiniams BCF gauti. Nuoseklusis k_2 nustatymo metodas (4 skirsnis) yra svarbus mitybos metodui ir yra būtinas, kai reikia apskaičiuoti įsisavinimo efektyvumą ir BMF. 7 priedėlyje išsamiai aprašyti mitybos metodui būdingi skaičiavimai.

2. SUGERTIES TARPSNIO TRUKMĖS PROGNOZAVIMAS

Taikant empirines priklausomybes tarp k_2 ir pasiskirstymo tarp *n*-oktanolio ir vandens koeficiento (K_{OW}) arba tarp k_1 ir BCF, dar prieš bandymo pradžią galima gauti k_2 įvertį, taigi ir laiką, kuris būtinas tam tikrai nuostoviosios būsenos procentinei daliai pasiekti. Tačiau reikėtų suvokti, kad šio skyriaus lygtys galioja tik tada, kai sugertis ir apsivalymas atitinka pirmojo laipsnio kinetiką. Jei tai nėra visiškai aišku, patariama konsultuotis su biologinės statistikos ir (arba) farmakologinės kinetikos specialistu, jei norima gauti prognozes dėl sugerties tarpsnio.

k_2 (paros^{-1}) įvertis gali būti gautas keliais metodais. Pvz., pirmuoju atveju galima naudoti tokią empirinę priklausomybę ([1]):

$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \log K_{OW}$ ($r^2 = 0{,}95$) [(3); A5.5 lygtis]

arba

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF}$$ [A5.6 lygtis]

Čia $k_1 = 520 \times W^{-0{,}32}$ (cheminių medžiagų, kurių $\log K_{OW} > 3$) ($r^2 = 0{,}85$) [(4); A5.7 lygtis]

([1]) Kaip ir kiekvienos empirinės priklausomybės atveju, reikėtų patikrinti, ar bandomoji cheminė medžiaga patenka į priklausomybės taikymo sritį

▼M7

Ir$BCF = 10^{(0{,}910 \cdot logK_{OW} - 1{,}975 \cdot log(6{,}8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0{,}786)}$ (r^2 = 0,90) [(5); A5.8 lygtis]

W – vidutinė paveiktos tiriamąja chemine medžiaga žuvies masė (šlapia kūno masė gramais) sugerties tarpsnio pabaigoje ar apsivalymo tarpsnio pradžioje ([1])

Kitos priklausomybės pateiktos (6). Gali būti naudinga taikyti sudėtingesnius k_2 įvertinimo modelius, pvz., jei yra tikimybė, kad gali atsirasti reikšmingas metabolizmas (7) (8). Tačiau, didėjant modelio sudėtingumui, reikėtų atsargiau aiškinti prognozes. Pvz., nitrogrupių buvimas galėtų reikšti greitą metabolizmą, bet tai ne visuomet pasitvirtina. Todėl, kurdamas tyrimo schemą, naudotojas turėtų įvertinti prognozavimo metodu gautus rezultatus, atsižvelgdamas į cheminę sandarą ir kitą susijusią informaciją (pvz., parengiamųjų tyrimų).

Laikas, per kurį pasiekiama tam tikra nuostoviosios būsenos procentinė dalis, gali būti gautas taikant k_2- įvertį, nustatytą pagal sugertį ir apsivalymą aprašančią bendrąją kinetinę lygtį (pirmojo laipsnio kinetika), ir darant prielaidą apie nežymų augimą ir metabolizmą. Jei tyrimo metu augimas yra reikšmingas, toliau aprašyti įverčiai nebus patikimi. Tokiais atvejais geriau taikyti k_{2g} su pataisa dėl augimo, kaip aprašyta toliau (žr. šio priedėlio 7 skirsnį):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_f \qquad \text{[A5.9 lygtis]}$$

arba, jei C_w yra pastovi:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[A5.10 lygtis]}$$

Artėjant prie nuostoviosios būsenos ($t \to \infty$), A5.10 lygtį galima supaprastinti (žr. (9) (10)) iki:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W \qquad \text{[A5.11 lygtis]}$$

arba

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \qquad \text{[A5.12 lygtis]}$$

Tada BCF × C_w yra koncentracijos žuvyje nuostoviosios būsenos sąlygomis artinys ($C_{f\text{-}SS}$). (Pastaba. Tas pats metodas tinka nuostoviosios būsenos BMF įverčiui gauti, atliekant mitybos bandymą. Šiuo atveju pirmiau pateiktose lygtyse BCF yra keičiamas BMF, o C_w – C_{food}, koncentracija maiste).

A.5.10 lygtis gali būti pertvarkyta į

$$C_f = C_{f-SS}(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[A5.13 lygtis]}$$

arba į

$$\frac{C_f}{C_{f-SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[A5.14 lygtis]}$$

Taikant A5.14 lygtį, galima prognozuoti laiką, per kurį pasiekiama nuostoviosios būsenos tam tikra procentinė dalis, kai prieš tai gaunamas k_2 įvertis pagal A5.5 arba A5.6 lygtį.

Maždaug statistiškai optimalia sugerties tarpsnio trukme statistiškai priimtiniems duomenims (BCF_K) gauti yra laikomas laikas, per kurį bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos žuvyje logaritmo, kaip laiko tiesinėje

([1]) Žuvų masė sugerties tarpsnio pabaigoje gali būti įvertinta pagal ankstesnių tyrimų duomenis arba pagal turimas žinias apie bandymo rūšių galimą masės padidėjimą nuo tipinės masės bandymo pradžioje per tipinę sugerties tarpsnio trukmę, pvz., 28 paras).

▼M7

skalėje funkcijos, kreivė pasiekia ne mažiau kaip 50 % nuostoviosios būsenos (t. y. 0,69/k_2), bet ne daugiau kaip 95 % nuostoviosios būsenos (t. y. 3,0/k_2) (11). Jei sugertis didesnė kaip 95 % nuostoviosios būsenos, galima skaičiuoti BCF_{SS}.

Laikas 80 % nuostoviosios būsenos pasiekti yra lygus (pagal A5.14 lygtį):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[A5.15 lygtis]}$$

arba

$$t_{80} = \frac{-\ln(0,20)}{k_2} = \frac{1,6}{k_2} \qquad \text{[A5.16 lygtis]}$$

Panašiai laikas 95 % nuostoviosios būsenos pasiekti yra lygus:

$$t_{95} = \frac{-ln\,(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2} \qquad \text{[A5.17 lygtis]}$$

Pvz., bandomosios cheminės medžiagos, kurios log K_{OW} = 4, sugerties tarpsnio trukmė (t. y. laikas, per kurį pasiekiama nuostoviosios būsenos tam tikra procentinė dalis, pvz., t_{80} arba t_{95}) būtų (pagal A5.5, A5.16 ir A5.17 lygtis):

$$log k_2 = 1,47 - 0,414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0,652 \text{ paros}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1,6}{0,652} = 2,45\ paros\ (59h)$$

arba $t_{95} = \frac{3,0}{0,652} = 4,60\ paros\ (110h)$

Kaip alternatyva, lygtis:

$$t_{eSS} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55,31\ (h) \qquad \text{[A5.18 lygtis]}$$

gali būti naudojama apskaičiuojant laiką, per kurį pasiekiama faktinė nuostovioji būsena (t_{eSS}) (12). Jei bandomosios cheminės medžiagos log K_{OW} = 4, gaunama:

$$t_{eSS} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55,31 = 121\ h$$

3. APSIVALYMO TARPSNIO TRUKMĖS PROGNOZAVIMAS

Taikant bendrąją lygtį, kuri aprašo sugertį ir apsivalymą (darant prielaidą dėl pirmojo laipsnio kinetikos), žr. A5.9 lygtį (1) (13), galima prognozuoti laiką, per kurį organizmo sugertos cheminės medžiagos kiekis sumažėja iki pradinės koncentracijos tam tikros procentinės dalies.

Daroma prielaida, kad apsivalymo tarpsnio C_w (arba C_{maisto} atliekant mitybos bandymą) yra lygi nuliui. Tada lygtį galima supaprastinti taip:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \qquad \text{[A5.19 lygtis]}$$

arba

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \qquad \text{[A5.20 lygtis]}$$

čia: $C_{f,0}$ – koncentracija apsivalymo tarpsnio pradžioje.

50 % apsivalymas bus pasiektas laiko momentu (t_{50}):

▼M7

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

arba

$$t_{50} = \frac{-\ln(0{,}50)}{k_2} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

Panašiai 95 % apsivalymo trukmė yra lygi:

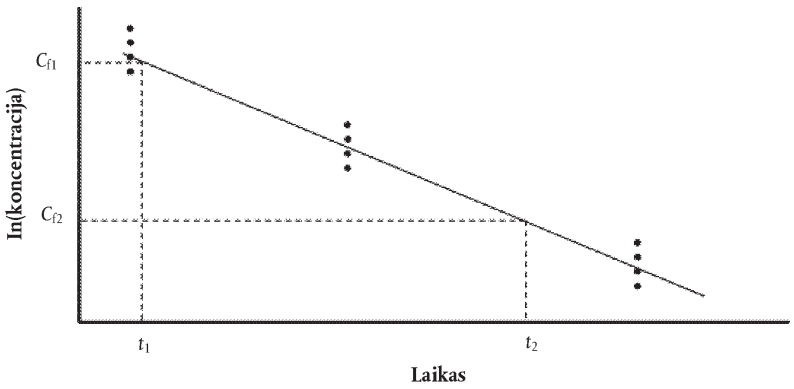
$$t_{95} = \frac{-\ln(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

Jei pirmajam laikotarpiui taikoma 80 % sugerties trukmė ($1{,}6/k_2$), o apsivalymo tarpsnio trukmė atitinka 95 % netekimą ($3{,}0/k_2$), apsivalymo tarpsnio trukmė maždaug du kartus ilgesnė nei sugerties tarpsnio trukmė.

Reikia pažymėti, kad įverčiai pagrįsti prielaida dėl sugerties ir apsivalymo vyksmo pagal pirmojo laipsnio kinetiką. Jei procesai akivaizdžiai vyksta ne pagal pirmojo laipsnio kinetiką, šie įverčiai netinka.

4. NUOSEKLUSIS METODAS. APSIVALYMO (NETEKIMO) GREIČIO KONSTANTOS K_2 NUSTATYMAS

Buvo padaryta prielaida, kad biologinio koncentravimo duomenis gana tiksliai aprašo paprastas dviejų aplinkos terpių ir dviejų parametrų modelis, kurį rodo ištiesinta kreivė, einanti maždaug per koncentracijos žuvyje apsivalymo tarpsniu taškus (natūraliojo logaritmo skalėje).



Reikia pažymėti, kad nukrypimai nuo tiesės gali rodyti sudėtingesnę nei pirmojo laipsnio kinetikos apsivalymo schemą. Galima taikyti grafinį metodą, kad būtų nustatytas pirmojo laipsnio kinetikos neatitinkantis apsivalymo tipas.

Atliekama tiesinė ln(koncentracijos) kaip laiko funkcijos regresija, kad k_2 būtų apskaičiuota pagal kelis laiko (ėminių ėmimo) taškus. Regresijos tiesės krypties koeficientas yra apsivalymo greičio konstantos k_2 įvertis ([1]). Pagal atkarpos dydį galima nesunkiai apskaičiuoti vidutinę koncentraciją žuvyje apsivalymo tarpsnio pradžioje ($C_{0,d}$, kuri yra lygi vidutinei koncentracijai žuvyje sugerties tarpsnio pabaigoje) (įskaitant leidžiamąsias paklaidas) ([1]):

([1]) Dauguma programų tiesinei regresijai skaičiuoti turi galimybę gauti įverčių standartinį nuokrypį ir pasikliovimo intervalą (PI), pvz., Microsoft Excel naudojant duomenų analizės rinkinį.

▼M7

$$C_{0,d} = e^{atkarpa} \qquad \text{[A5.21 lygtis]}$$

Jei k_2 reikia apskaičiuoti tik pagal du turimus laiko (ėminių ėmimo) taškus (kaip pagal supaprastintą schemą), dvi vidutinės koncentracijos vertės įrašomos į šią lygtį:

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1} \qquad \text{[A5.22 lygtis]}$$

Šioje lygtyje $\ln(C_{f1})$ ir $\ln(C_{f2})$ yra koncentracijos verčių laiko momentais t_1 ir t_2 natūralieji logaritmai, o t_2 ir t_1 – dviejų ėminių ėmimo laikas nuo apsivalymo tarpsnio pradžios ([1]).

5. NUOSEKLUSIS METODAS. SUGERTIES GREIČIO KONSTANTOS K_1 NUSTATYMAS (TIK VEIKIMO PER VANDENINĘ TERPĘ METODAS)

k_1 vertę galima rasti sugerties tarpsnio koncentracijos ir laiko sekos duomenims taikant kompiuterinę programą šiam modeliui pritaikyti:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[A5.23 lygtis]}$$

Čia k_2 pateikta atliekant ankstesnį skaičiavimą, $C_f(t)$ ir $C_w(t)$ – koncentracija žuvyje ir vandenyje momentu t.

Jei k_1 reikia apskaičiuoti tik pagal du turimus laiko (ėminių ėmimo) taškus (kaip pagal supaprastintą schemą), naudojama tokia formulė:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{[A5.24 lygtis]}$$

Čia k_2 pateikta atliekant ankstesnį skaičiavimą, C_f – koncentracija žuvyje apsivalymo tarpsnio pradžioje ir C_w – vidutinė koncentracija vandenyje sugerties tarpsnio metu ([2]).

Apžiūra tikrinant k_1 ir k_2 krypties koeficientus, gautus grafike pagal ėminių ėmimo taškuose išmatuotus duomenis, gali būti naudojama suderintumui įvertinti. Jei pasirodo, kad nuosekliuoju metodu gautas netinkamas k_1 įvertis, reikėtų taikyti vienalaikį metodą k_1 ir k_2 apskaičiuoti (žr. kitą 6 skirsnį). Vėlgi, gautus krypties koeficientus reikėtų palyginti su išmatuotų duomenų grafiku, kad apžiūrint būtų įvertintas suderintumas. Jei suderintumas yra blogas, tai gali rodyti, kad pirmojo laipsnio kinetika netinka ir reikėtų taikyti sudėtingesnius modelius.

6. VIENALAIKIS METODAS SUGERTIES IR APSIVALYMO (NETEKIMO) GREIČIO KONSTANTOMS APSKAIČIUOTI (TIK VEIKIMO PER VANDENINĘ TERPĘ METODAS)

Galima naudoti kompiuterines programas k_1 ir k_2 vertėms nustatyti pagal koncentracijos ir laiko sekos duomenis ir modelį:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[A5.25 lygtis]}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[A5.26 lygtis]}$$

čia

t_c – sugerties tarpsnio pabaigos laikas.

Šiuo metodu tiesiogiai gaunamos k_1 ir k_2 įverčių standartinės paklaidos. Kai k_1/k_2 A5.25 lygtyje ir A5.26 lygtyje pakeičiamos BCF (žr. A5.4 lygtį), taip pat galima įvertinti BCF standartinę paklaidą ir 95 % PI. Tai ypač naudinga

([1]) Priešingai nei taikant tiesinės regresijos metodą, naudojant šią formulę nebus gauta standartinė k2 paklaida.

([2]) Priešingai nei taikant tiesės priderinimo procedūrą, šiuo metodu nebus gauta k1 įverčio standartinė paklaida ar pasikliovimo intervalas.

▼M7

lyginant skirtingus įverčius, gautus transformuojant duomenis. Priklausomasis kintamasis (koncentracija žuvyje) gali būti priderintas atliekant transformavimą į natūralųjį logaritmą arba be jo, o gauto BCF neapibrėžtis gali būti įvertinta.

Kadangi tarp vienu metu įvertinamų dviejų parametrų k_1 ir k_2 yra stipri koreliacija, galbūt būtų geriau iš pradžių apskaičiuoti k_2 tik pagal apsivalymo duomenis (žr. pirmiau); k_2 dažniausiai galima įvertinti pagal apsivalymo kreivę, esant palyginti geram tikslumui. Vėliau pagal sugerties duomenis galima apskaičiuoti k_1, taikant netiesinę regresiją ([1]). Priderinant nuosekliai, patartina naudoti tokį patį duomenų transformavimą.

Apžiūra tikrinant krypties koeficientus, gautus grafike pagal ėminių ėmimo taškuose išmatuotus duomenis, gali būti naudojama suderintumui įvertinti. Jei pasirodo, kad šiuo metodu gautas netinkamas k_1 įvertis, reikėtų taikyti vienalaikį metodą k_1 ir k_2 apskaičiuoti. Vėlgi, priderintą modelį reikėtų palyginti su išmatuotų duomenų grafiku, kad apžiūrint būtų įvertintas suderintumas, ir gautus k_1, k_2 parametrų įverčius, pagal juos gautą BCF, jų standartines paklaidas ir (arba) pasikliovimo intervalus reikėtų palyginti atsižvelgiant į skirtingus priderinimo tipus.

Jei suderintumas yra blogas, tai gali rodyti, kad pirmojo laipsnio kinetika netinka ir reikėtų taikyti sudėtingesnius modelius. Vienas iš dažniausiai pasitaikančių trukdžių yra žuvų augimas bandymo metu.

7. KINETINIO BCF IR BMF PATAISA ATSIŽVELGIANT Į PRASKIEDIMĄ DĖL AUGIMO

Šiame skirsnyje aprašytas standartinis metodas pataisai dėl žuvų augimo bandymų metu gauti (vadinamasis „praskiedimas dėl augimo“), kuris tinka tik tada, kai galioja pirmojo laipsnio kinetika. Jei yra požymių, kad pirmojo laipsnio kinetika negalioja, siūloma klausti biologinės statistikos specialisto patarimo, kaip tinkamai įvertinti praskiedimo dėl augimo pataisą, arba taikyti toliau aprašytą mase pagrįstą metodą.

Kartais šiam praskiedimo dėl augimo pataisos metodui trūksta tikslumo arba jis kartais visiškai netinka (pvz., jei labai lėtai pasišalinančios cheminės medžiagos bandomos greitai augančiose žuvyse, apskaičiuota apsivalymo greičio konstanta su praskiedimo dėl augimo pataisa k_{2g} gali būti labai maža, todėl labai svarbia tampa jai gauti naudojamų dviejų greičio konstantų paklaida ir kai kuriais atvejais k_g įverčiai gali būti didesni nei k_2). Tokiais atvejais gali būti taikomas alternatyvus metodas (t. y. masių metodas), kuris taip pat tinka tada, kai augimo kinetika nėra pirmojo laipsnio ir kurį taikant nereikia daryti pataisos. Šis metodas aprašytas skirsnio gale.

Augimo greičio konstantos atėmimas darant pataisą dėl augimo

Taikant standartinį metodą, atskirai chemine medžiaga paveiktų ir kontrolinių grupių visi atskiri masės ir ilgio duomenys perskaičiuojami į natūraliuosius logaritmus ir gaunami ln(masės) ar ln(1/masės) kaip laiko (paros) funkcijos grafikai. Tas pats procesas kartojamas atskirai sugerties ir apsivalymo tarpsnių duomenims. Darant praskiedimo dėl augimo pataisą, paprastai geriau imti viso

([1]) Reikėtų suvokti, kad k_2 įverčio neapibrėžtis nėra tinkamai naudojama, taikant biologinio kaupimosi modelį, į ją iš esmės žiūrint kaip į konstantą, kai k_1 priderinama pagal nuosekliojo priderinimo metodą. Todėl nuosekliuoju ir vienalaikiu priderinimo metodu gauto BCF neapibrėžtis bus skirtinga.

▼M7

tyrimo masės duomenis augimo greičio konstantai (k_g) gauti, bet statistiškai reikšmingi skirtumai tarp gautų sugerties ir apsivalymo tarpsnių greičio konstantų, gali reikšti, kad reikėtų naudoti apsivalymo tarpsnio greičio konstantą. Visuminiai augimo greičiai, gauti atliekant veikimo per vandeninę terpę metodo tyrimus, gali būti naudojami visiems su chemine medžiaga paveiktomis žuvimis susijusiems reiškiniams patikrinti.

Taikant standartines statistines procedūras, mažiausiųjų kvadratų metodu apskaičiuojama viso tyrimo, sugerties ir apsivalymo tarpsnių kiekvienos grupės (bandymo (-ų) ir kontrolinės grupės, atskirų duomenų, ne paros vidutinių verčių) ln(žuvų masės) kaip laiko (paros) funkcijos (ir ln(1/masės) kaip laiko (paros) funkcijos) tiesinė koreliacija. Apskaičiuojama tiesių krypties koeficientų dispersijos, kurios naudojamos krypties koeficientų (augimo greičio konstantų) skirtumo statistiniam reikšmingumui įvertinti (p = 0,05), taikant Stjudento t kriterijų (arba ANOVA, jei bandoma daugiau kaip viena koncentracija). Darant pataisą dėl augimo, pirmenybė dažniausiai teikiama masės duomenims. Tokiu pačiu būdu apdoroti ilgio duomenys gali būti naudingi kontrolinėms ir bandymų grupėms palyginti dėl su apdorojimu susijusių reiškinių. Jei yra statistiškai reikšmingi masės duomenų analizės skirtumai, bandymų ir kontroliniai duomenys gali būti sujungti ir tyrimo visuminė žuvų augimo greičio konstanta (k_g) apskaičiuojama kaip tiesinės koreliacijos visuminis krypties koeficientas. Jei stebimi statistiškai reikšmingi skirtumai, kiekvienos žuvų grupės ir (arba) tyrimo tarpsnio augimo greičio konstantos ataskaitoje pateikiamos atskirai. Tada kiekvienos apdorotos grupės greičio konstantą reikėtų naudoti tos grupės praskiedimo dėl augimo pataisai daryti. Jei buvo pastebėti statistiniai skirtumai tarp sugerties ir apsivalymo tarpsnių greičio konstantų, reikėtų naudoti apsivalymo tarpsniui gautas greičio konstantas.

Apskaičiuotą augimo greičio konstantą (k_g, išreikštą paros^{-1}) galima atimti iš visuminės apsivalymo greičio konstantos (k_2) apsivalymo greičio konstantai k_{2g} gauti.

$$k_{2g} = k_2 - k_g \qquad \text{[A5.27 lygtis]}$$

Sugerties greičio konstanta dalijama iš dėl augimo pataisytos apsivalymo greičio konstantos, kad būtų gautas kinetinis BCF su pataisa dėl augimo, žymimas BCF_{Kg} (arba BMF_{Kg}).

$$BCF_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \qquad \text{[A5.28 lygtis]}$$

Mitybos tyrimui gauta augimo greičio konstanta naudojama A7.5 lygtyje BMF_{Kg} su pataisa dėl augimo apskaičiuoti (žr. 7 priedėlį).

Mase pagrįstas metodas, taikomas vietoj pataisos dėl augimo

Pirmiau nurodytą augimo greičio konstantos atėmimo metodą galima pakeisti kitu metodu, kurį taikant nereikia daryti pataisos dėl augimo. Jo principą sudaro tai, kad naudojami apsivalymo tarpsnio duomenys, gauti pagal visą žuvies masę, o ne pagal koncentraciją.

Apsivalymo tarpsnio audinių koncentracijos vertės (bandomosios cheminės medžiagos masė/žuvies masės vienetas) perskaičiuojamos į bandomosios cheminės medžiagos masę/žuviai: koncentracija ir atskiros žuvies masė pateikiamos greta lentelės pavidalu (pvz., naudojant kompiuterinę elektroninę lentelę) ir kiekviena to matavimo koncentracijos vertė padauginama iš visos žuvies masės, kad būtų gautas visų apsivalymo tarpsnio ėminių bandomosios cheminės medžiagos masės/žuviai duomenų rinkinys.

Gaunamas apskaičiuotų cheminės medžiagos masės duomenų natūraliojo logaritmo kaip bandymo (apsivalymo tarpsnio) laiko funkcijos grafikas, kaip tai paprastai būtų daroma.

▼M7

Taikant veikimo per vandeninę terpę metodą, įprastiniu būdu gaunama sugerties greičio konstanta (žr. 4 ir 6 skirsnius); (reikia pažymėti, kad k_1 kreivių priderinimo lygtyse reikia naudoti „įprastinę“ k_2) ir pagal pirmiau nurodytus duomenis apskaičiuojamą apsivalymo greičio konstantą. Kadangi gauta apsivalymo greičio konstantos vertė nepriklauso nuo augimo, nes ji buvo gauta pagal visos žuvies masę, ją reikėtų žymėti k_{2g}, bet ne k_2.

8. LIPIDŲ NORMALIZAVIMAS PAGAL 5 % LIPIDŲ KIEKĮ (TIK VEIKIMO PER VANDENINĘ TERPĘ METODAS)

BCF (kinetinio ir nuostoviosios būsenos) rezultatai, gauti atliekant veikimo per vandeninę terpę bandymus, taip pat turėtų būti pateikti ataskaitoje numatytojo 5 % šlapios kūno masės žuvų lipidų kiekio atžvilgiu, nebent būtų galima įrodyti, kad ne lipidai sukaupia didžiausią bandomosios cheminės medžiagos kiekį (pvz., kai kurios perfluorintos cheminės medžiagos gali jungtis su baltymais). Koncentravimo žuvyse duomenis arba BCF reikia perskaičiuoti lipidų kiekiui, kuris sudaro 5 % šlapios kūno masės. Jei ta pati žuvis buvo naudojama visų ėminių ėmimo taškų cheminės medžiagos koncentracijai ir lipidų kiekiui matuoti, kiekvienai atskirai išmatuotai koncentracijai žuvyje turi būti daroma pataisa pagal tos žuvies lipidų kiekį.

$$C_{f,L} = \frac{0,05}{L} \cdot C_f \qquad \text{[A5.29 lygtis]}$$

čia:

$C_{f,L}$ pagal lipidus normalizuota koncentracija žuvyje (mg kg^{-1} šlapios kūno masės);

L lipidų dalis (pagal šlapią kūno masę);

C_f bandomosios cheminės medžiagos koncentracija žuvyje (mg kg^{-1} šlapios kūno masės).

Jei buvo atliekama ne visų ėminio žuvų lipidų analizė, BCF normalizuojamas pagal vidutinę lipidų vertę. Jei kalbama apie nuostoviosios būsenos BCF, reikėtų naudoti paveiktos chemine medžiaga grupės sugerties tarpsnio gale gautą vertę. Jei reikia normalizuoti kinetinį BCF, kartais pasiteisina kitas metodas, pvz., jei lipidų kiekis reikšmingai pakito sugerties ar apsivalymo tarpsniu. Tačiau paprastai reikėtų naudoti maisto normą, kuri kiek įmanoma sumažina staigius lipidų kiekio pokyčius.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \qquad \text{[A5.30 lygtis]}$$

čia:

BCF_{KL} pagal lipidus normalizuotas kinetinis BCF ($l\ kg^{-1}$);

L_n vidutinė lipidų dalis (pagal šlapią kūno masę);

BCF_K kinetinis BCF ($l\ kg^{-1}$).

LITERATŪRA

(1) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343–2355.

(2) Šio priedo C.20 skyrius. *Daphnia magna reprodukcijos bandymas*.

(3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1: 309-320.

▼M7

(4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

(6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.

(7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

(8) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

(9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. T. Am. Fish. Soc. 104: 785-792.

(10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals, Sheeman, P., *et al*., Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.

(11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. Can. J. Chem. Eng. 55: 614-622.

(12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. Chemosphere. 9: 3-19.

▼M7

6 priedėlis

VEIKIMO PER VANDENINĘ TERPĘ BANDYMO LYGČIŲ SKYRIUS. SUPAPRASTINTO BANDYMO SCHEMA

Šio metodo pagrindinis argumentas yra tai, kad atliekant viso mato bandymą biologinio koncentravimo faktorius gali būti nustatytas kaip nuostoviosios būsenos biologinio koncentravimo faktorius (BCF_{SS}), skaičiuojant bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos žuvies audinyje ir bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vandenyje santykį, arba skaičiuojant kinetinį biologinio koncentravimo faktorių (BCF_K) kaip sugerties greičio konstantos k_1 ir apsivalymo greičio konstantos k_2 santykį. BCF_K yra tinkamas sugerties tarpsniu netgi nepasiekus cheminės medžiagos nuostoviosios būsenos koncentracijos, jei sugertis ir apsivalymas vyksta maždaug kaip pirmojo laipsnio kinetikos procesai.

Jei cheminės medžiagos koncentracija audiniuose (C_{f1}) matuojama veikimo pabaigos momentu (t_1) ir dar kartą matuojama laiko momentu (t_2) kaip koncentracija audiniuose (C_{f2}), apsivalymo greičio konstanta (k_2) gali būti įvertinta, naudojant 5 priedėlio A5.22 lygtį.

Tada, naudojant 5 priedėlio A5.23 lygtį, algebriniu metodu galima nustatyti sugerties greičio konstantą k_1 (kai C_f yra lygi C_{f1}, o t lygus t_1) (1). Taigi pagal supaprastintą schemą gautas kinetinis biologinio koncentravimo faktorius (žymimas BCF_{Km}, kad būtų galima atskirti nuo kinetinių biologinio koncentravimo faktorių, nustatytų pagal kitus metodus) yra lygus:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[A6.1 lygtis]}$$

Reikėtų daryti koncentracijos verčių arba rezultatų praskiedimo dėl augimo pataisą ir normalizuoti pagal 5 % lipidų kiekį, kaip aprašyta 5 priedėlyje.

Pagal supaprastintą schemą gautas BCF_{SS} yra BCF, apskaičiuotas sugerties tarpsnio pabaigoje, darant prielaidą, kad nuostovioji būsena buvo pasiekta. Galima daryti tik prielaidą, nes ėminių ėmimo taškų yra per mažai, kad tai būtų galima įrodyti.

$$\text{ελαχιστοποιημένος BCF}_{SS} = \frac{C_{f-minSS}}{C_{w-minSS}} \qquad \text{[A6.2 lygtis]}$$

Čia:

$C_{f\text{-}minSS}$ koncentracija žuvyje, darant prielaidą dėl nuostoviosios būsenos sugerties tarpsnio pabaigoje (mg kg^{-1} šlapios kūno masės);

$C_{w\text{-}minSS}$ koncentracija vandenyje, darant prielaidą dėl nuostoviosios būsenos sugerties tarpsnio pabaigoje (mg l^{-1}).

LITERATŪRA

(1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

▼M7

7 priedėlis

MITYBOS BANDYMO LYGČIŲ SKYRIUS

1. Pirktinio žuvų maisto sudedamųjų dalių kiekio pavyzdžiai

2. Maisto sodrinimo būdų pavyzdžiai

3. Įsisavinimo efektyvumo ir biomagnifikacijos faktoriaus skaičiavimas

4. Pataisa dėl lipidų

5. Skirtumų tarp išmatuotos nulinio laiko koncentracijos ($C_{0,m}$) ir apskaičiuotos nulinio laiko koncentracijos ($C_{0,d}$)įvertinimas

6. Nurodymai dėl labai sparčiai pasišalinančių bandomųjų cheminių medžiagų

1. PIRKTINIO ŽUVŲ MAISTO SUDEDAMŲJŲ DALIŲ KIEKIO PAVYZDŽIAI

Pagrindinė sudedamoji dalis	Žuvų maistas
Žali baltymai	≤ 55,0 %
Žali riebalai	≤ 15,0 % ([1])
Žalia ląsteliena	≥ 2,0 %
Drėgmė	≥ 12 %
Pelenai	≥ 8 %

([1]) Kai kuriuose regionuose gali būti įmanoma gauti tik tokį žuvų maistą, kuriame lipidų koncentracija būtų gerokai mažesnė nei ši viršutinė riba. Tokiais atvejais tyrimai turėtų būti atliekami esant mažesnei tiekiamo maisto lipidų koncentracijai, bet reikėtų tinkamai reguliuoti maisto normą, kad būtų užtikrinta žuvų sveikata. Maisto lipidų kiekį nereikėtų dirbtinai didinti pridedant daugiau aliejaus.

2. MAISTO SODRINIMO BŪDŲ PAVYZDŽIAI

Bendrosios nuostatos

Kontrolinių ėminių maistą reikėtų ruošti visiškai tokiu pačiu būdu, kaip ir sodrintą maistą, bet be bandomosios cheminės medžiagos.

Norint patikrinti koncentraciją apdorotame maiste, tinkamu ekstrahavimo metodu reikėtų ekstrahuoti tris kartotinius maisto su medžiagos doze ėminius ir ekstraktuose išmatuoti bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją ar radioaktyvumą. Reikėtų įrodyti didelį atgavimo laipsnį (> 85 %) ir mažą skirtumą tarp ėminių rezultatų (bandymo pradžioje paimtų trijų ėminių cheminės medžiagos koncentracijos vertės neturėtų skirtis daugiau kaip ± 15 % nuo vidurkio).

Atliekant mitybos bandymą, reikėtų paimti po tris maisto ėminius 0 parą ir sugerties tarpsnio pabaigoje bandomajai cheminei medžiagai maiste nustatyti.

Žuvų maisto su skysta bandomąja chemine medžiaga (gryna) paruošimas

Nustatoma tikslinė nominali bandymo koncentracija apdorotame žuvų maiste, pvz., 500 μg bandomosios cheminės medžiagos/g maisto. Reikiamas grynos bandomosios cheminės medžiagos kiekis (pagal molinę masę ar savitąjį aktyvumą) įdedamas į stiklinį indą arba sukamojo garintuvo apvaliadugnę kolbą.

▼M7

Žuvų maisto masės turėtų pakakti visai sugerties tarpsnio trukmei (atsižvelgiant į būtinumą didinti kiekį kiekvieną kartą maitinant dėl žuvų augimo). Žuvų maistas ir bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti maišomi per naktį lėtai vartant (pvz., naudojant būgninį maišytuvą arba sukant, jei naudojama sukamojo garintuvo apvaliadugnė kolba). Sodrintą maistą reikėtų laikyti tokiomis sąlygomis, kurios užtikrina bandomosios cheminės medžiagos stabilumą maisto mišinyje iki jis bus panaudotas (pvz., šaldytuve).

Žuvų maisto paruošimas, kaip nešiklį naudojant kukurūzų aliejų ar žuvų taukus

Kietąsias bandomąsias chemines medžiagas reikėtų sumalti grūstuvėje į smulkius miltelius. Skystąsias bandomąsias chemines medžiagas galima dėti tiesiogiai į kukurūzų aliejų ar žuvų taukus. Bandomoji cheminė medžiaga ištirpinama žinomame kukurūzų aliejaus ar žuvų taukų tūryje (pvz., 5–15 ml). Sudozuotas aliejus yra kiekybiškai supilamas į tinkamo tūrio sukamojo garintuvo apvaliadugnę kolbą. Kolbą, naudojamą dozei aliejuje ruošti, reikėtų praplauti dviem nedideliais alikvotiniais aliejaus tūriais ir šį aliejų supilti į apvaliadugnę kolbą, siekiant užtikrinti, kad būtų supilta visa ištirpinta bandomoji cheminė medžiaga. Siekiant užtikrinti visišką ištirpimą ar dispergavimą aliejuje (arba jei tiriama daugiau nei viena bandomoji cheminė medžiaga), įdedama mikromaišyklė, kolba užkemšama ir mišinys greitai maišomas per naktį. Į apvaliadugnę kolbą įdedamas bandymui reikiamas žuvų maisto kiekis (paprastai granulių pavidalu), kolbos turinys tolygiai maišomas, nepertraukiamai sukant kolbą ne trumpiau kaip 30 min, bet pageidautina per naktį. Sodrintą maistą reikia tinkamai laikyti (pvz., šaldytuve), kad būtų užtikrintas bandomosios cheminės medžiagos stabilumas maiste iki jis bus naudojamas.

Žuvų maisto paruošimas naudojant organinį tirpiklį

Tikslinei dozei gauti reikiamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis (pagal molinę masę ar savitąjį aktyvumą) ištirpinamas tinkamame organiniame tirpiklyje (pvz., cikloheksane arba acetone; 10–40 ml ar didesniame tūryje, jei reikia, atsižvelgiant į sodrinamo maisto kiekį). Šio tirpalo alikvotinė dalis arba visas (dalimis įpilamas) tirpalas sumaišomas su bandymui atlikti pakankama žuvų maisto mase, kad būtų gautas reikiamas nominalus dozės dydis. Maistą ir bandomąją cheminę medžiagą galima sumaišyti nerūdijančiojo plieno maišymo dubenėlyje ir naujai paruoštas žuvų maistas su doze dviem dienom paliekamas laboratorijos traukos spintoje tame pačiame inde (ir kartais maišomas), kad galėtų išgaruoti tirpiklio perteklius, arba maišomas sukamojo garintuvo apvaliadugnėje kolboje, ją nuolat sukant. Prireikus tirpiklio perteklių galima „išpūsti“ oro ar azoto srove. Reikėtų imtis priemonių užtikrinti, kad bandomoji cheminė medžiaga neišsikristalizuotų, kai pašalinamas tirpiklis. Sodrintą maistą reikėtų laikyti tokiomis sąlygomis (pvz., šaldytuve), kurios užtikrintų bandomosios cheminės medžiagos stabilumą maiste iki jis bus naudojamas.

3. ĮSISAVINIMO EFEKTYVUMO IR BIOMAGNIFIKACIJOS FAKTORIAUS SKAIČIAVIMAS

Įsisavinimo efektyvumas apskaičiuojamas, turint visuminės apsivalymo greičio konstantos įvertį pagal 5 priedėlio 4 skirsnį (taikant nuoseklųjį metodą, t. y. standartinę tiesinę regresiją), naudojant apsivalymo tarpsnio ėminių vidutines koncentracijos vertes. Maisto norma I ir sugerties trukmė t yra žinomi tyrimo parametrai. C_{maisto}, vidutinė išmatuota bandomosios cheminės medžiagos koncentracija maiste, yra matuojamas tyrimo kintamasis. $C_{0,\text{d}}$, bandomosios cheminės medžiagos koncentracija žuvyje sugerties tarpsnio pabaigoje, paprastai apskaičiuojama pagal ln(koncentracijos) kaip apsivalymo trukmės funkcijos grafiko atkarpą.

Cheminės medžiagos įsisavinimo efektyvumas (a, bandomosios cheminės medžiagos absorbcija per virškinimo traktą) apskaičiuojamas taip:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{food}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \qquad \text{[A7.1 lygtis]}$$

čia:

$C_{0,d}$ apskaičiuota koncentracija žuvyje apsivalymo tarpsnio nuliniu laiku (mg kg^{-1});

▼M7

k_2 visuminė (be pataisos dėl augimo) apsivalymo greičio konstanta (paros^{-1}), apskaičiuota pagal 5 priedėlio 3 skirsnį;

I maisto suvartojimo norma (g maisto g^{-1} žuvies paros^{-1});

C_{food} koncentracija maiste (mg kg^{-1} maisto);

t maitinimo laikotarpio trukmė (paros).

Tačiau gali tekti daryti skaičiuojant naudojamos maisto normos I pataisą dėl žuvų augimo, kad būtų gautas tikslus įsisavinimo efektyvumas a. Jei atliekant bandymą žuvų augimas sugerties tarpsniu (kurio eigoje maisto kiekis nekeičiamas nustatytai maisto normai užtikrinti) yra reikšmingas, efektyvioji maisto norma sugerties tarpsnio eigoje bus mažesnė nei nustatyta, todėl „faktinis“ įsisavinimo efektyvumas bus didesnis. (Reikia pažymėti, kad tai nėra svarbu atliekant bendruosius BMF skaičiavimus, nes A7.1 lygties ir A7.4 lygties I nariai faktiškai pasinaikina). Vidutinė maisto norma su praskiedimo dėl augimo pataisa I_g gali būti gauta keliais būdais, bet paprasčiausias ir tikslus būdas yra žinomos augimo greičio konstantos (k_g) naudojimas žuvų masei sugerties tarpsnio momentais įvertinti, t. y.:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \qquad \text{[A7.2 lygtis]}$$

čia

$W_f(t)$ – vidutinė žuvies masė sugerties tarpsnio parą t;

$W_{f,0}$ – vidutinė žuvies masė bandymo pradžioje.

Šiuo būdu galima įvertinti (bent jau) vidutinę žuvies masę paskutinę veikimo parą ($W_{f,\ \text{sugerties pabaiga}}$). Kadangi maisto norma buvo nustatyta pagal $W_{f,0}$, kiekvienos paros efektyvioji maisto norma gali būti apskaičiuota naudojant šias dvi masės vertes. Tada maisto norma su pataisa dėl augimo I_g (g maisto g^{-1} žuvies paros^{-1}), kuri būtų naudojama vietoj I žuvims greitai augant sugerties tarpsniu, gali būti apskaičiuota taip:

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,sugertiespabaiga}} \qquad \text{[A7.3 lygtis]}$$

Gavus įsisavinimo efektyvumo vertę, BMF galima apskaičiuoti ją dauginant iš maisto normos I (arba I_g, jei naudota α apskaičiuoti) ir sandaugą dalijant iš visuminės apsivalymo greičio konstantos k_2:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_2} \qquad \text{[A7.4 lygtis]}$$

Taip pat reikėtų tokiu pačiu būdu apskaičiuoti biomagnifikacijos faktorių su pataisa dėl augimo, naudojant apsivalymo greičio konstantą su pataisa dėl augimo (gauta pagal 5 priedėlio 7 skirsnį). Vėlgi, jei α apskaičiuoti buvo naudojama I_g, ją taip pat reikėtų naudoti šioje lygtyje vietoj I:. Vėlgi, jei α apskaičiuoti buvo naudojama I_g, ją taip pat reikėtų naudoti šioje lygtyje vietoj I:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \qquad \text{[A7.5 lygtis]}$$

čia:

α įsisavinimo efektyvumas (bandomosios cheminės medžiagos absorbcija per virškinimo traktą);

k_2 visuminė (be pataisos dėl augimo) apsivalymo greičio konstanta (paros^{-1}), apskaičiuota pagal 5 priedėlio 3 skyriaus lygtis

▼M7

k_{2g} (apsivalymo greičio konstanta su pataisa dėl augimo, paros^{-1});

I maisto suvartojimo norma (g maisto g^{-1} žuvies paros^{-1});

Pusėjimo trukmė su pataisa dėl augimo ($t_{1/2}$) apskaičiuojama taip:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{2g}} \qquad \text{[A7.6 lygtis]}$$

Cheminės medžiagos įsisavinimo iš maisto efektyvumą taip pat galima įvertinti, jei likučiai žuvų audiniuose nustatomi sugerties tarpsnio ankstyvuoju tiesiniu tarpsniu (nuo 1 iki 3 paros). Šiuo atveju cheminės medžiagos įsisavinimo efektyvumas (α) gali būti nustatytas taip:

$$\alpha = \frac{C_{fish}(t)}{I \times C_{food} \times t} \qquad \text{[A7.7 lygtis]}$$

Čia:

$C_{\text{žuvyje}}(t)$ bandomosios cheminės medžiagos koncentracija žuvyje momentu t (mg kg^{-1} šlapios kūno masės).

4. PATAISA DĖL LIPIDŲ

Jei visais ėminių ėmimo momentais lipidų kiekis buvo matuojamas cheminės medžiagos analizei paimtoje žuvyje, reikėtų daryti atskirų koncentracijos verčių pataisą dėl lipidų ir gauti ln(koncentracijos, su pataisa dėl lipidų) kaip sugerties tarpsnio trukmės (paros) funkcijos grafiką $C_{0,d}$ ir k_2 apskaičiuoti. Tada galima apskaičiuoti įsisavinimo efektyvumą (A7.1 lygtis) su pataisa dėl lipidų, naudojant C_{maisto} su pataisa dėl lipidų (t. y. C_{maisto} dauginama iš vidutinės maisto lipidų dalies). Toliau skaičiuojant pagal A7.4 lygtį ir A7.5 lygtį, bus tiesiogiai gautas BMF su pataisa dėl lipidų (ir praskiedimo dėl augimo pataisa).

Kitu atveju apskaičiuojama apdorotos ir kontrolinės grupių vidutinė žuvies ir maisto lipidų dalis (masės) (maisto ir kontrolinės grupės žuvų lipidų dalis apskaičiuojama pagal veikimo pradžioje ir pabaigoje gautus duomenis, chemine medžiaga paveiktos grupės žuvų – paprastai tik pagal veikimo pabaigoje gautus duomenis). Atliekant kai kuriuos tyrimus, gali gerokai padidėti žuvų lipidų kiekis; tokiais atvejais labiau tinka naudoti vidutinę bandymų žuvų lipidų koncentraciją, apskaičiuotą pagal veikimo pabaigoje ir apsivalymo pradžioje išmatuotas vertes. Apskritai, apdorojimo grupės duomenis reikėtų naudoti tik abiem lipidų dalims apskaičiuoti.

Pataisos dėl lipidų faktorius (L_c) apskaičiuojamas taip:

$$L_C = \frac{L_{žuvies}}{L_{\ maisto}} \qquad \text{[A7.8 lygtis]}$$

čia: $L_{\text{žuvies}}$ ird L_{maisto} – vidutinė žuvies ir maisto lipidų dalis.

Pataisos dėl lipidų faktorius yra naudojamas biomagnifikacijos faktoriui su pataisa dėl lipidų (BMF_L) apskaičiuoti:

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C} \qquad \text{[A7.9 lygtis]}$$

5. SKIRTUMŲ TARP IŠMATUOTOS NULINIO LAIKO KONCENTRACIJOS ($C_{0,M}$) IR APSKAIČIUOTOS NULINIO LAIKO KONCENTRACIJOS ($C_{0,D}$)ĮVERTINIMAS

Reikėtų palyginti išmatuotą nulinio laiko koncentraciją ($C_{0,m}$) ir apskaičiuotą nulinio laiko koncentraciją ($C_{0,d}$). Jei jos labai panašios, tai tik patvirtintų pirmojo laipsnio modelį, taikomą apsivalymo parametrams gauti.

▼M7

Atliekant kai kuriuos tyrimus, gali būti gautas gana didelis skirtumas tarp apskaičiuotos nulinio laiko koncentracijos vertės $C_{0,d}$ ir vidutinės išmatuotos nulinio laiko koncentracijos $C_{0,m}$ (žr. šio bandymų metodo 159 pastraipos paskutinę įtrauką). Jei $C_{0,d}$ yra gerokai mažesnė nei $C_{0,m}$ ($C_{0,d} << C_{0,m}$), skirtumas gali reikšti nesuviršinto sodrinto maisto buvimą virškinimo trakte. Tai galima patikrinti bandymo keliu, atliekant išpjauto virškinimo trakto analizę, jei sugerties tarpsnio pabaigoje buvo paimti ir laikomi papildomi (visos žuvies) ėminiai. Arba, jei apsivalymo tarpsnio duomenų tiesinei regresijai taikant statistiškai pagrįstą riktų kriterijų pasirodo, kad pirmajam apsivalymo ėminių ėmimo taškui gaunama klaidingai didelė vertė, galbūt, atliekant tiesinę regresiją k_2 gauti, reikėtų atmesti pirmojo apsivalymo tarpsnio taško koncentracijos vertę. Jei tokiais atvejais gerokai sumažėja tiesinės regresijos neapibrėžtis ir yra aišku, kad apsivalymo kinetika buvo maždaug pirmojo laipsnio, galbūt reikėtų naudoti gautas $C_{0,d}$ ir k_2 vertes įsisavinimo efektyvumui skaičiuoti. Tai reikėtų išsamiai pagrįsti ataskaitoje. Gali būti, kad apsivalymo tarpsniui galiojo ne pirmojo laipsnio kinetika. Jei taip galėtų būti (t. y. vietoj tiesinės regresijos tiesės į natūralųjį logaritmą transformuoti duomenys duotų kreivę), maža tikimybė, kad k_2 ir $C_{0,d}$ skaičiavimai yra pagrįsti, todėl reikėtų konsultuotis su biologinės statistikos specialistu.

Jei $C_{0,d}$ yra ypač daug didesnis nei išmatuota vertė ($C_{0,d} >> C_{0,m}$), tai gali rodyti, kad cheminė medžiaga pasišalina labai greitai (t. y. koncentracija ėminių ėmimo taškuose jau pačioje apsivalymo tarpsnio pradžioje buvo arti analizės metodo kiekybinio nustatymo ribos, žr. 6 skirsnį), kad buvo nukrypimas nuo pirmojo laipsnio apsivalymo kinetikos, kad tiesinė regresija k_2 ir $C_{0,d}$ apskaičiuoti turi trūkumų arba kad buvo problemų matuojant koncentracijos vertes kai kuriuose tyrimo ėminių ėmimo laiko taškuose. Tokiais atvejais reikėtų labai kruopščiai ištirti tiesinės regresijos grafiką dėl ėminių, kurių koncentracija atitinka kiekybinio nustatymo ribą ar yra arti jo, dėl riktų ir dėl akivaizdaus kreivumo (kuris leistų daryti prielaidą apie ne pirmojo laipsnio kinetiką), ir pažymėti ataskaitoje. Visi paskesni pakartotinai atlikti tiesinės regresijos skaičiavimai įverčiams pagerinti turėtų būti aprašyti ir pagrįsti. Jei stebimas aiškus nukrypimas nuo pirmojo laipsnio kinetikos, maža tikimybė, kad k_2 ir $C_{0,d}$ skaičiavimai yra pagrįsti, todėl reikėtų pasitarti su biologinės statistikos specialistu.

6. NURODYMAI DĖL LABAI SPARČIAI PASIŠALINANČIŲ BANDOMŲJŲ CHEMINIŲ MEDŽIAGŲ

Kaip aptarta bandymų metodo 129 pastraipoje, kai kurios cheminės medžiagos gali pasišalinti taip greitai, kad patikima nulinio laiko koncentracija $C_{0,d}$ ir k_2 negali būti apskaičiuotos, nes cheminės medžiagos koncentracijos faktiškai nebeįmanoma išmatuoti jau pačioje apsivalymo tarpsnio pradžioje (t. y. nuo apsivalymo tarpsnio antrojo ėminio ir vėliau) (ataskaitoje koncentracijos vertės pateikiamos kaip kiekybinio nustatymo ribos koncentracija). Ši situacija buvo stebima atliekant tarplaboratorinį tyrimą su benz[a]pirenu šiam bandymų metodui patvirtinti ir buvo pateikta metodo tinkamumo patvirtinimo ataskaitos dokumentuose. Tokiais atvejais neįmanoma patikimai atlikti tiesinė regresijos ir yra tikimybė gauti neįtikėtinai didelį $C_{0,d}$ įvertį, todėl gautas tariamasis įsisavinimo efektyvumas yra daug didesnis už 1. Taip galima apskaičiuoti mažesnį k_2 įvertį ir BMF_k„viršutinę ribą“.

Naudojant tuos apsivalymo tarpsnio taškus, kuriuose koncentracija buvo matuojama iki pirmos „neaptiktos“ koncentracijos vertės imtinai (kiekybinio nustatymo ribos koncentracijos), (į natūralųjį logaritmą transformuotos koncentracijos ir laiko priklausomybės) tiesinės regresijos metodu gaunamas k_2 įvertis. Esant tokiems atvejams greičiausiai būtų galima įtraukti tik du duomenų taškus (pvz., apsivalymo tarpsnio 1 ir 2 paros ėminių ėmimo

▼M7

taškus) ir pagal 5 priedėlio A5.22 lygtį gali būti gautas k_2 įvertis. Šis k_2 įvertis gali būti naudojamas įsisavinimo efektyvumui įvertinti pagal A7.1 lygtį, $C_{0,d}$ vertę joje pakeičiant išmatuota nulinio laiko koncentracija ($C_{0,m}$) tais atvejais, kai būtų aiškiai įvertinta, kad $C_{0,d}$ yra daug didesnė, nei būtų gauta atliekant bandymą. Jei $C_{0,m}$ buvo neišmatuojama, reikėtų naudoti aptikimo žuvies audinyje ribą. Jei kai kuriais atvejais gaunama $\alpha > 1$ vertė, daroma prielaida, kad „blogiausiojo atvejo“ įsisavinimo efektyvumas yra lygus 1.

Tada pagal A7.4 lygtį galima gauti maksimalų BMF_K įvertį, ir reikėtų nurodyti, kad tai yra „gerokai mažesnė“ (<<) vertė. Pvz., jei tyrimas atliekamas, kai maisto norma yra 3 %, apsivalymo pusėjimo trukmė yra trumpesnė kaip 3 paros, o „blogiausiojo atvejo“ α yra lygus 1, BMF_K tikėtinai yra mažesnis nei maždaug 0,13. Atsižvelgiant į šio įvertinimo tikslą ir tą faktą, kad vertės iš esmės bus su atsarga, nebūtina daryti praskiedimo dėl augimo arba dėl žuvų ir maisto lipidų kiekio pataisą.

▼M7

8 priedėlis

METODAI LAIKINIESIEMS BCF ĮVERČIAMS GAUTI PAGAL DUOMENIS, SUKAUPTUS ATLIEKANT MITYBOS TYRIMĄ

Į šį bandymų metodą įtrauktas veikimo per mitybą metodas, skirtas bandyti chemines medžiagas, kurių praktiškai neįmanoma bandyti taikant veikimo per vandeninę terpę metodą. Bandant veikimo per vandeninę terpę metodu, gaunamas biologinio koncentravimo faktorius, o mitybos metodu tiesiogiai gaunama informacija apie maitinimo biomagnifikacijos gebą. Daugumai cheminės medžiagos saugos sistemų reikia turėti informacijos apie veikimo per vandeninę terpę biologinį koncentravimą (pvz., vertinant riziką ir taikant visuotinai suderintą cheminių medžiagų klasifikavimo sistemą). Todėl reikia naudoti mitybos tyrimo duomenis, kad būtų galima gauti biologinio koncentravimo faktoriaus įvertį, kuris būtų palyginamas su gautu taikant veikimo per vandeninę terpę metodą ([1]). Šiame skyriuje nagrinėjami metodai, kuriuos taikant tai būtų galima padaryti, kartu pripažįstant šiems įverčiams būdingus trūkumus.

Atliekant mitybos tyrimą, matuojamas apsivalymas jo greičio konstantai k_2 gauti. Jei sugerties greičio konstantos įvertį galima gauti turint duomenis tai situacijai, kurioje žuvys buvo veikiamos bandomąja chemine medžiaga per vandenį, galima būtų įvertinti kinetinį BCF.

Sugerties greičio konstantos vertinimas, kai bandomąja chemine medžiaga veikiama per vandenį, yra pagrįstas daugeliu prielaidų, kurių kiekviena prisidės prie įverčio neapibrėžties. Be to, taikant šį BCF įverčio gavimo metodą daroma prielaida, kad visuminis apsivalymo greitis (įskaitant prisidedančius veiksnius, pvz., pasiskirstymą kūne ir atskirus apsivalymo procesus) nepriklauso nuo veikimo būdo, kuriuo buvo gautas kūno sugertas bandomosios cheminės medžiagos kiekis.

Įvertinimo metodui būdingas prielaidas galima apibendrinti taip:

apsivalymas nuo tam tikros cheminės medžiagos po mitybos tyrimo vyksta taip pat, kaip ir po veikimo per vandeninę terpę metodo;

sugertis iš vandens vyks pagal pirmojo laipsnio kinetiką;

atsižvelgiant į sugerčiai įvertinti taikytą metodą:

— sugertį galima susieti vien tik su žuvies mase,

— sugertį galima susieti vien tik su cheminės medžiagos pasiskirstymo tarp oktanolio ir vandens koeficientu,

— sugertį galima susieti su žuvies masės ir cheminės medžiagos pasiskirstymo tarp oktanolio ir vandens koeficiento deriniu,

— veiksniai, kurie praktiškai gali turėti įtakos sugerčiai atliekant veikimo per vandeninę terpę metodo tyrimą, pvz., cheminės medžiagos biologinis įsisavinamumas, adsorbcija ant aparatūros, molekulių dydis ir kt., daro mažą poveikį,

— ir, svarbiausia:

duomenų bazė („mokomasis rinkinys“), naudota sugerties įvertinimo metodui sukurti, reprezentuoja tiriamą cheminę medžiagą.

Keliuose atvirai paskelbtuose darbuose yra pateiktos lygtys, kurios sugertį per žuvų žiaunas susieja su pasiskirstymo tarp oktanolio ir vandens koeficientu, žuvies mase (1) (2) (3) (4), tūriu ir (arba) lipidų kiekiu, sugertimi ar difuzija per membraną (5) (6), žuvų ventiliacijos tūriu (7) ir kurioms taikomas lakumo ir masių balanso metodas (8) (9) (10). Išsamus tokių metodų įvertinimas šiame

([1]) Gamtoje tikėtina, kad stipriai hidrofobinių cheminių medžiagų nurijimas daro didesnį poveikį nei veikimo per vandeninę terpę bandymas, todėl BCF įvertis nėra tokios cheminės medžiagos biologinio kaupimosi gebos tikslus rodiklis.

▼M7

kontekste yra pateiktas *Crookes & Brooke* (11). *Barber* (12) publikacija, kurioje dėmesys sutelktas į biologinio kaupimosi dėl mitybos modeliavimą, taip pat yra naudinga šiomis aplinkybėmis, nes į ją įtraukti sugerties per žiaunas indėlio į kinetiką modeliai. 2004 m. mitybos protokolo patvirtinančių nuorodų dokumentas (13) taip pat buvo skirtas šiam aspektui.

Atrodo, kad dauguma šių modelių buvo gauti turint ribotas duomenų bazes. Jei yra informacijos apie modeliams sukurti naudojamų duomenų bazes, pasirodo, kad naudojamos cheminės medžiagos dažnai yra panašios struktūros arba klasės (funkcinių grupių požiūriu, pvz., chloro organiniai junginiai). Tokį modelį taikant kito tipo cheminės medžiagos sugerties greičio konstantai prognozuoti, neapibrėžtis didėja ne tik dėl bandymui būdingų aspektų, pvz., rūšies, temperatūros ir kt., bet ir dėl modelio.

Turimų metodų apžvalga (11) parodė, kad nei vienas iš metodų nėra „tikslesnis“ nei kiti. Todėl kiekvieną naudotą modelį reikėtų aiškiai pagrįsti. Jei yra keli metodai, kurių taikymą būtų galima pagrįsti, galbūt būtų tikslinga pateikti kelis k_1 (tuo pačiu BCF) įverčius arba k_1 (ir BCF) verčių intervalą pagal kelis sugerties įvertinimo metodus. Tačiau, atsižvelgiant į modelių tipų ir jiems kurti naudojamų duomenų rinkinių skirtumus, netiktų naudoti skirtingais būdais gautų įverčių vidutinę vertę.

Kai kurie tyrėjai teigė, kad, siekiant atsižvelgti į cheminės medžiagos adsorbciją ant ištirpusios organinės anglies (DOC) veikimo per vandeninę terpę sąlygomis, būtina daryti šios rūšies BCF įverčio pataisą dėl biologinio įsisavinamumo, kad įvertis atitiktų veikimo per vandeninę terpę tyrimų rezultatus (pvz., (13) (14)). Tačiau ši pataisa gali netikti, atsižvelgiant į tai, kad, atliekant veikimo per vandeninę terpę tyrimą, reikia mažos DOC koncentracijos (t. y. biologiškai įsisavinamos ir tirpale išmatuotos cheminės medžiagos santykio) „blogiausiojo atvejo“ įverčiui gauti. Stipriai hidrofobinių cheminių medžiagų sugertį per žiaunas gali riboti pasyvios difuzijos šalia žiaunų paviršiaus greitis; šiuo atveju gali būti taip, kad darant pataisą būtų įvertintas ne tas reiškinys, dėl kurio ji buvo numatyta.

Patartina atkreipti didesnį dėmesį į metodus, kuriems reikia nesunkiai gaunamų įvesties duomenų apie chemines medžiagas, bandomas pagal čia aprašytą mitybos tyrimą (t. y. log K_{OW}, žuvų masė). Gali būti taikomi kiti metodai, kuriems galima naudoti sudėtingesnius įvesties duomenis, tačiau bandant gali prireikti papildomų matavimų arba ne visiems prieinamų išsamių žinių apie bandomąją cheminę medžiagą ar žuvų rūšį. Be to, modelio pasirinkimui gali turėti įtakos tinkamumo lygis ir taikymo sritis (įvairių metodų peržiūra ir palyginimas pateiktas (11)).

Reikėtų turėti omenyje, kad gautas k_1 įvertis ir apskaičiuotas BCF yra neapibrėžti ir jiems gali tekti taikyti įrodomosios duomenų galios metodą kartu su gautu BMF ir cheminės medžiagos parametrais (pvz., molekulių dydžiu), kad būtų gautas visas cheminės medžiagos biologinio kaupimosi gebos vaizdas. Šių parametrų aiškinimas ir naudojimas gali priklausyti nuo reglamentavimo sistemos.

LITERATŪRA

(1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 25: 1-14.

(2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): Allometric applications. Aquat. Toxicol. 30: 325-341.

(3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

▼M7

(4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. Environ. Toxicol. Chem. 22: 1963-1992.

(5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in Aquatic Toxicology and Environmental Fate, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.

(6) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343-2355.

(7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

(8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. Environ. Toxicol. Chem. 20: 1399-1420.

(9) Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. Environ. Sci. Technol. 31: 577-583.

(10) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. QSAR Comb. Sci. 22: 337-345.

(11) Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.

(12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. Environ. Toxicol. Chem. 27: 755-777

(13) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in Handbook of property estimation methods for chemicals, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Racton, FL, USA: 189-231.

▼C1

C.14. ŽUVŲ MAILIAUS AUGIMO BANDYMAS

1. METODAS

Šis toksiškumo augimui bandymo metodas yra OECD TG 215 (2000) kopija.

1.1. ĮVADAS

Šis bandymas skirtas įvertinti ilgo veikimo cheminėmis medžiagomis poveikį žuvų mailiaus augimui. Jis pagrįstas Europos Sąjungoje sukurtu ir tarplaboratoriniais bandymais patikrintu (1) (3) dinaminiu metodu, taikytu įvertinti cheminių medžiagų poveikį vaivorykštinio upėtakio (*Oncorynchus mykiss*) mailiaus augimui. Galima naudoti kitas dokumentais tinkamai patvirtintas rūšis. Pvz., įgyta patirties atliekant zebrinės danijos (*Danio rerio*) [1] (3) (4) ir japoninės medakos (*medaka, Oryzias latipes*) (5) (6) (7) augimo bandymus.

Žr. taip pat C dalies bendrąjį įvadą.

1.2. APIBRĖŽTYS

Mažiausia pastebimą poveikį sukelianti koncentracija (LOEC) – mažiausia bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant medžiaga turi didelį poveikį ($p < 0,05$) lyginant su kontroliniais bandiniais. Tačiau visų didesnių kaip LOEC bandomųjų koncentracijų kenksmingas poveikis turi būti lygus ar didesnis už LOEC poveikį.

Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) – bent kiek už LOEC mažesnė bandomoji koncentracija.

EC_X – šiame bandyme tai bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant žuvų augimo greičio pokytis lyginant su kontroliniais bandiniais yra x %.

Įkrova – gyvų žuvų masė, tenkanti vandens tūrio vienetui.

Žuvų tankis – žuvų skaičius, tenkantis vandens tūrio vienetui.

Atskiros žuvies savitasis augimo greitis išreiškia atskiros žuvies augimo greitį pagal jos pradinę masę.

Vidutinis savitasis augimo greitis rezervuare išreiškia rezervuaro populiacijos vidutinį augimo greitį esant vienai koncentracijai.

„***Pseudo***“ ***savitasis augimo greitis*** išreiškia atskirų žuvų augimo greitį lyginant su rezervuaro populiacijos vidutine pradine mase.

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

▼C1

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Eksponentinio augimo tarpsnio žuvų mailius pasveriamas, dedamas į bandymo kameras, kur jis geriau dinaminio bandymo sąlygomis ar, jei neįmanoma, atitinkamomis pusiau statinio bandymo (periodinio atnaujinimo) sąlygomis yra veikiamas bandomosios medžiagos subletalios koncentracijos intervalo vandeniniais tirpalais. Bandymo trukmė 28 paros. Žuvys maitinamos kasdien. Maisto norma nustatoma pagal pradinę žuvų masę ir po 14 parų gali būti apskaičiuojama iš naujo. Bandymo pabaigoje žuvys vėl sveriamos. Taikant regresijos modelį analizuojamas poveikis augimo greičiui norint nustatyti koncentraciją, sukeliančią x % augimo greičio pokytį, t y. EC_X (pvz., EC_{10}, EC_{20} ar EC_{30}). Be to, mažiausiai pastebimą poveikį sukeliančiai koncentracijai (LOEC), taigi ir nepastebėto poveikio koncentracijai (NOEC) nustatyti duomenis galima lyginti su kontrolinių bandinių vertėmis.

1.4. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

Reikėtų turėti ūmaus toksiškumo bandymo (žr. C.1 bandymo metodą), geriau atlikto su šiam bandymui pasirinkta rūšimi, rezultatus. Tai reikštų, kad yra žinomas bandomosios medžiagos tirpumas vandenyje ir garų slėgis ir kad yra patikimas analizės metodas bandomajai medžiagai bandomuosiuose tirpaluose kiekybiškai nustatyti žinomu tikslumu ir aptikimo riba, kurie nurodyti ataskaitoje.

Naudingą informaciją sudaro struktūrinė formulė, medžiagos grynumas, stabilumas vandenyje ir veikiant šviesai, pK_a, P_{ow} ir lengvo biologinio skaidumo bandymo rezultatai (žr. C.4 metodą).

1.5. BANDYMO TINKAMUMAS

Bandymas yra tinkamas, jei įvykdytos šios sąlygos:

— baigiant bandymą kontrolinio (-ių) bandinio (-ių) žuvų gaištamumas turi būti ne didesnis kaip 10 %,

— kontrolinio (-ių) bandinio (-ių) vidutinė žuvų masė turi būti pakankamai padidėjusi, kad būtų galima aptikti mažiausią augimo greičio kitimą, kuris laikomas reikšmingu. Tarplaboratorinio lyginimo bandymas (2) parodė, kad kontrolinių bandinių vaivorykštinio upėtakio vidutinė masė per 28 paras turi padidėti bent pusę jo pradinės vidutinės masės (t. y. 50 %); pvz., pradinė masė: 1 g/žuviai (= 100 %), galutinė masė po 28 parų: ≥ 1,5 g/žuviai (≥ 150 %),

— ištirpusio deguonies koncentracija per visą bandymą turi sudaryti bent 60 % oro prisotinimo vertės (ASV),

— kiekvienu bandymo momentu bandymo kamerų vandens temperatūra turi nesiskirti daugiau kaip ± 1 °C ir būti palaikoma 2 °C intervale bandomosioms rūšims nurodytame intervale (1 priedėlis).

1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Aparatūra**

Įprasta laboratorinė įranga ir ši speciali įranga:

— deguonies ir pH matuokliai,

▼C1

— įranga vandens kietumui ir šarmingumui nustatyti,

— atitinkama aparatūra temperatūrai kontroliuoti, geriau nuolatinės kontrolės aparatūra,

— rezervuarai, pagaminti iš chemiškai inertiškos medžiagos, kurių talpa atitinka rekomenduotą įkrovą bei žuvų tankį (žr. 1.8.5 skirsnį ir 1 priedėlį),

— reikiamo tikslumo svarstyklės (t. y. ± 0,5 % tikslumo).

1.6.2. **Vanduo**

Galima naudoti bet kokį vandenį, kuriame žuvys gali ilgai gyventi ir augti. Vandens kokybė turi būti pastovi visą bandymo laiką. pH vertė turi būti 6,5– 8,5, tačiau atliekant konkretų bandymą pH reikšmė neturi kisti daugiau kaip ± 0,5 pH vieneto. Rekomenduojamas didesnis kaip 140 mg/l (skaičiuojant $CaCO_3$) kietumas. Norint užtikrinti, kad skiedimo vanduo per daug neturėtų įtakos bandymo rezultatui (pvz., nesudarytų kompleksinių junginių su bandomąja medžiaga), bandiniai tam tikrais laiko tarpais turi būti analizuojami. Sunkiųjų metalų jonų (pvz., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), pagrindinių anijonų ir katijonų (pvz., Ca, Mg, Na, K, C1, SO_4), pesticidų (pvz., bendro fosforo organinių pesticidų ir bendro chloro organinių pesticidų kiekio), bendrosios organinės anglies ir suspenduotų kietųjų dalelių analizė turi būti atliekama, pavyzdžiui, kas tris mėnesius, jei žinoma, kad skiedimo vandens kokybė yra gana pastovi. Jei buvo įrodyta, kad vandens kokybė yra pastovi bent metus, analizė gali būti atliekama ne taip dažnai, o intervalai padidinti (pvz., kas šešis mėnesius). Kai kurios skiedimui tinkamo vandens charakteristikos yra pateiktos 2 priedėlyje.

1.6.3. **Bandomieji tirpalai**

Pasirinktos koncentracijos bandomieji tirpalai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą.

Pradinį tirpalą geriau ruošti bandomąją medžiagą maišant ar plakant skiedimo vandenyje mechaninėmis priemonėmis (pvz., maišykle ar ultragarsu). Pakankamai koncentruotam pradiniam tirpalui ruošti galima naudoti prisotinimo kolonėles (tirpumo kolonėles).

Kartais norint gauti tinkamos koncentracijos pradinį tirpalą gali tekti naudoti tirpiklius ar dispergatorius (tirpinimo medžiagas). Tinkami tirpikliai yra acetonas, etanolis, metanolis, dimetilsulfoksidas, dimetilformamidas ir trietilenglikolis. Tinkami dispergatoriai yra *Cremophor* RH40, *Tween* 80, 0,01 % metilceliuliozė ir HCO-40. Reikėtų atsargiai naudoti lengvai biologiškai skaidomas medžiagas (pvz., acetoną) ir (ar) labai lakius junginius, nes, atliekant dinaminius bandymus, jie gali kelti problemų dėl bakterijų kaupimosi. Naudojama tirpinimo medžiaga neturi daryti reikšmingo poveikio žuvų augimui ir neigiamo poveikio mailiui, kaip kad nustatoma atliekant kontrolinį bandymą vien tik su tirpikliu.

▼C1

Įvairios bandomosios koncentracijos tirpalams į bandymo kameras tiekti dinaminių bandymų metu reikalinga sistema, kuri nepertraukiamai dozuotų ir skiestų bandomosios medžiagos pradinį tirpalą (pvz., dozavimo siurblys, proporcingasis skiestuvas, prisotinimo sistema). Pradinių tirpalų ir skiedimo vandens srautai turi būti kartais, geriau kasdien, tikrinami ir per visą bandymą neturėtų kisti daugiau kaip 10 %. Tarplaboratorinio palyginimo bandymas (2) parodė, kad, atliekant bandymą su vaivorykštiniu upėtakiu, yra priimtinas 6 litrų/g žuvies/parai vandens keitimo dažnis (žr. 1.8.2.2 skirsnį).

Pusiau statiniams (atnaujinimo) bandymams terpės atnaujinimo dažnis priklausys nuo bandomosios medžiagos stabilumo, tačiau vandenį atnaujinti rekomenduojama kasdien. Jei pradiniai stabilumo bandymai (žr. 1.4 skirsnį) rodo, kad bandomosios medžiagos koncentracija laikotarpiu tarp atnaujinimų yra nestabili (t. y. yra už 80–120 % vardinės koncentracijos ribų ar mažesnė kaip 80 % išmatuotos pradinės koncentracijos), reikėtų numatyti dinaminį bandymą.

1.6.4. **Rūšių parinkimas**

Šiam bandymui rekomenduojama rūšis yra vaivorykštinis upėtakis (*Oncorhynchus mykiss*), nes didžiausia tarplaboratorinio palyginimo bandymų patirtis buvo sukaupta naudojant šią rūšį (1) (2). Galima naudoti ir kitas dokumentais tinkamai patvirtintas rūšis, bet tinkamoms bandymo sąlygoms gauti bandymo metodiką gali tekti pritaikyti. Pvz., įgyta patirties su zebrine danija (*Danio rerio*) (3) (4) ir japonine medaka (*medaka, Oryzias latipes*) (5) (6) (7). Tokiu atveju ataskaitoje reikia pateikti rūšies pasirinkimo priežastį ir bandymo metodą.

1.6.5. **Žuvų laikymas**

Pasirenkamos vienos populiacijos ir geriau to paties neršto bandomosios žuvys, kurios prieš bandymą bent dvi savaites buvo laikomos tokios kokybės vandenyje ir tokiomis apšvietimo sąlygomis, kurios panašios į bandymo sąlygas. Jų dienos maisto davinys laikymo ir bandymo laikotarpiu turi sudaryti ne mažiau kaip 2 % kūno masės, bet geriau 4 % kūno masės.

Po 48 valandų stabilizavimo laikotarpio užrašomi gaištamumo duomenys ir taikomi šie kriterijai:

— populiacijos gaištamumas per septynias paras yra didesnis kaip 10 %: visa partija atmetama,

— populiacijos gaištamumas 5–10 %: žuvys papildomai aklimatizuojamos dar septynias paras; jei per kitas septynias paras gaištamumas yra didesnis kaip 5 %, visa partija atmetama,

— populiacijos gaištamumas per septyniais paras yra mažesnis kaip 5 %: partija priimama.

Dvi savaites prieš bandymą ir visą bandymo laiką žuvys neturėtų būti gydomos vaistais.

▼C1

1.7. BANDYMO SCHEMA

„Bandymo schema“ – bandomosios koncentracijos verčių ir tarpo tarp jų pasirinkimas, rezervuarų skaičiaus kiekvienai koncentracijai ir žuvų skaičiaus viename rezervuare parinkimas. Geriausia būtų, kad bandymo schema būtų pasirinkta atsižvelgiant į:

— tyrimo tikslą,

— taikomą statistinės analizės metodą,

— bandymo išteklių buvimą ir kainą.

Jei įmanoma, išdėstant tikslą reikėtų nurodyti statistinę galią duoto dydžio (pvz., augimo greičio) skirtumui aptikti, arba kitaip, koks turi būti EC_X (pvz., kai x = 10, 20 ar 30 ir geriau ne mažesnis kaip 10) įvertinimo preciziškumas. Be šito negalima tiksliai apibrėžti tyrimo apimties.

Svarbu pripažinti, kad vienam statistinės analizės metodui taikytas optimalus (geriausiai panaudoja išteklius) planas nebūtinai yra optimalus kitam metodui. Taigi rekomenduotas planas LOEC/NOEC įvertinti nebus toks pat kaip regresinei analizei rekomenduotas planas.

Dėl Stephan ir Rogers (8) svarstytų priežasčių regresinė analizė dažniausiai tinka geriau nei dispersinė analizė. Tačiau nerandant tinkamo regresijos modelio ($r^2 < 0,9$), reikia taikyti NOEC/LOEC įvertinimą.

1.7.1. **Regresinės analizės planas**

Svarbūs regresijos metodu analizuojamos bandymo schemos nagrinėtini klausimai yra šie:

— Bandymui naudotos koncentracijos būtinai turi aprėpti poveikio koncentraciją (pvz., $EC_{10, 20, 30}$) ir dominančio medžiagos poveikio koncentracijos verčių intervalą. Poveikio koncentracijos įverčių preciziškumas bus geriausias, kai poveikio koncentracijos bus per bandomųjų koncentracijos verčių intervalo vidurį. Tinkamoms bandomosioms koncentracijoms parinkti gali būti naudingas išankstinis intervalo nustatymo bandymas.

— Norint turėti tinkamą statistinį modelį, bandymui turi būti naudojamas vienas kontrolinis rezervuaras ir penki papildomi rezervuarai, skirti skirtingoms koncentracijos vertėms. Jei naudojama tirpinimo medžiaga, be bandomosios serijos, turi būti dar vienas kontrolinis bandinys su didžiausios bandomosios koncentracijos tirpinimo medžiaga (žr. 1.8.3 ir 1.8.4 skirsnius).

— Galima naudoti tinkamą geometrinės progresijos ar logaritminę eilutę (9) (žr. 3 priedėlį). Geriau naudoti logaritminę bandomųjų koncentracijų eilutę.

▼C1

— Jei yra daugiau kaip šeši rezervuarai, papildomi rezervuarai turi būti panaudoti lygiagretiems bandymams arba paskirstyti visam koncentracijos verčių intervalui tarpams tarp jų sumažinti. Abi šios priemonės vienodai tinka.

1.7.2. **NOEC/LOEC įvertinimo planas taikant dispersinę analizę (ANOVA)**

Kiekvienai koncentracijos vertei geriau būtų turėti dar vieną rezervuarą ir statistinė analizė turėtų būti atliekama rezervuaro lygiu (10). Jei nėra rezervuarų lygiagrečiam bandymui, neįmanoma atsižvelgti į kintamumą tarp rezervuarų be to kintamumo, kuris atsiranda dėl atskirų žuvų. Tačiau patirtis rodo (11), kad tiriamu atveju kintamumas tarp rezervuarų buvo labai mažas lyginant su kintamumu viename rezervuare (t. y. tarp žuvų). Taigi santykinai priimtina alternatyva yra statistinę analizę daryti kiekvienos žuvies lygiu.

Paprastai naudojamos bent penkios koncentracijos vertės, sudarančios eilutę pagal geometrinę progresiją, kurios koeficientas geriausiai turėtų būti ne didesnis kaip 3,2.

Kai bandymai atliekami turint rezervuarus lygiagretiems bandymams, lygiagrečių kontrolinių rezervuarų skaičius, taigi ir žuvų skaičius, turi būti dvigubai didesnis negu kiekvienai bandomajai koncentracijai pasirinktas skaičius, kuris turi būti vienodas (12) (13) (14). Kita vertus, jei rezervuarų lygiagretiems bandymams nėra, kontrolinės grupės žuvų skaičius turi būti lygus kiekvienai bandomajai koncentracijai naudojamam žuvų skaičiui.

Jei dispersinė analizė (ANOVA) turi būti atliekama rezervuarų lygiu, o ne kiekvienos žuvies lygiu (tam reikėtų kiekvieną žuvį paženklinti ar naudoti „pseudo“ savituosius augimo greičius (žr. 2.1.2 skirsnį)), reikia turėti pakankamą rezervuarų lygiagretiems bandymams skaičių, kad būtų galima nustatyti standartinį nuokrypį tarp „vienos koncentracijos rezervuarų“. Vadinasi, dispersinės analizės paklaidai reikėtų turėti bent 5 laisvės laipsnius (10). Jei atliekami tik lygiagretūs kontroliniai bandymai, esama pavojaus, kad paklaidos kintamumas bus pakitęs, nes paklaida gali didėti didėjant tiriamo augimo greičio vidutinei vertei. Kadangi augimo greitis koncentracijai didėjant greičiausiai mažės, atsiranda tendencija per daug sureikšminti kintamumą.

1.8. BANDYMO PROCEDŪRA

1.8.1. **Bandomųjų žuvų atranka ir svėrimas**

Svarbu, kad žuvų masės skirtumas bandymo pradžioje būtų kuo mažesnis. Bandymams rekomenduotų skirtingų rūšių žuvų masės tinkami intervalai yra pateikti 1 priedėlyje. Būtų geriausia, kad bandymo pradžioje visos partijos žuvų masės kitimo intervalas būtų lygus žuvų masės aritmetiniam vidurkiui ± 10 % ir jokiu būdu nebūtų didesnis kaip 25 %. Vidutinei masei nustatyti rekomenduojama prieš bandymą pasverti žuvų ėminio dalį.

▼C1

Žuvys turi būti nustojamos maitinti prieš 24 h iki bandymo pradžios. Toliau jos turi būti atsitiktinai atrenkamos. Vartojant bendrąjį anestetiką (pvz., vandeninį 100 mg/l (3-aminobenzenkarboninės rūgšties etilesterio metansulfonato (MS 222) tirpalą, neutralizuotą sumaišant dvi dalis natrio hidrokarbonato ir vieną dalį MS 222), žuvys turi būti atskirai pasveriamos gyvų žuvų (sausai nušluostytų filtro popieriumi) masei nustatyti 1 priedėlyje nurodytu tikslumu. Tos žuvys, kurių masė atitinka numatytą intervalą, paliekamos ir vėliau paskirstomos tarp bandymo indų. Turi būti registruojama bendra kiekvieno bandymo indo gyvų žuvų masė. Anestetiko vartojimas, taip pat apdorojimas (įskaitant šluostymą ir svėrimą) žuvų mailiui gali sukelti įtampą ir jį galima sužeisti, ypač jei tai mažų žuvų rūšys. Taigi apdoroti mailių reikia ypač atsargiai ir vengti bandomųjų gyvūnų įtampos ir sužeidimų.

Žuvys vėl sveriamos 28 bandymo parą (žr. 1.8.6 skirsnį). Tačiau, jei manoma, kad būtina perskaičiuoti maisto davinį, žuvys gali būti sveriamos 14 bandymo parą (žr. 1.8.2.3 skirsnį). Galima taikyti kitus metodus, pvz., fotografavimą norint nustatyti žuvų dydžio pokytį, pagal kurį būtų galima reguliuoti maisto davinį.

1.8.2. **Veikimo sąlygos**

1.8.2.1. *Trukmė*

Bandymo trukmė ≥ 28 paros.

1.8.2.2. *Įkrova ir žuvų tankis*

Svarbu, kad įkrova ir žuvų tankis atitiktų naudojamas žuvų rūšis (žr. 1 priedėlį). Jei žuvų tankis per didelis, dėl perpildymo sukeltos įtampos mažėja augimo greitis ir žuvys gali susirgti. Jei žuvų tankis per mažas, gali atsirasti teritorinis elgesys, kuris irgi gali veikti augimą. Bet kuriuo atveju įkrova turi būti gana maža, kad be aeravimo būtų palaikoma bent 60 % ASV ištirpusio deguonies koncentracija. Tarplaboratorinis bandymas (2) parodė, kad vaivorykštiniam upėtakiui priimtina įkrova, kai 40 l tūrio vandenyje yra 16 upėtakių po 3–5 g masės. Rekomenduojamas vandens keitimo atliekant bandymą dažnis yra 6 litrai/g žuvies/parai.

1.8.2.3. *Maitinimas*

Žuvys turi būti šeriamos atitinkamu maistu (1 priedėlis) ir pakankamai dažnai, kad būtų garantuotas priimtinas augimo greitis. Reikėtų stengtis išvengti mikrobų dauginimosi ir vandens drumstumo. Vaivorykštiniam upėtakiui 4 % kūno masės davinys per parą turėtų atitikti šias sąlygas (2) (15) (16) (17). Paros davinys turi būti padalytas į dvi lygias dalis ir sušeriamas žuvims per du kartus darant bent penkių valandų pertrauką. Davinys grindžiamas kiekvieno bandymo indo bendra pradine žuvų mase. Jei žuvys vėl sveriamos 14 parą, davinys perskaičiuojamas. Prieš sveriant žuvys turi būti nemaitintos 24 h.

▼C1

Nesuėstas maistas ir išmatos iš bandymo indų turi būti šalinami kasdien rūpestingai išsiurbiant kiekvieno rezervuaro dugną.

1.8.2.4. *Šviesa ir temperatūra*

Apšvietimo laikotarpis ir vandens temperatūra turi atitikti žuvų rūšį (1 priedėlis).

1.8.3. **Bandomosios medžiagos koncentracijos**

Paprastai reikia naudoti penkias bandomosios medžiagos koncentracijas, neatsižvelgiant į bandymo schemą (žr. 1.7.2 skirsnį). Ankstesnės žinios apie bandomosios medžiagos toksiškumą (pvz., ūmaus toksiškumo bandymo ir (ar) koncentracijų intervalo nustatymo tyrimo duomenys) turėtų padėti renkantis tinkamas bandomąsias koncentracijas. Sprendimą naudoti mažiau kaip penkias koncentracijas reikia pagrįsti. Didžiausia išbandyta koncentracija neturėtų būti didesnė kaip medžiagos tirpumo vandenyje ribinė koncentracija.

Jei pradinio tirpalo ruošimui lengvinti naudojama tirpinimo medžiaga, jos galutinė koncentracija turi būti ne didesnė kaip 0,1 ml/l, ir geriau būtų, jei ji visuose bandymo induose būtų vienoda (žr. 1.6.3 skirsnį). Tačiau reikėtų kiek įmanoma stengtis vengti šias medžiagas naudoti.

1.8.4. **Kontroliniai bandiniai**

Skiedimo vandens kontrolinių bandinių skaičius priklauso nuo bandymo schemos (žr. 1.7–1.7.2 skirsnius). Jei naudojama tirpinimo medžiaga, į bandymo schemą turi būti įtrauktas toks tirpinimo medžiagos kontrolinių bandinių skaičius, kiek yra skiedimo vandens kontrolinių bandinių.

1.8.5. **Kiekybinių analizių ir matavimų dažnis**

Atliekant bandymą bandomosios medžiagos koncentracijų vertės nustatomos reguliariais tarpais (žr. toliau).

Atliekant dinaminius bandymus, skiediklio ir toksinės medžiagos pradinio tirpalo srautai turi būti tikrinami tam tikrais laiko tarpais, geriau kasdien, ir visą bandymą neturi kisti daugiau kaip 10 %. Jei tikimasi, kad bandomosios medžiagos koncentracijos vertės bus lygios vardinei koncentracijai ± 20 % (t. y. 80–120 % intervalu; žr. 1.6.2 ir 1.6.3 skirsnius), rekomenduojama bent didžiausią ir mažiausią bandomąją koncentraciją nustatyti bandymo pradžioje, o vėliau kas savaitę. Jei atliekant bandymus nesitikima, kad bandomosios medžiagos koncentracija gali likti ± 20 % vardinės koncentracijos vertės (pagal bandomosios medžiagos stabilumo duomenis), būtina nustatyti visas bandomąsias koncentracijas, bet pagal tą patį grafiką.

Jei tikimasi, kad atliekant pusiau statinius (atnaujinimo) bandymus, bandomosios medžiagos koncentracija liks ± 20 % vardinės koncentracijos vertės, rekomenduojama nustatyti bent didžiausią ir mažiausią bandomąją koncentraciją iš karto po tirpalo paruošimo ir prieš pat jo atnaujinimą tyrimo pradžioje ir kas savaitę vėliau. Jei tai bandymai, kuriuos atliekant nemanoma, kad koncentracija liks ± 20 % vardinės koncentracijos vertės, turi būti nustatomos visos koncentracijos vertės laikantis to paties kaip ir stabilesnėms medžiagoms analizės režimo.

▼C1

Rekomenduojama rezultatus pagrįsti išmatuotomis koncentracijos vertėmis. Tačiau jei yra įrodymų, kad bandomosios medžiagos koncentracija visą bandymo laiką buvo pakankamai palaikoma ± 20 % vardinės koncentracijos vertės ar išmatuotos pradinės koncentracijos vertės, rezultatai gali būti grindžiami vardine ar išmatuota vertėmis.

Bandinius gali tekti filtruoti (pvz., pro 0,45 μm akytumo filtrą) ar centrifuguoti. Rekomenduojama metodika būtų centrifugavimas. Tačiau, jei filtras bandomosios medžiagos neadsorbuoja, priimtinas būtų ir filtravimas.

Atliekant bandymą visuose bandymo induose turi būti matuojama ištirpusio deguonies koncentracija, pH ir temperatūra. Turi būti matuojamas kontrolinių bandinių ir indo su didžiausios koncentracijos bandiniu bendras kietumas, šarmingumas ir sūrumas (jei tinka). Matuojama bent ištirpusio deguonies koncentracija ir sūrumas (jei tinka) tris kartus (bandymo pradžioje, viduryje ir pabaigoje). Atliekant pusiau statinius bandymus, ištirpusio deguonies koncentraciją rekomenduojama matuoti dažniau, geriau prieš kiekvieną vandens atnaujinimą ir po jo ar bent kartą per savaitę. Atliekant statinius bandymus su atnaujinimu pH vertė turi būti matuojama prieš kiekvieną vandens atnaujinimą ir po jo, o atliekant dinaminius bandymus – bent kartą per savaitę. Vandens kietumas ir šarmingumas kiekvienam bandymui matuojami vieną kartą. Temperatūrą bent viename bandymo inde geriau kontroliuoti nuolatos.

1.8.6. **Stebėjimai**

Masė: baigiant bandymą visos gyvos žuvys turi būti pasvertos gyvų žuvų (sausai nušluostytų filtro popieriumi) masei nustatyti grupėmis pagal bandymo indus ar atskirai kiekviena žuvis. Labiau tinka svėrimas bandymo induose, nes, sveriant kiekvieną žuvį, jas reikėtų atskirai ženklinti. Nustatant atskirų žuvų masę kiekvienos žuvies savitajam augimo greičiui nustatyti, pasirinktoji ženklinimo metodika gyvūnams neturi kelti įtampos (gali tikti žuvų šaltojo ženklinimo alternatyvos, pvz., plonas spalvotas valas).

Žuvys visą bandymo laiką turi būti tiriamos kasdien ir bet kokios išorės anomalijos (pvz., kraujavimas, spalvos pakeitimas) bei neįprastas elgesys turi būti pažymėti. Turi būti registruojami visi gaištamumo atvejai, o negyvos žuvys kuo greičiau pašalinamos. Jei įkrova ir žuvų tankis yra pakankami, negyvos žuvys kitomis nekeičiamos, kad būtų išvengta poveikio augimui dėl vienam rezervuarui tenkančio žuvų skaičiaus kitimo. Tačiau maitinimo normą reikia koreguoti.

2. **DUOMENYS IR ATASKAITA**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Rekomenduojama, kad, rengiant bandymo schemą ir ją analizuojant, dalyvautų statistikas, nes šis bandymo metodas leidžia smarkiai keisti eksperimento planą, pvz., bandymo kamerų skaičių, bandomųjų koncentracijų skaičių, žuvų skaičių ir t. t. Atsižvelgiant į bandymo schemos variantų įvairovę, jokių specialių nurodymų dėl statistinės metodikos čia nepateikiama.

▼C1

Augimo greitis neturėtų būti apskaičiuojamas bandymo indams, jei gaištamumas juose didesnis kaip 10 %. Tačiau gaištamumas turi būti nurodytas visoms bandomosioms koncentracijoms.

Nesvarbu, koks metodas taikomas duomenims analizuoti, svarbiausia sąvoka yra savitasis augimo greitis r tarp laiko t_1 ir t_2. Jis gali būti nustatytas keliais būdais pagal tai, ar žuvys yra ženklinamos atskirai ar ne, arba pagal tai, ar reikia nustatyti rezervuarui vidutinį greitį.

$$r_1 = \left(\left(\frac{(\log_e W_2 - \log_e W_1)}{(t_2 - t_1)} \right) \times 100 \right)$$

$$r_2 = \left(\left(\frac{((\log_e W_2) - (\log_e W_1))}{(t_2 - t_1)} \right) \times 100 \right)$$

$$r_3 = \left(\left(\frac{((\log_e W_2) - (\log_e W_1))}{(t_2 - t_1)} \right) \times 100 \right)$$

čia:

r_1 = atskiros žuvies savitasis augimo greitis

r_2 = vidutinis savitasis augimo greitis rezervuarui

r_3 = „pseudo“ savitasis augimo greitis

w_1, w_2 = konkrečios žuvies masė, atitinkamai, laiku t_1 ir t_2

$\log_e w_1$ = atskiros žuvies masės tyrimo pradžioje logaritmas

$\log_e w_2$ = atskiros žuvies masės tyrimo pabaigoje logaritmas

$\log_e w_1$ = tyrimo pradžioje nustatytos rezervuaro žuvų masės w_1 logaritmų verčių vidurkis

$\log_e w_2$ = tyrimo pabaigoje nustatytos rezervuaro žuvų masės w_2 logaritmų verčių vidurkis

t_1, t_2 = tyrimo laikotarpio pradžios ir pabaigos laikas (paros).

r_1, r_2, r_3 gali būti apskaičiuoti 0–28 parų laikotarpiui ir, jei tinka (t. y. kai buvo matuojama 14-tą parą), 0–14 ir 14–28 parų laikotarpiams.

2.1.1. **Rezultatų analizė taikant regresiją (koncentracijos ir atsako santykio modeliavimas)**

Šis analizės metodas nustato atitinkamą savitojo augimo greičio ir koncentracijos matematiškai išreiškiamą santykį, taigi leidžia įvertinti EC_x, t. y. kiekvieną reikiamą EC vertę. Taikant šį metodą atskiros žuvies r vertės (r_1) apskaičiuoti nebūtina, vietoj to analizė gali būti pagrįsta vidutine r verte rezervuarui (r_2). Geriau taikyti pastarąjį metodą. Jis taip pat labiau tinka naudojant mažiausių žuvų rūšis.

Norint ištirti koncentracijos ir atsako santykį, vidutiniai savitieji augimo greičiai rezervuarui (r_2) turi būti grafiškai pažymimi kaip koncentracijos funkcija.

▼C1

Santykiui tarp r_2 ir koncentracijos išreikšti turi būti pasirinktas atitinkamas modelis ir jo pasirinkimas turi būti atitinkamai pagrįstas.

Jei kiekviename rezervuare likusių gyvų žuvų skaičius yra nevienodas, modelio pritaikymo procese, paprastame ar netiesiniame, reikėtų naudoti svorinius koeficientus siekiant atsižvelgti į nevienodą grupių dydį.

Modelio pritaikymo metodas turi leisti įvertinti, pvz., EC_{20} ir nustatyti jos sklaidą (standartinę paklaidą ar pasikliovimo intervalą). Pritaikyto modelio grafikas turėtų būti parodytas lyginant su duomenimis, kad būtų galima įvertinti pritaikyto modelio tinkamumą (8) (18) (19) (20).

2.1.2. **Rezultatų analizė LOEC įvertinti**

Jei atliekant bandymą rezervuarai lygiagrečiam bandymui yra visoms koncentracijos vertėms, LOEC įvertinimas gali būti grindžiamas vidutinio savitojo augimo greičio rezervuarui dispersine analize (ANOVA) (žr. 2.1 skirsnį), vėliau taikant tinkamą metodą (pvz., Dunnett ar Williams bandymą (12) (13) (14) (21), kuriuo kiekvienos koncentracijos vidutinė r vertė lyginama su kontrolinių bandinių vidutine r verte norint nustatyti mažiausią koncentraciją, kuriai šis skirtumas yra reikšmingas esant 0,05 tikimybės lygmeniui. Jei parametriniams metodams reikiamos hipotezės (nenormalus pasiskirstymas (pvz., *Shapiro–Wilk* bandymas) ar heterogeninė sklaida (*Bartlett* bandymas)) nepasitvirtina, reikėtų numatyti duomenų pertvarkymą sklaidoms homogenizuoti prieš atliekant dispersinę analizę ar atlikti svorinę dispersinę analizę.

Jei atliekant bandymą rezervuarai lygiagrečiam bandymui yra ne visoms koncentracijos vertėms, rezervuarais pagrįsta dispersinė analizė bus nejautri ar neįmanoma. Šiuo atveju priimtinas kompromisas yra dispersinei analizei panaudoti kiekvienos žuvies „pseudo“ savitąjį augimo greitį r_3.

Toliau vidutinė r_3 vertė kiekvienai koncentracijai gali būti lyginama su vidutine r_3 verte kontroliniams bandiniams. Tuomet LOEC gali būti nustatytas taip, kaip buvo daryta pirmiau. Būtina pripažinti, kad šis metodas neatsižvelgia į kintamumą tarp rezervuarų, išskyrus kintamumą tarp atskirų žuvų, ir šiuo požiūriu nesuteikia jokios apsaugos. Tačiau patirtis rodo (8), kad kintamumas tarp rezervuarų buvo labai mažas lyginant su kintamumu rezervuare (t. y. tarp žuvų). Jei analizė neapima kiekvienos žuvies duomenų, būtina numatyti išskirčių identifikavimo metodą ir pagrįsti jo taikymą.

2.2. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Rezultatai turi būti aiškinami atsargiai, jei išmatuotos bandomųjų tirpalų toksinių medžiagų koncentracijos vertės yra arti analizės metodo aptikimo ribos arba jei atliekant pusiau statinius bandymus bandomosios medžiagos tirpalo prieš atnaujinimą koncentracija yra mažesnė kaip šviežiai paruošto tirpalo koncentracija.

2.3. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

▼C1

2.3.1. **Bandomoji medžiaga:**

— fizikinė būsena ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės,

— cheminio identifikavimo duomenys, įskaitant grynumą, ir, jei tinka, analizės metodas bandomajai medžiagai kiekybiškai nustatyti.

2.3.2. **Bandomieji gyvūnai:**

— mokslinis pavadinimas (gali būti),

— veislė, dydis, tiekėjas, bet koks išankstinis apdorojimas ir t. t.

2.3.3. **Bandymo sąlygos:**

— taikytas bandymo metodas (pvz., pusiau statinis/su atnaujinimu, dinaminis, įkrova, žuvų tankis ir t. t.),

— bandymo schema (pvz., bandymo indų skaičius, bandomosios koncentracijos ir lygiagrečių bandinių skaičius, žuvų skaičius viename inde),

— pradinių tirpalų ruošimo metodas ir jų atnaujinimo dažnis (jei naudojama tirpinimo medžiaga, turi būti nurodyta jos koncentracija),

— vardinės bandomosios koncentracijos, bandymo indų nustatytų koncentracijų vidutinės vertės ir jų standartiniai nuokrypiai bei nustatymo metodas ir įrodymai, kad buvo daromi tikrųjų bandomosios medžiagos tirpalų matavimai,

— skiedimo vandens charakteristikos: pH, kietumas, šarmingumas, temperatūra, ištirpusio deguonies koncentracija, liekamojo chloro lygiai (jei matuoti), bendroji organinė anglis, suspenduotos kietosios dalelės, bandymo terpės sūrumas (jei matuota) ir visi kiti daryti matavimai,

— bandymo indų vandens kokybė: pH, kietumas, temperatūra ir ištirpusio deguonies koncentracija,

— išsami informacija apie šėrimą (pvz., davinio rūšis (-ys), šaltinis, duodamas kiekis ir šėrimo dažnumas).

2.3.4. **Rezultatai:**

— duomenys, kad kontroliniai bandiniai atitinka išgyvenimo patikimumo kriterijų, ir duomenys apie gaištamumą visose bandomosiose koncentracijose,

— taikytos statistinės analizės metodikos, statistika, pagrįsta lygiagrečiais bandymais ar žuvimis, duomenų apdorojimas ir naudotų metodikų pagrindimas,

— lentelėse pateikti 0, 14 (jei matuota) ir 28 paros atskirų žuvų ir vidutinės žuvų masės duomenys rezervuarui vidutinio augimo greičio ar „pseudo“ savitojo augimo greičio (jei tinka) vertės 0–28 parų laikotarpiu ar galbūt 0–14 ir 14–28 parų laikotarpiu,

— statistinės analizės (t. y. regresinės analizės ar dispersinės analizės) rezultatai, geriau lentelių ir grafikų pavidalu, LOEC ($p = 0,05$) bei NOEC ar ECx vertės, nurodant, kai įmanoma, atitinkamas standartines paklaidas,

▼C1

— visi pasitaikantys žuvų neįprasto elgesio atvejai ir visi matomi bandomosios medžiagos poveikiai.

3. NUORODOS

1) Solbe J.F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.

2) Ashley S., Mallett M.J. and Grandy N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

3) Crossland N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, PP 1855–1870.

4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. SAFEty, 21, p. 157–164.

5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

6) Holcombe, G.W., Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. and Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, p. 287–297.

7) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. and Spehar, R.L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka {*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3–91–063. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minesota.

8) Stephan C.E. and Rogers J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R C Bahner and D J Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, p. 328–338.

9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, p. 81.

10) Cox D.R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

11) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10–12 December 1991.

12) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc, 50, p. 1096–1121.

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

▼C1

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

15) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. Aquaculture 120, 123–133.

16) Quinton, J. C. and Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Fish Biology, 37, 33–41.

17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 P.

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

19) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. and McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA.

20) Norbert-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05–88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. p. 12.

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

▼C1

1 priedėlis

BANDYMAMS REKOMENDUOJAMOS ŽUVŲ RŪŠYS IR TINKAMOS BANDYMO SĄLYGOS

Rūšys	Rekomenduojamas bandymo temperatūros diapazonas (°C)	Apšvietimo trukmė (valandos)	Rekomenduojamas žuvų pradinės masės diapazonas (g)	Būtinas matavimo tikslumas	Įkrova (g/l)	Gyvūnų tankis (litrui)	Maistas	Bandymo trukmė (paros)
Rekomenduojamos rūšys:								
Oncorhynchus mykiss Vaivorykštinis upėtakis	12,5–16,0	12–16	1–5	100 mg tikslumu	1,2–2,0	4	Sausas firminis lašišinių mailių maistas	≥ 28
Kitos dokumentais tinkamai patvirtintos rūšys:								
Danio rerio Zebrinė danija	21–25	12–16	0,050–0,100	1 mg tikslumu	0,2–1,0	5–10	Gyvas maistas (*Brachionus Artemia*)	≥ 28
Oryzias latipes Japoninė medaka	21–25	12–16	0,050–0,100	1 mg tikslumu	0,2–1,0	5–20	Gyvas maistas (*Brachionus Artemia*)	≥ 28

▼C1

2 priedėlis

KAI KURIOS TINKAMO SKIEDIMO VANDENS CHEMINĖS CHARAKTERISTIKOS

Medžiaga	Koncentracija
Kietosios dalelės	< 20 mg/l
Bendroji organinė anglis	< 2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	< 1 μg/l
Liekamasis chloras	< 10 μg/l
Bendras fosforo organinių pesticidų kiekis	< 50 ng/l
Bendras chloro organinių pesticidų ir polichlorintų bifenilų kiekis	< 50 ng/l
Bendras organinis chloras	< 25 ng/l

▼C1

3 priedėlis

Toksiškumo bandymui tinkamų koncentracijų logaritminė eilutė (9)

Stulpelis (koncentracijų tarp 100 ir 10 ar tarp 10 ir 1 skaičius) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Stulpelyje galima pasirinkti penkių (ar daugiau) viena po kitos einančių koncentracijų eilutę. Stulpelio (x) koncentracijų vidurio taškai randami stulpelyje (2x + 1). Sąraše nurodytos vertės gali būti išreikštos procentine tūrio dalimi ar masės koncentracija (mg/l ar µg/l). Vertės gali būti padaugintos ar padalytos iš 10, pakelto bet kuriuo tinkamu laipsniu. 1 stulpelį galima būtų naudoti, jei toksiškumo lygio neapibrėžtis yra didelė.

▼C1

C.15. TRUMPALAIKIO TOKSIŠKUMO BANDYMAS ŽUVIMS EMBRIONO IR TRYNIO MAIŠELIO STADIJOSE

1. METODAS

Šis trumpalaikio toksiškumo bandymo metodas yra OECD TG 212 (1998) kopija.

1.1. ĮVADAS

Šis trumpalaikio toksiškumo žuvų embrionui ir mailiui su trynio maišeliu bandymas yra trumpalaikis bandymas, kai ką tik apvaisinti žuvų ikrai yra veikiami nuo jų apvaisinimo iki mailiaus su trynio maišeliu stadijos pabaigos. Toksiškumas embrionui ir mailiui su trynio maišeliu bandomas be maitinimo, bandymas turi būti baigtas, kai mailius dar maitinamas iš trynio maišelio.

Bandymo tikslas – nustatyti cheminių medžiagų letalius ir mažesniu laipsniu subletalius poveikius specifinėms vystymosi stadijoms ir bandytai rūšiai. Šis bandymas turėtų suteikti vertingos informacijos, nes jis galėtų: a) būti jungtimi tarp letalumo ir subletalumo bandymų; b) būti taikomas kaip atrankos bandymas numatant visą pradinio gyvenimo stadijų bandymą ar lėtinio toksiškumo bandymus; ir c) būti taikomas bandyti rūšis, kurių auginimo metodai nėra pakankamai pažangūs, kad aprėptų perėjimo iš endogeninio į egzogeninį maitinimo laikotarpį.

Žinotina, kad paprastai tik visas žuvies gyvenimo ciklo stadijas apimantys bandymai gali duoti tikslų lėtinio toksiškumo žuvims įvertį ir kad bent kiek sutrumpinus veikimą neįtraukiant kurios nors gyvenimo stadijos, gali sumažėti jautrumas, taigi gali būti nepakankamai įvertintas lėtinis toksiškumas. Todėl manoma, kad embriono ir mailiaus su trynio maišeliu bandymas turėtų būti ne toks jautrus kaip visas pradinio gyvenimo stadijų bandymas, ypač turint galvoje labai lipofiliškas chemines medžiagas (log P_{ow} > 4) ir specifinio toksinio veikimo chemines medžiagas. Tačiau mažesnių jautrumo skirtumų tarp dviejų bandymų reikėtų tikėtis nespecifinio narkotinio poveikio tipo cheminėms medžiagoms (1).

Dar prieš šio bandymo paskelbimą daugiausia patirties atliekant embriono ir mailiaus su trynio maišeliu bandymą buvo sukaupta su gėlavandene žuvimi *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae* – įprastas pavadinimas zebrinė danija). Taigi smulkesni nurodymai, kaip atlikti šios žuvų rūšies bandymą, pateikti 1 priedėlyje. Tačiau tai netrukdo naudoti kitas rūšis, kurias bandant yra sukaupta patirties (1 lentelė).

1.2. APIBRĖŽTYS

Mažiausia pastebimą poveikį sukelianti koncentracija (LOEC): mažiausia bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant medžiagos poveikis yra statistiškai reikšmingas lyginant su kontroliniais bandiniais (kai $p < 0,05$). Tačiau visų didesnių kaip LOEC bandomųjų koncentracijų kenksmingas poveikis turi būti lygus ar didesnis kaip LOEC poveikis.

Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC): bent kiek už LOEC mažesnė bandomoji koncentracija.

▼C1

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Embriono ir mailiaus su trynio maišeliu augimo stadijų žuvys veikiamos vandeniniais kelių koncentracijos verčių bandomosios medžiagos tirpalais. Bandymo protokolas leidžia pasirinkti pusiau statinį ar dinaminį bandymą. Pasirinkimas priklauso nuo bandomosios medžiagos prigimties. Bandymas pradedamas sudėjus apvaisintus ikrus į bandymo kameras ir baigiamas prieš pat tą momentą kai kurioje nors kameroje lervos trynio maišelis yra visiškai absorbuotas ar kai iš bado pradeda gaišti kontrolinių bandinių žuvys. Įvertinami letalūs ir subletalūs poveikiai ir lyginami su kontrolinėmis vertėmis mažiausiai stebimo poveikio koncentracijai, taigi ir nestebimo poveikio koncentracijai nustatyti. Kitaip poveikiai gali būti analizuojami taikant regresijos modelį norint nustatyti koncentraciją kuri sukeltų x % pokytį (t. y. LC/ECx, čia x yra tam tikras % išreikštas poveikis).

1.4. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

Reikėtų turėti ūmaus toksiškumo bandymo (žr. C.1 bandymo metodą), geriau atlikto su šiam bandymui pasirinkta rūšimi, rezultatus. Rezultatai gali būti naudingi ankstyvųjų gyvenimo tarpsnių bandymui pasirenkant atitinkamą bandomųjų koncentracijų intervalą. Turi būti žinomas medžiagos tirpumas vandenyje (įskaitant tirpumą bandymo vandenyje) ir bandomosios medžiagos garų slėgis. Turi būti patikimas metodas ištirpintai bandomajai medžiagai kiekybiškai nustatyti žinomu tikslumu ir aptikimo riba, kurie nurodomi ataskaitoje.

Informaciją apie bandomąją medžiagą kuri yra vertinga bandymo sąlygoms nustatyti, sudaro struktūrinė formulė, medžiagos grynumas, stabilumas veikiant šviesai ir bandymo sąlygomis, pKa, P_{ow} ir lengvo biologinio skaidumo bandymo rezultatai (žr. C.4 metodą).

1.5. BANDYMO TINKAMUMAS

Bandymas yra tinkamas, jei tenkinamos šios sąlygos:

— bendras apvaisintų ikrų išgyvenamumas kontroliniuose bandiniuose ir, jei tinka, induose vien tik su tirpikliu turi būti didesnis arba lygus ribinėms vertėms, apibrėžtoms 2 ir 3 priedėliuose,

— ištirpusio deguonies koncentracija visą bandymą turi sudaryti 60–100 % oro prisotinimo vertės (ASV),

— kiekvienu bandymo momentu temperatūros verčių bandymo kamerose ar skirtingomis bandymo dienomis skirtumas turi būti ne didesnis kaip ± 1,5 °C ir temperatūra turėtų būti palaikoma bandymo rūšims nurodytu intervalu (2 ir 3 priedėliai).

▼C1

1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Bandymo kameros**

Galima naudoti bet kokius stiklinius ar chemiškai inertiškos medžiagos indus. Indų matmenys turi būti gana dideli, kad atitiktų įkrovos sąlygas (žr. 1.7.1.2 skirsnį). Bandymo indus bandymo plote rekomenduojama išdėstyti atsitiktinai. Jei laboratorijoje yra sistemingi poveikiai, kuriuos būtų galima kontroliuoti suskirstant į blokus, indus geriau išdėstyti nevisiškai atsitiktinai, bet pagal randomizuotą blokinę schemą kiekviename bloke darant kiekvieną apdorojimą. Jei taikoma blokinė schema, į tai būtina atsižvelgti vėliau analizuojant duomenis. Bandymo kameros turi būti apsaugotos nuo nepageidautinų trikdžių.

1.6.2. **Žuvų rūšių parinkimas**

Rekomenduotos žuvų rūšys nurodytos 1A lentelėje. Tai netrukdo naudoti kitą rūšį (pavyzdžiai pateikti 1B lentelėje), bet, norint sudaryti tinkamas bandymo sąlygas, gali tekti pritaikyti bandymo metodiką. Šiuo atveju ataskaitoje turi būti pagrįstas rūšies parinkimo motyvas ir tyrimo metodas.

1.6.3. **Veislinių žuvų laikymas**

Detalių apie veislinių žuvų laikymą tinkamomis sąlygomis galima rasti OECD TG 210 ([1]) ir nuorodose (2) (3) (4) (5) (6).

1.6.4. **Embrionų ir lervų apdorojimas**

Embrionai ir lervos gali būti veikiami mažesniuose pagrindinį indą dalijančiuose induose, jų šonines ar galines sieneles pakeičiant tinklu, kad tirpalas galėtų tekėti per indą. Galima padaryti taip, kad per mažus indus tekėtų neturbulentinis srautas, tik reikia pakabinti juos ant svirties, kuri indus keltų ir nuleistų, bet visą laiką organizmai turi būti panardinti; taip pat galima naudoti sifoninę tekėjimo sistemą. Apvaisinti lašišinių žuvų ikrai gali būti laikomi dėžėse ar tinkluose su pakankamai didelėmis akutėmis, kad išsiritusios lervos galėtų pro jas iškristi. Lervoms pernešti atliekant pusiau statinius bandymus su visišku kasdieniu atnaujinimu tinka Pastero pipetės (žr. 1.6.6 skirsnį).

Jei ikrų talpyklos, grotelės ar tinkleliai buvo naudojami ikrams pagrindiniame inde laikyti, šitos apribojimo priemonės turėtų būti pašalintos išsiritus lervoms, tačiau reikia palikti tinklelius, kurie neleistų ištrūkti žuvims. Jei lervas reikia pernešti, jų neturi veikti oras, o žuvims iš ikrų talpyklų pernešti neturi būti naudojami tinklai (tokia atsargumo priemonė gal ir nebūtina kai kurioms ne tokioms gležnoms rūšims, pvz., karpiui). Šio pernešimo laikas įvairioms rūšims skirtingas ir pernešti nėra visuomet būtina. Taikant pusiau statinį metodą galima naudoti chemines stiklines ar negilias talpyklas ir, jei būtina, turinčias tinklo ekraną truputį pakeltą virš stiklinės dugno. Jei šių talpyklų tūris yra pakankamas, kad atitiktų įkrovos reikalavimus (žr. 1.7.1.2 skirsnį), embrionų ar lervų pernešti nebūtina.

([1]) OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, Fish, Early-life Stage Toxicity Test

▼C1

1.6.5. **Vanduo**

Bandymams galima naudoti bet kokį vandenį, kuris atitinka priimtino praskiedimo vandens chemines charakteristikas, nurodytas 4 priedėlyje, ir kuriame bandymo rūšis rodo kontrolinį išgyvenamumą bent tokį, koks aprašytas 2 ir 3 priedėliuose. Vandens kokybė turėtų būti vienoda visą bandymo laiką. pH reikšmė neturėtų kisti daugiau kaip ± 0,5 pH vieneto. Norint garantuoti, kad skiedimo vanduo per daug neturėtų įtakos bandymo rezultatui (pvz., nesudarytų kompleksinių junginių su bandomąja medžiaga) ar nedarytų neigiamo poveikio neršiančių žuvų elgesiui, vandens bandiniai turi būti kartkarčiais analizuojami. Sunkiųjų metalų jonų (pvz., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ir Ni), pagrindinių anijonų ir katijonų (pvz., Ca, Mg, Na, K, Cl ir SO_4), pesticidų (pvz., bendro fosforo organinių ir chloro organinių pesticidų kiekio), bendrosios organinės anglies ir suspenduotų kietųjų dalelių analizė turi būti atliekama, pavyzdžiui, kas tris mėnesius, jei žinoma, kad skiedimo vandens kokybė yra gana pastovi. Jei būtų parodyta, kad vandens kokybė yra pastovi bent metus, analizė gali būti atliekama ne taip dažnai, o intervalai padidinti (pvz., kas šešis mėnesius).

1.6.6. **Bandomieji tirpalai**

Pasirinktos koncentracijos bandomieji tirpalai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą.

Pradinį tirpalą geriau ruošti bandomąją medžiagą tiesiog maišant ar purtant skiedimo vandenyje mechaninėmis priemonėmis (pvz., maišykle ar ultragarsu). Pakankamai koncentruotam pradiniam tirpalui ruošti galima naudoti prisotinimo kolonėles (tirpumo kolonėles). Kiek įmanoma, reikia vengti naudoti tirpiklius ar dispergatorius (tirpinimo medžiagas); tačiau kartais, norint gauti tinkamos koncentracijos pradinį tirpalą tokias medžiagas gali tekti naudoti. Tinkami tirpikliai yra acetonas, etanolis, metanolis, dimetilsulfoksidas, dimetilformamidas ir trietilenglikolis. Tinkami dispergatoriai yra *Cremophor* RH40, Tween 80, 0,01 % metilceliuliozė ir HCO-40. Reikėtų atsargiai naudoti lengvai biologiškai irstančias medžiagas (pvz., acetoną) ir (ar) labai lakius junginius, nes, atliekant dinaminius bandymus, jie gali kelti problemų dėl bakterijų kaupimosi. Naudojama tirpinimo medžiaga neturi daryti reikšmingo poveikio išgyvenamumui ir neigiamo poveikio ankstyvosioms stadijoms, kaip kad nustatoma atliekant kontrolinį bandymą vien tik su tirpikliu. Tačiau reikia kiek įmanoma stengtis tokių medžiagų nenaudoti.

Pusiau statiniam metodui galima taikyti dvi atnaujinimo metodikas: 1) nauji bandomosios medžiagos tirpalai paruošiami švariuose induose ir gyvi likę ikrai bei lervos mažuose seno tirpalo tūriuose švelniai pernešami į naujus indus vengiant sąlyčio su oru; ar 2) bandomieji organizmai paliekami senuose induose, tačiau pakeičiama dalis (bent trys ketvirčiai) jų vandens. Terpės atnaujinimo dažnis priklausys nuo bandomosios medžiagos stabilumo, tačiau vandenį atnaujinti rekomenduojama kasdien. Jei pradiniai stabilumo bandymai (žr. 1.4 skirsnį) rodo, kad bandomosios medžiagos koncentracija laikotarpiu tarp atnaujinimų yra nestabili (t. y. yra už 80–120 % vardinės koncentracijos ribų ar yra mažesnė kaip 80 % išmatuotos pradinės koncentracijos), reikėtų numatyti dinaminio bandymo taikymą. Bet kuriuo atveju reikėtų pasirūpinti, kad atnaujinant vandenį lervos nepatirtų įtampos.

▼C1

Bandomosios koncentracijos tirpalams į bandymo kameras tiekti atliekant dinaminius bandymus reikalinga sistema, kuri nepertraukiamai dozuotų ir skiestų bandomosios medžiagos pradinį tirpalą (pvz., dozavimo siurblys, proporcingasis skiestuvas, prisotinimo sistema). Pradinių tirpalų ir skiedimo vandens srautai turi būti kartais, geriau kasdien, tikrinami ir visą bandymą turi nekisti daugiau kaip 10 %. Tinkamas pasirodė esąs srautas, atitinkantis bent penkis bandymo kameros tūrius per 24 h (2).

1.7. BANDYMO PROCEDŪRA

Vertingos informacijos, kaip atlikti žuvų embriono ir mailiaus su trynio maišeliu toksiškumo bandymus, yra literatūroje, kurios keli pavyzdžiai įtraukti į šio teksto nuorodų dalį (7) (8) (9).

1.7.1. **Veikimo sąlygos**

1.7.1.1. *Trukmė*

Bandymą geriau pradėti per 30 min. nuo ikrų apvaisinimo. Embrionai į bandomąjį tirpalą dedami prieš prasidedant blastodisko segmentacijos stadijai ar kuo greičiau jai prasidėjus, bet būtinai prieš gastrulės stadijos pradžią. Jei ikrus tiekia prekybininkas, pradėti bandymą iš karto po apvaisinimo gali būti neįmanoma. Kadangi bandymo pradžios vėlavimas gali labai paveikti bandymo jautrumą bandymas turėtų būti pradėtas per aštuonias valandas po apvaisinimo. Dėl tos priežasties, kad lervos veikimo laikotarpiu nemaitinamos, bandymas turėtų būti baigtas prieš pat tą momentą kai kurioje nors bandymo kameroje kurios nors lervos trynio maišelis bus visiškai absorbuotas ar kai iš bado pradės gaišti kontrolinių bandinių gyvūnai. Trukmė priklauso nuo naudotos rūšies. Kai kurios rekomenduojamos trukmės yra nurodytos 2 ir 3 priedėliuose.

1.7.1.2. *Įkrova*

Bandymo pradžioje turimų apvaisintų ikrų skaičiaus turi pakakti statistikos reikalavimams įvykdyti. Ikrai tarp veikimo koncentracijų turi būti paskirstyti atsitiktinai ir kiekvienai koncentracijai turi būti naudojama bent 30 apvaisintų ikrų, vienodai (ar kuo vienodžiau, nes kai kurias rūšis gali būti sunku gauti vienodas įkrovas) paskirstytų bent trims tos pačios koncentracijos bandymo kameroms. Įkrova (biomasė bandomojo tirpalo tūrio vienetui) turi būti pakankamai maža, kad be aeracijos ištirpusio deguonies koncentraciją būtų galima palaikyti bent 60 % oro prisotinimo koncentracijos. Dinaminiams bandymams yra rekomenduota ne didesnė kaip 0,5 g/l per 24 h ir bet kuriuo momentu ne didesnė kaip 5 g/l tirpalo (2).

1.7.1.3. *Šviesa ir temperatūra*

Apšvietimo laikotarpis ir vandens temperatūra turi atitikti žuvų rūšį (2 ir 3 priedėliai). Temperatūrai nuolatos kontroliuoti gali būti patogu turėti papildomą bandymo indą.

▼C1

1.7.2. **Bandomosios medžiagos koncentracijos**

Paprastai reikia naudoti penkias bandomosios medžiagos koncentracijas, besiskiriančias pastoviu santykiu, geriausiai ne didesniu kaip 3,2. Renkantis koncentracijos verčių intervalą turi būti išnagrinėta ūmaus toksiškumo tyrimų kreivė, siejanti LC_{50} ir veikimo trukmę. Tam tikromis aplinkybėmis gali pasiteisinti mažiau kaip penkių koncentracijos verčių naudojimas, pvz., atliekant ribinės koncentracijos vertės nustatymo bandymus, ar siauresnio koncentracijos verčių intervalo naudojimas. Mažiau kaip penkių koncentracijos verčių naudojimas turi būti pagrįstas. Medžiagos koncentracijos verčių, didesnių kaip 96 h LC_{50} ar 100 mg/l, žiūrint, kuri mažesnė, bandyti nebūtina. Neturėtų būti atliekami bandymai su koncentracijos vertėmis, didesnėmis kaip medžiagos tirpumo ribinė koncentracija.

Jei pradinio tirpalo ruošimui lengvinti naudojama tirpinimo medžiaga (žr. 1.6.6 skirsnį), jos galutinė koncentracija turi būti ne didesnė kaip 0,1 ml/l ir geriau, kai ji visuose bandymo induose būtų vienoda.

1.7.3. **Kontroliniai bandiniai**

Be bandomosios serijos, turi būti vienas skiedimo vandens kontrolinis bandinys (su lygiagrečiais bandiniais, kai reikia) ir, jei tinka, vienas kontrolinis bandinys su tirpinimo medžiaga (su lygiagrečiais bandiniais, kai reikia).

1.7.4. **Kiekybinių analizių ir matavimų dažnis**

Atliekant bandymą bandomosios medžiagos koncentracijų vertės nustatomos reguliariais tarpais.

Jei manoma, kad atliekant pusiau statinius bandymus bandomosios medžiagos koncentracija lieka vardinės koncentracijos ± 20 % vertės (t. y. 80–120 % intervalo; žr. 1.4 ir 1.6.6 skirsnius), rekomenduojama mažiausiai tris kartus lygiais bandymo laiko tarpais nustatyti bent didžiausią ir mažiausią bandomąją koncentraciją iš karto po tirpalo paruošimo ir prieš pat jo atnaujinimą (t. y. tą patį tirpalą reikia analizuoti imant šviežio tirpalo bandinius ir prieš pat jo atnaujinimą).

Jei tai bandymai, kuriuos atliekant nesitikima, kad koncentracija liks lygi vardinei vertei ± 20 % (pagal medžiagos stabilumo duomenis), turi būti nustatomos visos šviežiai paruoštų tirpalų ir tirpalų prieš atnaujinimą koncentracijos vertės laikantis to paties analizės režimo (t. y. bent tris kartus lygiais bandymo laiko tarpais). Bandomosios medžiagos koncentraciją prieš atnaujinimą reikia nustatyti tik viename tos pačios koncentracijos inde. Tarp nustatymų turi būti ne ilgesnis kaip septynių parų tarpas. Rekomenduojama rezultatus pagrįsti išmatuotomis koncentracijos vertėmis. Tačiau jei yra įrodymų, leidžiančių parodyti, kad bandomosios medžiagos koncentracija visą bandymo laiką buvo tinkamai palaikoma ± 20 % vardinės koncentracijos vertės ar išmatuotos pradinės koncentracijos vertės, rezultatai gali būti grindžiami vardine ar išmatuota vertėmis.

Atliekant dinaminius bandymus tinka bandinių ėmimo režimas, panašus į aprašytąjį pusiau statiniams bandymams (bet senų tirpalų koncentracijos matavimas šiuo atveju netinka). Tačiau jei šis bandymas trunka ilgiau kaip septynias paras, būtų pageidautina pirmą savaitę padidinti bandinių ėmimo dažnį (pvz., trys matavimų serijos) norint įsitikinti, kad bandomosios koncentracijos vertės nesikeičia.

▼C1

Bandinius gali tekti filtruoti (pvz., per filtrą, kurio akių dydis 0,45 μm) ar centrifuguoti. Tačiau, kadangi nei centrifugavimu, nei filtravimu ne visuomet galima atskirti biologiškai neprieinamą bandomosios medžiagos dalį nuo biologiškai prieinamos dalies, bandinių apdorojimas šiais būdais gali būti netaikomas.

Atliekant bandymą visuose bandymo induose turi būti matuojama ištirpusio deguonies koncentracija, pH ir temperatūra. Turi būti matuojamas kontrolinių bandinių ir vieno indo su didžiausios koncentracijos bandiniu bendras kietumas ir sūrumas (jei tinka). Mažiausiai ištirpusio deguonies koncentracija ir sūrumas (jei tinka) turi būti matuojami tris kartus (bandymo pradžioje, viduryje ir pabaigoje). Atliekant pusiau statinius bandymus ištirpusio deguonies koncentraciją rekomenduojama matuoti dažniau, geriau prieš kiekvieną vandens atnaujinimą ir po jo ar bent kartą per savaitę. Atliekant pusiau statinius bandymus pH vertė turi būti matuojama prieš kiekvieną vandens atnaujinimą ir po jo, atliekant dinaminius bandymus – bent kartą per savaitę. Vandens kietumas kiekvienam bandymui matuojamas vieną kartą. Temperatūrą būtina matuoti kasdien, o bent viename inde būtų geriau ją kontroliuoti be perstojo visą laiką.

1.7.5. **Stebėjimai**

1.7.5.1. *Embrioninio vystymosi stadija*

Embrioninė stadija (t. y. gastrulės stadija) veikimo bandomąja medžiaga pradžioje turi būti kiek įmanoma tiksliau verifikuota. Tai galima padaryti naudojant tinkamai išlaikytų ir nuvalytų ikrų reprezentatyvų bandinį. Embrioninių stadijų aprašymo ir iliustravimo pavyzdžių galima rasti literatūroje (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2. *Išsiritimas ir išgyvenamumas*

Išsiritimo ir išgyvenamumo stebėjimai turi būti daromi bent kasdien, o gauti skaičiai registruojami. Gali būti pageidautina bandymo pradžioje stebėti dažniau (pvz., pirmąsias tris valandas kas 30 minučių), nes kartais išgyvenamumo laikas gali būti svarbesnis nei vien tik žūčių skaičius (pvz., ūmaus toksiškumo atveju). Negyvi embrionai ir lervos turi būti pašalinti iš karto, kai tik bus pastebėti, nes jie greitai suyra. Šalinti reikėtų labai atsargiai, kad nebūtų užgauti ar fiziškai sužaloti šalia esantys ikrai/lervos, kadangi jie yra labai gležni ir jautrūs. Žūties kriterijai kinta pagal gyvenimo stadiją:

— *ikrams*: ypač ankstyvosiomis stadijomis, pastebimas permatomumo sumažėjimas ir spalvos pokytis dėl baltymo koaguliacijos ir (ar) nusėdimo, dėl to atsiranda baltas matinis atspalvis,

— *embrionams*: kūno judėjimo ir (ar) širdies plakimo nebuvimas ir (ar) matinio atspalvio atsiradimas rūšims, kurių embrionai yra normaliai permatomi,

— *lervoms*: nejudamumas ir (ar) kvėpavimo judėjimo, ir (ar) širdies plakimo nebuvimas, ir (ar) balta matinė centrinės nervų sistemos spalva ir (ar) reakcijos į mechaninius dirgiklius nebuvimas.

▼C1

1.7.5.3. *Nenormali išvaizda*

Kūno ir (ar) pigmentacijos anomalijų turinčių lervų skaičius ir trynio maišelio absorbcijos stadija turi būti registruojami atitinkamais laiko tarpais atsižvelgiant į bandymo trukmę ir į aprašytos anomalijos prigimtį. Pastebėtina, kad nenormalūs embrionai ir lervos pasitaiko natūraliai ir kai kurių rūšių gali sudaryti kelis kontrolinio (-ių) bandinio (-ių) procentus. Iš bandymo indų turi būti pašalinami tik nugaišę nenormalūs gyvūnai.

1.7.5.4. *Nenormalus elgesys*

Anomalijos, pvz., hiperventiliacija, nekoordinuotas plaukimas ir netipiškas nejudamumas, turi būti registruojamos atitinkamais laiko tarpais atsižvelgiant į bandymo trukmę. Šie pastebėti poveikiai, nors juos sunku įvertinti kiekybiškai, gali padėti aiškinti gaištamumo duomenis, t. y. suteikti informacijos apie medžiagos toksinio veikimo būdą.

1.7.5.5. *Ilgis*

Baigiant bandymą rekomenduojama išmatuoti atskirų gyvūnų ilgį; galima matuoti standartinį, ilgį iki uodegos peleko išsišakojimo ar bendrą ilgį. Tačiau jei supuvo uodegos pelekas ar yra išėstas, turi būti imamas standartinis ilgis. Paprastai, jei bandymas atliekamas teisingai, ilgio variacijos koeficientas lygiagretiems kontroliniams bandiniams turi būti ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Masė*

Baigiant bandymą galima išmatuoti atskirų gyvūnų masę; geriau nustatyti sausų gyvūnų masę (po 24 h esant 60 °C temperatūrai), o ne gyvų (sausai nušluostytų filtro popieriumi). Paprastai jei bandymas atliekamas teisingai, masės variacijos koeficientas lygiagretiems kontroliniams bandiniams turi būti ≤ 20 %.

Darant stebėjimus bus gauta dalis nurodytų duomenų ar visi duomenys, kuriems atliekama statistinė analizė:

— bendras gaištamumas,

— sveikų lervų skaičius bandymo pabaigoje,

— išsiritimo pradžia ir jo pabaiga (t. y. 90 % išsiritusių ikrų kiekviename vienodos koncentracijos inde),

— kiekvieną parą išsiritančių lervų skaičius,

— iki bandymo pabaigos išgyvenusių gyvūnų ilgis (ir masė),

— deformuotų ar nenormalios išvaizdos lervų skaičius,

— nenormalaus elgesio lervų skaičius.

▼C1

2. **DUOMENYS IR ATASKAITA**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Rekomenduojama, kad rengiant bandymo schemą ir bandymą analizuojant dalyvautų statistikas, nes šis bandymo metodas leidžia smarkiai keisti eksperimento planą pvz., bandymo kamerų skaičių, bandomųjų koncentracijų skaičių, pradinį apvaisintų ikrų skaičių, matuojamų parametrų skaičių. Atsižvelgiant į bandymo schemos variantų įvairovę, jokių specialių nurodymų dėl statistinės metodikos čia nepateikiama.

Jei reikia įvertinti LOEC ar NOEC vertes, būtina analizuoti kiekvieno vienodos koncentracijos rinkinio duomenų sklaidą taikant dispersinę analizę (ANOVA) ar faktorinės analizės lenteles. Norint daryti atskiros koncentracijos ir kontrolinių bandinių gautų rezultatų visuotinį lyginimą, gali būti naudingas Dunnetto metodas (12) (13). Yra ir kitų naudingų metodų pavyzdžių (14) (15). Taikant dispersinę analizę ar kitas metodikas, aptinkamo poveikio dydis (t. y. kriterijaus galia) turi būti apskaičiuotas ir pateiktas ataskaitoje. Žinotina, kad ne visus 1.7.5.6 skirsnyje išvardytus stebėjimus galima statistiškai apdoroti taikant dispersinę analizę. Pvz., bendras gaištamumas ir gyvų lervų skaičius bandymo pabaigoje galėtų būti analizuojami taikant probito modelio metodus.

Jei reikia įvertinti LC ar EC_X vertes, tyrimo rezultatams taikant statistinį metodą, pvz., mažiausių kvadratų ar netiesinių mažiausių kvadratų metodą, turi būti pritaikyta tinkama (-os) kreivė (-ės), pvz., logistinė kreivė. Kreivė (-ės) turi būti parametrizuota (-os) taip, kad nustatomos LC ar EC_X vertės ir jų standartinė paklaida galėtų būti įvertintos tiesiogiai. Tai labai palengvina LC ar EC_X pasikliovimo ribų apskaičiavimą. Jei nėra svarbių priežasčių pirmenybę teikti kitiems pasikliovimo lygmenims, turi būti nurodomas dvipusis 95 % pasikliovimo intervalas. Pageidautina, kad pritaikymo metodikoje būtų numatytos priemonės atitikimo stokos reikšmingumui įvertinti. Galima taikyti grafinius kreivių pritaikymo metodus. Regresinė analizė tinka visiems 1.7.5.6 skirsnyje išvardytiems stebėjimams.

2.2. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Rezultatai turi būti aiškinami atsargiai, jei matuojamos bandomųjų tirpalų toksinių medžiagų koncentracijos vertės yra arti analizės metodo aptikimo ribos. Taip pat labai atsargiai reikėtų aiškinti rezultatus, gautus koncentracijos vertėms, didesnėms kaip medžiagos tirpumo vandenyje vertės.

2.3. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

2.3.1. **Bandomoji medžiaga:**

— fizikinė būsena ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės,

— cheminio identifikavimo duomenys, įskaitant grynumą, ir, jei tinka, analizės metodas bandomajai medžiagai kiekybiškai nustatyti.

▼C1

2.3.2. **Bandomieji gyvūnai:**

— mokslinis pavadinimas, veislė, motininių žuvų skaičius (t. y. kiek moteriškos lyties žuvų buvo naudojama bandymui reikalingų ikrų skaičiui gauti), apvaisintų ikrų surinkimo šaltinis ir metodas ir vėlesnis apdorojimas.

2.3.3. **Bandymo sąlygos:**

— taikytas bandymo metodas (pvz., pusiau statinis ar dinaminis, laikas nuo apvaisinimo iki bandymo pradžios, įkrova ir t. t.),

— apšvietimo laikotarpio (-ių) trukmė,

— bandymo schema (pvz., bandymo indų skaičius ir lygiagrečių bandinių skaičius, embrionų skaičius vienam lygiagrečiam bandiniui),

— pradinių tirpalų ruošimo metodas ir jų atnaujinimo dažnis (jei naudojama tirpinimo medžiaga, turi būti nurodyta jos koncentracija),

— vardinės bandomosios koncentracijos, išmatuotos bandymo indų tirpalų koncentracijos vertės, jų vidutinės vertės, standartiniai nuokrypiai ir nustatymo metodas; jei bandomoji medžiaga tirpsta esant mažesnei koncentracijai nei išmatuotos koncentracijos, įrodymai, kad buvo matuojama ištirpintos bandomosios medžiagos koncentracija tirpale,

— skiedimo vandens charakteristikos: pH, kietumas, šarmingumas, temperatūra, ištirpusio deguonies koncentracija, liekamojo chloro lygiai (jei matuoti), bendroji organinė anglis, suspenduotos kietosios dalelės, bandymo terpės sūrumas (jei matuotas) ir visi kiti daryti matavimai,

— bandymo indų vandens kokybė: pH, kietumas, temperatūra ir ištirpusio deguonies koncentracija.

2.3.4. **Rezultatai:**

— visų parengiamųjų bandomosios medžiagos stabilumo tyrimų rezultatai,

— įrodymai, kad kontroliniai bandiniai atitinka bendro bandomosios rūšies išgyvenamumo priimtinumo standartą (2 ir 3 priedėliai),

— embriono ir lervos stadijos žuvų gaištamumo/išgyvenamumo ir bendro gaištamumo/išgyvenamumo duomenys,

— ikrų inkubavimo parų skaičius ir išsiritusių lervų skaičius,

— ilgio (ir masės) duomenys,

— morfologinių anomalijų, jei yra, dažnis ir aprašymas,

— poveikio elgesiui, jei yra, dažnumas ir aprašymas,

— duomenų statistinė analizė ir apdorojimas,

— jei bandymo duomenims buvo taikoma dispersinė analizė, kiekvieno įvertinto atsako mažiausia pastebimą poveikį sukelianti koncentracija (LOEC), kai p = 0,05, ir nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC), įskaitant taikytų statistinių metodikų aprašymą ir nuorodą, kokio dydžio poveikis gali būti aptiktas,

▼C1

— jei bandymo duomenims buvo taikomas regresinės analizės metodas, LC ir EC_X, jų pasikliovimo intervalai ir šioms vertėms apskaičiuoti naudoto pritaikyto modelio grafikas,

— visų nukrypimų nuo bandymo metodo paaiškinimai.

3. **NUORODOS**

1) Kristensen P. (1990) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, pp 60. June 1990.

2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241–88. 26 pp.

3) Brauhn J.L. and Schoettger R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3–75–011, Duluth, Minnesota.

4) Brungs W.A. and Jones B.R. (1977) Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3–77–061, Duluth, Minnesota.

5) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, 121–173.

6) Legault R. (1958) A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp 328–330.

7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp 61–71.

8) Birge J.W., Black J.A. and Westerman A.G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp 807–821.

9) Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquatic Toxicology, 9, 129–145.

10) Kirchen R.V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1–4. Carolina Biological Supply Company.

11) Kirchen R.V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.

12) Dunnett C.W. (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp 1096–1121.

13) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482–491.

14) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼C1

15) Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp 321–334.

16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS l/RM/28, December 1992, pp 81.

17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, 126–134.

18) Meyer A., Bierman C.H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology – an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: 231–236.

19) Ghillebaert F., Chaillou C, Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental SAFEty 32, 19–28.

20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3–91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3–91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

22) De Graeve G.M., Cooney J.D., McIntyre DO., Poccocic T.L., Reichenbach N.G., Dean J.H. and Marcus M.D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow {}{*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, 1189–1203.

23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

24) Balon E.K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.

25) Blaxter J.H.S. (1988). Pattern and variety in development, In: W.S. Hoar and D.J. Randall Eds., Fish Physiology, vol. XIA, Academic press, pp 1–58.

1 A lentelė

BANDYMUI REKOMENDUOJAMOS ŽUVŲ RŪŠYS

GĖLAVANDENĖS
Oncorhynchus mykiss Vaivorykštinis upėtakis (9)(16)
Danio rerio Zebrinė danija (7)(17)(18)
Cyprinus caprio Paprastasis karpis (8)(19)
Oryzias latipes Japoninė medaka (20)(21)
Pimephales promelas Juodoji drūtgalvė rainė (8)(22)

▼C1

1 B lentelė

Kitų dokumentais tinkamai patvirtintų naudotų rūšių pavyzdžiai

GĖLAVANDENĖS	SŪRIAVANDENĖS (JŪRŲ)
Carassius auratus Sidabrinis karosas (8)	*Menidia peninsulae* Menidija (23)(24)(25)
Lepomis macrochirus Melsvažiaunis saulešeris (8)	*Clupea harengus* Atlantinė silkė (24)(25)
	Gadus morhua Atlantinė menkė (24)(25)
	Cyprinodon variegatus Lėlžuvė (23)(24)(25)

▼C1

1 priedėlis

TOKSIŠKUMO ZEBRINĖS DANIJOS (BRACHYDANIO RERIO) EMBRIONUI IR MAILIUI SU TRYNIO MAIŠELIU BANDYMO REKOMENDACIJOS

ĮVADAS

Zebrinė danija yra Indijos *Coromandel* pakrančių žuvis, gyvenanti srauniose upėse. Tai yra paplitusi karpių šeimos akvariumų žuvis, informacijos apie jos priežiūros ir auginimo būdus galima rasti standartiniuose žinynuose apie tropikų žuvis. Žuvies biologija ir naudojimas žuvininkystės tyrimams buvo apžvelgti Laale (1).

Žuvis retai yra ilgesnė kaip 45 mm. Jos cilindro formos kūnas turi 7–9 tamsiai mėlynas horizontalias sidabriškas juostas. Šios juostos eina iki uodegos ir analinių pelekų. Nugara gelsvai žalsva. Patinai yra plonesni už pateles. Patelės yra labiau sidabriškos ir su labiau išpūstu pilvu, ypač prieš nerštą.

Suaugusios žuvys gali pakęsti didelius temperatūros, pH ir kietumo svyravimus. Tačiau norint gauti sveikas žuvis, kurios nerštų geros kokybės ikrus, reikia sudaryti optimalias sąlygas.

Neršto metu patinas persekioja patelę ir bado ją galva, ir kai tik ikrai yra išneršiami, jie iškart apvaisinami. Ikrai, būdami permatomi ir nelipnūs, krenta į dugną, kur juos gali suryti tėvai. Nerštui įtakos turi apšvietimas. Jei rytą šviesos pakanka, žuvis paprastai neršia anksti, kai tik išaušta.

Patelė gali neršti kelių šimtų ikrų partijomis kas savaitę.

MOTININIŲ ŽUVŲ BŪSENA. REPRODUKCIJA IR ANKSTYVOSIOS GYVENIMO STADIJOS

Parinkite atitinkamą skaičių sveikų žuvų ir prieš numatytą neršto laiką bent dvi savaites laikykite tinkamame vandenyje (pvz., 4 priedėlis). Žuvų grupei turi būti leista bent kartą neršti prieš ruošiant bandymui skirtų ikrų partiją. Žuvų tankis šiuo laikotarpiu turi būti ne didesnis kaip 1 gramas žuvų litrui vandens. Tankis gali būti didesnis, jei vanduo keičiamas reguliariai ar naudojamos valymo sistemos. Temperatūra rezervuaruose turi būti 25 ± 2 °C. Žuvys turėtų būti šeriamos įvairiu maistu, kurį gali sudaryti, pvz., atitinkamas parduodamas sausas maistas, gyvos ką tik išsiritusios artemijos, chironomidės, dafnijos, baltosios kirmėlės (*Enchytraeids*).

Toliau bendrais bruožais išdėstytos dvi metodikos, kurias taikant bandymui galima gauti pakankamą skaičių sveikų apvaisintų ikrų:

i) Į 50 l skiedimo vandens pripildytą akvariumą, apsaugotą nuo tiesioginės šviesos, įleidžiama aštuonios patelės ir 16 patinų, kurie kiek įmanoma netrikdomi bent 48 valandas. Dienos prieš bandymo pradžią vidurdienį akvariumo dugne padedamas padėklas nerštui. Padėklą nerštui sudaro 5–7 cm aukščio rėmas (iš organinio stiklo ar kitos tinkamos medžiagos), jo viršuje tvirtinamas stambių 2–5 mm akučių tinklas, apačioje – smulkių 10–30 μm akučių tinklas. Prie rėmo stambaus tinklo pritvirtinami keli „medžiai“ nerštui, padaryti iš nesusuktos nailono virvutės. Žuvims 12 valandų pabuvus tamsoje, nerštui pradėti įjungiama silpna šviesa. Po neršto praėjus 2–4 valandoms, padėklas išimamas ir surenkami ikrai. Padėklas nerštui neleidžia žuvims suryti ikrų, be to, palengvina jų surinkimą. Žuvų grupei turi būti leista bent kartą neršti prieš ruošiant bandymui skirtų ikrų partiją.

▼C1

ii) Nuo penkių iki dešimties patinų ir patelių bent dvi savaites prieš numatytą nerštą laikomi atskirai. Po 5–10 parų patelių pilvai bus išsipūtę ir matyti jų genitaliniai speneliai. Patinai spenelių neturi. Neršiama nerštui skirtuose rezervuaruose, turinčiuose netikrą tinklinį dugną (kaip pirmiau). Rezervuaras pripildomas skiedimo vandens taip, kad vandens virš tinklo būtų 5–10 cm. Parą prieš numatytą nerštą į rezervuarą įleidžiama viena patelė ir du patinai. Vandens temperatūra palaipsniui didinama, kol pasiekiama vienu laipsniu didesnė negu aklimatizacijos temperatūra. Šviesa išjungiama ir stengiamasi kiek įmanoma netrikdyti rezervuare esančių žuvų. Rytą nerštui pradėti įjungiama silpna šviesa. Po 2–4 valandų žuvys išimamos ir surenkami ikrai. Jei ikrų reikia daugiau nei gali išneršti viena patelė, lygiagrečiai galima įrengti pakankamą skaičių rezervuarų. Jei prieš bandymą buvo registruota kiekvienos patelės reprodukcijos geba (partijos dydis ir kokybė), nerštui galima atrinkti geriausios reprodukcijos gebos pateles.

Ikrai turi būti pernešti į bandymo indus naudojant stiklinius vamzdelius (vidinis skersmuo ne mažesnis kaip 4 mm), turinčius lanksčias siurbimo kriaušes. Su ikrais pernešamo vandens turi būti kuo mažiau. Ikrai yra sunkesni už vandenį ir iškrenta iš vamzdelio. Reikia žiūrėti, kad ikrams (ir lervoms) nepatektų oro. Siekiant užtikrinti, kad pradinėse vystymosi stadijose nebūtų nukrypimų nuo normos, ikrų partijų ėminiai turi būti ištirti mikroskopu. Ikrų dezinfekuoti negalima.

Ikrų daugiausia žūva per pirmąsias 24 h po apvaisinimo. Šiuo laikotarpiu dažnai jų žūva 5–40 %. Ikrai išsigimsta dėl nesėkmingo apvaisinimo ar dėl nenormalaus vystymosi. Atrodo, kad ikrų partijos kokybė priklauso nuo patelių, nes kai kurios patelės visą laiką neršia geros kokybės ikrus, o kitoms tai niekuomet nepavyksta. Skiriasi ikrų partijų vystymosi greitis ir išsiritimo trukmė. Sėkmingai apvaisintų ikrų ir lervų su trynio maišeliu išliekamumas yra geras, paprastai didesnis kaip 90 %. Esant 25 °C temperatūrai lervos išsirita per 3–5 paras po apvaisinimo, o trynio maišelis absorbuojamas maždaug per 13 parų po apvaisinimo.

Embrioninį vystymąsi gerai aprašė Hisaoka ir Battle (2). Dėl ikrų ir išsiritusių lervų permatomumo žuvies vystymąsi galima sekti ir pastebėti išsigimimus. Praėjus maždaug keturioms valandoms po neršto neapvaisintus ikrus galima atskirti nuo apvaisintų (3). Šiam tyrimui ikrai ir lervos dedami į mažo tūrio bandymo indus ir tiriami mikroskopu.

Ankstyvosioms gyvenimo stadijoms taikomos bandymo sąlygos išvardytos 2 priedėlyje. Optimalios praskiedimo vandens pH ir kietumo vertės yra atitinkamai lygios 7,8 ir 250 mg $CaCO_3$/l.

APSKAIČIAVIMAI IR STATISTIKA

Siūlomas dviejų stadijų metodas. Iš pradžių statistiškai analizuojamas gaištamumas, nenormalaus vystymosi ir išsiritimo trukmės duomenys. Vėliau toms koncentracijoms, kurioms esant neigiamo poveikio šiems parametrams nebuvo aptikta, statistiškai įvertinamas kūno ilgis. Siūloma taikyti šį metodą, nes nuo toksiškos medžiagos gali selektyviai žūti kai kurios mažesnės žuvys, vėluoti išsiritimo laikas ir atsirasti akivaizdžių išsigimimų, taigi dėl to gali būti netikslūs ilgio matavimai. Be to, kiekvienam veikimui reikės išmatuoti maždaug tokį pat skaičių žuvų, ir taip bus garantuotas bandymo statistikos tinkamumas.

▼C1

LC_{50} IR EC_{50} NUSTATYMAS

Išgyvenusių ikrų ir lervų procentinė dalis darant pataisą dėl gaištamumo kontroliniuose bandiniuose apskaičiuojama pagal *Abbotto* formulę (4):

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

čia,

P = Pataisytas išgyvenamumas %

P' = bandomajai koncentracijai stebėta išgyvenamumo vertė %

C = kontroliniams bandiniams stebėta išgyvenamumo vertė %

Jei įmanoma, bandymo pabaigoje tinkamu metodu nustatoma LC_{50}.

Jei vertinant EC_{50} į statistiką norima įtraukti morfologines anomalijas, rekomendacijų galima rasti Stephan darbe (5).

LOEC IR NOEC ĮVERTINIMAS

Ikrų ir mailiaus su trynio maišeliu bandymo tikslas – nenulines koncentracijos vertes palyginti su kontroliniais bandiniais, t. y. nustatyti LOEC. Taigi turi būti taikomos visuotinio palyginimo (*multiple comparison*) metodikos (6) (7) (8) (9) (10).

NUORODOS

1) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, p. 121–173.

2) Hisaoka K.K. and Battle H.I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, p. 311.

3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabarbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, p. 173–181.

4) Finney D.J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, p. 1–333.

5) Stephan C.E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, p. 69–81.

6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, p. 1096–1121.

7) Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, p. 482–491.

8) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, p. 103–117.

9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, p. 519–531.

10) Sokal R.R. and Rohlf F.J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W.H. Freeman and Co., San Francisco.

▼C1

2 priedėlis

REKOMENDUOJAMŲ RŪŠIŲ BANDYMO SĄLYGOS, TRUKMĖ IR IŠGYVENAMUMO KRITERIJAI

Rūšis	Temp eratūra (°C)	Sūrumas (0/00)	Apšviet imo trukmė (valandos)	Stadijų trukmė (paros)		Tipiška bandymo trukmė	Išgyvenamumas kontroliniuose bandiniuose (ne mažesnis kaip %)	
				Embrion as	Mailius su trynio maišeliu		Išsiritimo sėkmė	Po išsiritimo
GĖLAVANDENĖS								
Brachydanio rerio Zebrinė danija	25 ± 1	—	12–16	3–5	8–10	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 5 parų po išsiritimo (8–10 parų)	80	90
Oncorhynchus mykiss Vaivorykštinis upėtakis	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (3)	30–35	25–30	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 20 parų po išsiritimo (50–55 paros)	66	70
Cyprinus carpio Paprastasis karpis	21–25	—	12–16	5	> 4	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 4 parų po išsiritimo (8–9 paros)	80	75
Oryzias latipes Japoninė medaka	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12–16	8–11	4–8	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 5 parų po išsiritimo (13–16 parų)	80	80
Pimephales promelas Juodoji drūtagalvė rainė	25 ± 2	—	16	4–5	5	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 4 parų po išsiritimo (8–9 paros)	60	70

(1) Embrionams
(2) Lervoms
(3) Embrionas ir lerva vieną savaitę po išsiritimo laikomi tamsoje, išskyrus kai jie yra tikrinami. Toliau susilpnintas apšvietimas visą bandymo laiką.

▼C1

3 priedėlis

Kitų dokumentais tinkamai patvirtintų rūšių bandymo sąlygos, trukmė ir išgyvenamumo kriterijai

Rūšis	Temperatūra (°C)	Sūrumas (0/00)	Apšvietimo trukmė (valandos)	Stadijų trukmė (paros)		Tipiška embriono ir mailiaus sutrynio maišeliu bandymo trukmė	Kontrolinių bandinių išgyvenamumas (ne mažesniskaip %)	
				Embrionas	Mailiaus sutrynio maišeliu bandymas		Išsiritimo sėkmė	Poišsiritimo
GĖLAVANDENĖS								
Carassius auratus Sidabrinis karosas	24 ± 1	—	—	3–4	> 4	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 4 parų po išsiritimo (7 paros)	—	80
Lepomis macrochirus Melsvažiaunis saulešeris	21 ± 1	—	16	3	> 4	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 4 parų po išsiritimo (7 paros)	—	75
JŪROS								
Menidia peninsulae Priekrantinė menidija	22–25	15–22	12	1,5	10	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 5 parų po išsiritimo (6–7 paros)	80	60
Clupea harengus Atlantinė silkė	10 ± 1	8–15	12	20–25	3–5	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 3 parų po išsiritimo (23–27 paros)	60	80
Gadus morhua Atlantinė menkė	5 ± 1	5–30	12	14–16	3–5	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 3 parų po išsiritimo (18 parų)	60	80
Cyprinodon variegatus Lėlžuvė	25 ± 1	15–30	12	—	—	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 4/7 parų po išsiritimo (28 paros)	> 75	80

▼C1

4 PRIEDĖLIS

KAI KURIOS TINKAMO SKIEDIMO VANDENS CHEMINĖS CHARAKTERISTIKOS

Medžiaga	Koncentracija
Kietosios dalelės	< 20 mg/l
Bendroji organinė anglis	< 2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	< 1 µg/l
Liekamasis chloras	< 10 µg/l
Bendras fosforo organinių pesticidų kiekis	< 50 ng/l
Bendras chloro organinių pesticidų ir polichlorintų bifenilų kiekis	< 50 ng/1
Bendras organinis chloras	< 25 ng/1

▼C1

C.16. NAMINĖS BITĖS. ŪMUS TOKSIŠKUMAS PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ

1. METODAS

Šis ūmaus toksiškumo bandymo metodas yra OECD TG 213 (1998) kopija.

1.1. ĮVADAS

Šis toksiškumo bandymas yra laboratorinis metodas, skirtas įvertinti augalų apsaugos priemonių ir kitų cheminių medžiagų ūmų toksiškumą per virškinamąjį traktą suaugusioms naminėms bitėms darbininkėms.

Vertinant ir nustatant cheminių medžiagų toksiškumo charakteristikas, gali būti reikalinga nustatyti ūmų toksiškumą per virškinamąjį traktą naminėms bitėms, pvz., kai galimas naminių bičių veikimas chemine medžiaga. Ūmaus toksiškumo per virškinamąjį traktą bandymas atliekamas norint nustatyti pesticidų ir kitų cheminių medžiagų būdingą toksiškumą bitėms. Šio bandymo rezultatai turėtų būti naudojami pesticidų pavojaus bitėms vertinimo programose pagal seką nuo laboratorinių toksiškumo bandymų iki bandymų pusiau lauko ir lauko sąlygomis (1). Pesticidai gali būti bandomi kaip veikliosios medžiagos (v. m.) ar kaip preparatai.

Turi būti vartojamas toksiškumo etalonas bičių jautrumui ir bandymo metodo preciziškumui tikrinti.

1.2. APIBRĖŽTYS

Ūmus toksiškumas per virškinamąjį traktą – neigiamas poveikis, kuris pasireiškia ne vėliau kaip po 96 valandų (h) davus vienkartinę bandomosios medžiagos dozę.

Dozė – suvartotos medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama kaip bandomosios medžiagos masė (μg) vienam bandomajam gyvūnui (μg/bitei). Tikroji dozė kiekvienai bitei negali būti apskaičiuota, nes bitės šeriamos kartu, tačiau galima įvertinti vidutinę dozę (bendras bandomosios medžiagos suvartotas kiekis/bandomųjų bičių skaičius viename narvelyje).

Oralinė LD_{50} (vidutinė mirtina dozė) – yra statistiškai apskaičiuota vienkartinė medžiagos dozė, kurią duodant per virškinamąjį traktą gali žūti 50 % gyvūnų. LD_{50} vertė yra išreiškiama (μg) bandomosios medžiagos vienai bitei. Jei tai pesticidai, bandomoji medžiaga gali būti veiklioji medžiaga (v. m.) ar preparatas, kuriame yra viena ar daugiau kaip viena veiklioji medžiaga.

Mirštamumas – gyvūnas registruojamas kaip žuvęs, kai jis visiškai nejuda.

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Taikant tam tikrą dozių intervalą, suaugusios naminės bitės darbininkės (*Apis mellifera*) yra veikiamos sacharozės tirpale ištirpinta bandomąja medžiaga. Toliau bitės maitinamos tuo pačiu maistu be bandomosios medžiagos. Mirštamumas registruojamas kasdien bent 48 h ir lyginamas su mirštamumu kontroliniuose bandiniuose vertėmis. Jei mirštamumas didėja 24–48 h laikotarpiu, o mirštamumas kontroliniuose bandiniuose lieka priimtino lygio, t. y. $\leq$ 10 %, bandymą reikia tęsti ne ilgiau kaip iki 96 h. Rezultatai analizuojami LD_{50} po 24 h ir 48 h, o jei bandymas tęsiamas, po 72 h ir 96 h apskaičiuoti.

▼C1

1.4. BANDYMO TINKAMUMAS

Bandymas yra tinkamas, jei tenkinamos šios sąlygos:

— baigiant bandymą vidutinis mirštamumas visuose kontroliniuose bandiniuose turi būti ne didesnis kaip 10 %,

— toksiškumo etalono LD_{50} atitinka apibrėžtą intervalą.

1.5. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.5.1. **Bičių rinkimas**

Turi būti naudojamos jaunos suaugusios tos pačios veislės bitės darbininkės, t. y. to paties amžiaus, vienodai maitinamos ir t. t. Bitės turi būti gaunamos iš tinkamai maitinamų, sveikų, kiek įmanoma be ligų ir vienos motinėlės kolonijų, kurių istorija ir fiziologinė būsena yra žinoma. Jos gali būti renkamos tą rytą, kai numatoma naudoti, ar vakare prieš bandymą ir laikomos bandymo sąlygomis iki kitos dienos. Tinka iš rėmų surinktos bitės be perų. Reikia vengti rinkti bites ankstyvą pavasarį ar vėlyvą rudenį, nes tokiu metu keičiasi bičių fiziologija. Jei bandymai turi būti atliekami anksti pavasarį ar vėlai rudenį, bitės gali būti užaugintos inkubatoriuje ir vieną savaitę maitinamos bičių duonele (nuo korio surinktomis žiedadulkėmis) ir sacharozės tirpalu. Bitės, apdorotos cheminėmis medžiagomis, pvz., antibiotikais, preparatais varaozei gydyti ir t. t., toksiškumo bandymams neturėtų būti naudojamos, jei po apdorojimo paskutinį kartą dar nėra praėję keturių savaičių.

1.5.2. **Laikymo ir maitinimo sąlygos**

Naudojami lengvai plaunami ir gerai vėdinami narveliai. Galima naudoti bet kurios tinkamos medžiagos, pvz., nerūdijančio plieno, vielos tinklelio, plastiko, vienkartinius medinius narvelius ir t. t. Geriau naudoti 10 bičių vienam narveliui grupes. Narvelių dydis turi atitikti bičių skaičių, t. y. joms reikia palikti pakankamai vietos.

Bitės bandymo patalpoje turi būti laikomos tamsoje esant 25 ± 2 °C temperatūrai. Santykinis drėgnis, paprastai apie 50–70 %, turi būti registruojamas per visą bandymą. Bičių tvarkymo procedūras, įskaitant apdorojimą ir stebėjimus, galima daryti (dienos) šviesoje. Maistą sudaro sacharozės vandeninis tirpalas, kurio galutinė koncentracija yra 500 g/l (50 % w/v). Sudavus bandymo dozes maitinama pasirinktinu laiku. Maitinimo įtaisas turi leisti registruoti maisto tiekimą į kiekvieną narvelį. Galima naudoti stiklinį mėgintuvėlį (maždaug 50 mm ilgio ir 10 mm pločio, kurio atviras galas susiaurinamas maždaug iki 2 mm skersmens).

1.5.3. **Bičių ruošimas**

Surinktos bitės yra atsitiktinai paskirstomos į bandymo narvelius, kurie atsitiktinai išdėstomi bandymo patalpoje.

▼C1

Prieš bandymo pradžią bitės gali būti nemaitintos ne daugiau kaip 2 h. Rekomenduojama prieš apdorojimą bičių nemaitinti, kad bandymo pradžioje visų bičių virškinimo traktas būtų vienodai apkrautas. Prieš pradedant bandymą gaištančios bitės turi būti pašalintos ir pakeistos sveikomis.

1.5.4. **Dozių ruošimas**

Jei bandomoji medžiaga yra su vandeniu maišomas junginys, ją galima tiesiogiai disperguoti 50 % sacharozės tirpale. Vandenyje blogai tirpiems techninės paskirties produktams ir medžiagoms galima naudoti bitėms mažai toksiškus nešiklius, pvz., organinį tirpiklį, emulsiklius ar dispergatorius (pvz., acetoną, dimetilformamidą, dimetilsulfoksidą). Nešiklio koncentracija priklauso nuo bandomosios medžiagos tirpumo ir turi būti vienoda visoms bandytoms koncentracijoms. Tačiau paprastai nešiklio koncentracija yra 1 % ir didesnės naudoti nereikėtų.

Turi būti paruošti atitinkami kontroliniai tirpalai, t. y. jei bandomajai medžiagai tirpinti naudojamas tirpiklis ar dispergatorius, turi būti naudojamos dvi atskiros kontrolinių bandinių grupės: vienas dozavimo tirpalų koncentracijos tirpiklio/nešiklio tirpalas vandenyje ir vienas sacharozės tirpale.

1.6. BANDYMO PROCEDŪRA

1.6.1. **Bandymų ir kontrolinės grupės**

Dozių ir lygiagrečių bandinių skaičius turi atitikti statistinius LD_{50} nustatymo reikalavimus esant 95 % pasikliovimo riboms. Paprastai bandymui reikia penkių LD_{50} intervalo dozių, išdėstytų pagal geometrinę progresiją, kurios koeficientas būtų ne didesnis kaip 2,2. Tačiau skiedimo faktorius ir dozavimui naudojamų koncentracijų skaičius turi būti nustatyti pagal toksiškumo kreivės (mirtingumas kaip dozės funkcija) krypties koeficientą ir atsižvelgiant į rezultatams analizuoti pasirinktą statistinį metodą. Dozavimui tinkamas koncentracijas galima pasirinkti pagal intervalo nustatymo bandymo rezultatus.

Kiekvienos bandymo koncentracijos dozę turi gauti ne mažiau kaip trys bandymų grupės po 10 bičių. Be bandomosios serijos, turi būti bandomos ne mažiau kaip trys kontrolinės grupės po 10 bičių. Kontrolinės grupės taip pat turi būti įtrauktos ir naudojamiems tirpikliams/nešikliams (žr. 1.5.4 skirsnį).

1.6.2. **Toksiškumo etalonas**

Į bandymų seriją turi būti įtrauktas toksiškumo etalonas. Kiekvienai bandomajai dozei turėtų būti bent trys narveliai su 10 bičių kiekviename narvelyje. Kaip toksiškumo etaloną geriau naudoti dimetoatą, kuriam literatūroje nurodytas oralinės LD_{50} 24 h vertės intervalas yra 0,10– 0,35 μg veikliosios medžiagos vienai bitei (2). Tačiau būtų priimtini ir kiti toksiškumo etalonai, jei būtų pateikta pakankamai duomenų laukiamam atsakui į dozės poveikį patikrinti (pvz., parationas).

▼C1

1.6.3. **Veikimas**

1.6.3.1. *Dozių davimas*

Kiekvienai bičių bandymo grupei turi būti duodama 100–200 μl 50 % sacharozės vandeninio tirpalo, kuriame būtų reikiamos koncentracijos bandomoji medžiaga. Blogai tirpiems, mažo toksiškumo produktams ar mažos koncentracijos preparatams reikalingas didesnis tūris, nes turi būti sunaudota didesnė sacharozės tirpalo dalis. Turi būti kontroliuojamas grupės suvartotas apdoroto maisto kiekis. Maistą suvartojus (paprastai per 3–4 h), maitinimo įtaisas turi būti pašalintas iš narvelio ir pakeistas maitinimo įtaisu vien tik su sacharozės tirpalu. Toliau sacharozės tirpalai duodami pasirinktinu laiku. Esant kai kurių junginių didesnei koncentracijai, maisto gali būti suvartota mažai arba bitės gali jį visiškai atmesti. Ne vėliau kaip po 6 h nesuvartotas apdorotas maistas turi būti pakeistas vien tik sacharozės tirpalu. Turi būti įvertintas nesuvartoto apdoroto maisto kiekis (pvz., matuojant nesuvartoto apdoroto maisto tūrį arba masę).

1.6.3.2. *Trukmė*

Geriausia bandymo trukmė po to, kai bandomasis tirpalas pakeičiamas vien tik sacharozės tirpalu, yra 48 h. Jei mirštamumas po pirmųjų 24 h vis dar didėja daugiau kaip 10 %, bandymo trukmė turi būti prailginta ne daugiau kaip iki 96 h, jei mirštamumas kontroliniuose bandiniuose yra ne didesnis kaip 10 %.

1.6.4. **Stebėjimai**

Mirštamumas registruojamas po 4 h nuo bandymo pradžios, o vėliau po 24 h ir 48 h (t. y. po dozės davimo). Jei reikalingas prailgintas stebėjimo laikotarpis, tolesni vertinimai turi būti daromi kas 24 h ne ilgiau kaip iki 96 h, jei mirštamumas kontroliniuose bandiniuose yra ne didesnis kaip 10 %.

Turi būti įvertintas grupės suvartoto maisto kiekis. Apdoroto ir neapdoroto maisto vartojimo greičio per 6 h lyginimas gali suteikti informacijos apie apdoroto maisto priimtinumą.

Turi būti registruojami visi bandymo metu pastebėti neįprasto elgesio reiškiniai.

1.6.5. **Ribinis bandymas**

Kartais (pvz., kai manoma, kad bandomosios medžiagos toksiškumas turėtų būti mažas) galima atlikti ribinį bandymą naudojant 100 μg veikliosios medžiagos vienai bitei, taip norint parodyti, kad LD_{50} yra didesnė už šią vertę. Turi būti naudojama ta pati metodika, įskaitant tris lygiagrečias bandymų grupes bandomajai dozei, atitinkamus kontrolinius bandinius ir toksiškumo etaloną. Jei pasitaiko mirties atvejų, turi būti daromas visas tyrimas. Jei pastebimi subletalūs poveikiai (žr. 1.6.4 skirsnį), jie turi būti užregistruoti.

▼C1

2. **DUOMENYS IR ATASKAITA**

2.1. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti apibendrinti lentelių pavidalu, kiekvienos dozės grupei, taip pat kontrolinių bandinių ir toksiškumo etalono grupėms nurodant naudotų bičių skaičių, mirštamumą kiekvienu stebėjimo momentu ir neįprastai besielgiančių bičių skaičių. Mirštamumo duomenis analizuokite atitinkamais analizės metodais (pvz., probito funkcijos analizė, slenkamasis vidurkis, binominio skirstinio tikimybė) (3) (4). Nubraižykite atsako, kaip dozės funkcijos, kreives kiekvienam rekomenduotam stebėjimo momentui ir apskaičiuokite kreivių krypties koeficientus ir vidutines mirtinas dozes (LD_{50}) su 95 % pasikliovimo ribomis. Galima padaryti pataisas dėl mirštamumo kontroliniuose bandiniuose naudojant Abbotto pataisą (4) (5). Jei apdorotas maistas suvartojamas nevisiškai, turi būti nustatyta grupės suvartota bandomosios medžiagos dozė. LD_{50} turi būti išreikšta µg bandomosios medžiagos vienai bitei.

2.2. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti ši informacija:

2.2.1. **Bandomoji medžiaga:**

— fizikinė būsena ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės (pvz., stabilumas vandenyje, garų slėgis),

— cheminio identifikavimo duomenys, įskaitant struktūrinę formulę, grynumą (t. y. pesticidams – identiškumas ir veikliosios (-ųjų) medžiagos (-ų) koncentracija).

2.2.2. **Bandomieji gyvūnai:**

— mokslinis pavadinimas, veislė, apytikris amžius (savaitėmis), rinkimo būdas, rinkimo data,

— informacija apie bandymų bičių rinkimui naudotas kolonijas, įskaitant sveikatą, visas suaugusių bičių ligas, prieš tai taikytą apdorojimą ir t. t.

2.2.3. **Bandymo sąlygos:**

— bandymo patalpos temperatūra ir santykinis drėgnis,

— laikymo sąlygos, įskaitant narvelių tipą, dydį ir medžiagą,

— pradinių ir bandomųjų tirpalų ruošimo būdai (turi būti nurodytas tirpiklis, jei naudojamas, ir jo koncentracija),

— bandymo schema, pvz., naudotos bandomosios koncentracijos ir jų skaičius, kontrolinių bandinių skaičius; kiekvienai bandomajai koncentracijai ir kontroliniam bandiniui naudotų narvelių skaičius ir bičių skaičius viename narvelyje,

— bandymo data.

▼C1

2.2.4. **Rezultatai:**

— parengtinio intervalo nustatymo tyrimo, jei darytas, rezultatai,

— neapdoroti duomenys: mirštamumas po kiekvienos bandytos dozės ir kiekvienu stebėjimo momentu,

— dozės ir atsako kreivių brėžinys baigiant bandymą,

— bandomosios medžiagos ir toksiškumo etalono LD_{50} vertės su 95 % pasikliovimo ribomis, nustatytos kiekvienu rekomenduotu stebėjimo momentu,

— LD_{50} nustatymui taikyti statistiniai metodai,

— mirštamumas kontroliniuose bandiniuose,

— kitas stebėtas ar išmatuotas biologinis poveikis, pvz., bičių neįprastas elgesys (įskaitant bandomosios dozės atmetimą), maisto vartojimo greitis apdorotų ir neapdorotų bičių grupėse,

— visi nukrypimai nuo čia aprašytų bandymo metodikų ir visa kita susijusi informacija.

3. **NUORODOS**

1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151–165. March 1993.

2) Gough, H. J., Mclndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981–1992. Journal of Apicultural Research, 22, 119–125.

3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol, and Exper. Then, 96, 99–113.

4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, 265–267.

▼C1

C.17. NAMINĖS BITĖS – ŪMAUS KONTAKTINIO TOKSIŠKUMO BANDYMAS

1. METODAS

Sis ūmaus toksiškumo bandymo metodas yra OECD TG 214 (1998) kopija.

1.1. ĮVADAS

Šis toksiškumo bandymas yra laboratorinis metodas, skirtas įvertinti augalų apsaugos priemonių ir kitų cheminių medžiagų ūmų kontaktinį toksiškumą suaugusioms naminėms bitėms darbininkėms.

Vertinant ir nustatant cheminių medžiagų toksiškumo charakteristikas, gali būti reikalinga nustatyti ūmų kontaktinį toksiškumą naminėms bitėms, pvz., kai yra galimas naminių bičių veikimas chemine medžiaga. Ūmaus toksiškumo per virškinamąjį traktą bandymas atliekamas norint nustatyti pesticidų ir kitų cheminių medžiagų būdingą toksiškumą bitėms. Šio bandymo rezultatai turėtų būti naudojami pesticidų pavojaus bitėms vertinimo programose pagal seką nuo laboratorinių toksiškumo bandymų iki bandymų pusiau lauko ir lauko sąlygomis (1). Pesticidai gali būti bandomi kaip veikliosios medžiagos (v. m.) ar kaip preparatai.

Turi būti vartojamas toksiškumo etalonas bičių jautrumui ir bandymo metodo preciziškumui tikrinti

1.2. APIBRĖŽTYS

Ūmus kontaktinis toksiškumas – neigiamas poveikis, kuris pasireiškia ne vėliau kaip per 96 h po vienkartinės bandomosios medžiagos dozės vietinio uždėjimo.

Dozė – uždėtos medžiagos kiekis. Dozė yra išreiškiama kaip bandomosios medžiagos masė (μg) vienam bandomajam gyvūnui (μg/bitei).

Kontaktinė LD_{50} (vidutinė mirtina dozė) – yra statistiškai apskaičiuota vienkartinė medžiagos dozė, kurią naudojant gali žūti 50 % gyvūnų. LD_{50} vertė yra išreiškiama (μg) bandomosios medžiagos vienai bitei. Jei tai pesticidai, bandomoji medžiaga gali būti veiklioji medžiaga (v. m.) ar preparatas, kuriame yra viena ar daugiau kaip viena veiklioji medžiaga.

Mirštamumas – gyvūnas registruojamas kaip žuvęs, kai jis visiškai nejuda.

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Taikant tam tikrą dozių intervalą, suaugusios naminės bitės darbininkės (*Apis mellifera*) yra veikiamos tinkamame nešiklyje ištirpinta bandomąja medžiaga ją tiesiogiai užlašinant ant krūtinės (lašeliais). Bandymo trukmė yra 48 h. Jei mirštamumas per 24–48 h didėja, o mirštamumas kontroliniuose bandiniuose lieka priimtino lygio, t. y. < 10 %, bandymą reikia tęsti ne ilgiau kaip iki 96 h. Mirštamumas registruojamas kasdien ir lyginamas su mirštamumo kontroliniuose bandiniuose vertėmis. Rezultatai yra analizuojami LD_{50} po 24 h ir 48 h, o jei bandymas yra tęsiamas, po 72 h ir 96 h apskaičiuoti.

▼C1

1.4. BANDYMO TINKAMUMAS

Bandymas yra tinkamas, jei tenkinamos šios sąlygos:

— baigiant bandymą vidutinis mirštamumas visuose kontroliniuose bandiniuose turi būti ne didesnis kaip 10 %,

— toksiškumo etalono LD_{50} atitinka apibrėžtą intervalą.

1.5. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.5.1. **Bičių rinkimas**

Turi būti naudojamos jaunos suaugusios bitės darbininkės, t. y. to paties amžiaus, vienodai maitinamos, tos pačios veislės ir t. t. Bitės turi būti gaunamos iš tinkamai maitinamų, sveikų, kiek įmanoma be ligų ir vienos motinėlės kolonijų, kurių istorija ir fiziologinė būsena yra žinoma. Jos gali būti renkamos tą rytą, kai numatomos naudoti, ar vakare prieš bandymą ir laikomos bandymo sąlygomis iki kitos dienos. Tinka iš rėmų surinktos bitės be perų. Reikėtų vengti rinkti bites ankstyvą pavasarį ar vėlyvą rudenį, nes tokiu metu keičiasi bičių fiziologija. Jei bandymai turi būti atliekami anksti pavasarį ar vėlai rudenį, bitės gali būti užaugintos inkubatoriuje ir vieną savaitę maitinamos bičių duonele (nuo korio surinktomis žiedadulkėmis) ir sacharozės tirpalu. Bitės, apdorotos cheminėmis medžiagomis, pvz., antibiotikais, preparatais varaozei gydyti ir t. t., toksiškumo bandymams neturėtų būti naudojamos, jei po apdorojimo paskutinį kartą dar nėra praėję keturių savaičių.

1.5.2. **Laikymo ir maitinimo sąlygos**

Naudojami lengvai plaunami ir gerai vėdinami narveliai. Galima naudoti bet kurios tinkamos medžiagos, pvz., nerūdijančio plieno, vielos tinklelio, plastiko, vienkartinius medinius narvelius ir t. t. Narvelių dydis turi atitikti bičių skaičių, t. y. joms reikia palikti pakankamai vietos. Geriau naudoti dešimties bičių vienam narveliui grupes.

Bitės bandymo patalpoje turi būti laikomos tamsoje esant 25 ± 2 °C temperatūrai. Santykinis drėgnumas, paprastai apie 50–70 %, turi būti registruojamas per visą bandymą. Bičių tvarkymo procedūras, įskaitant apdorojimą ir stebėjimus, galima daryti (dienos) šviesoje. Maistą sudaro sacharozės vandeninis tirpalas, kurio galutinė koncentracija yra 500 g/l (50 % w/v), duodamas pasirinktinu laiku per visą bandymą naudojant bičių maitinimo įtaisą. Tai gali būti stiklinis mėgintuvėlis (maždaug 50 mm ilgio ir 10 mm pločio, kurio atviras galas susiaurinamas maždaug iki 2 mm skersmens)

1.5.3. **Bičių ruošimas**

Surinktos bitės gali būti apmarintos anglies dioksidu ar azotu, kad būtų galima uždėti bandomąją medžiagą. Anestezuojančios medžiagos kiekis ir veikimo trukmė turi būti kiek įmanoma mažesni. Prieš pradedant bandymą mirštančios bitės turi būti pašalintos ir pakeistos sveikomis.

1.5.4. **Dozių ruošimas**

Bandomoji medžiaga turi būti užlašinama tirpalo nešiklyje pavidalu, t. y. ištirpinta organiniame tirpiklyje ar vandenyje, turinčiame drėkiklio. Kaip organinį tirpiklį geriau būtų naudoti acetoną, tačiau galima naudoti kitus mažai toksiškus bitėms tirpiklius (pvz., dimetilformamidą, dimetilsulfoksidą). Jei tai vandenyje disperguoti cheminiai preparatai ir organiniuose tirpikliuose netirpios labai polinės organinės medžiagos, būtų lengviau užlašinti nedidelės koncentracijos komerciniame drėkiklyje (pvz., *Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween*) paruoštus tirpalus.

▼C1

Turi būti paruošti atitinkami kontroliniai tirpalai, t. y. jei bandomajai medžiagai tirpinti naudojamas tirpiklis ar dispergatorius, turi būti naudojamos dvi atskiros kontrolinių bandinių grupės: vienos grupės bitės apdorojamos vandeniu, kitos grupės bitės tirpikliu/nešikliu.

1.6. BANDYMO PROCEDŪRA

1.6.1. **Bandymų ir kontrolinės grupės**

Dozių ir lygiagrečių bandinių skaičius turi atitikti statistinius LD_{50} nustatymo reikalavimus esant 95 % pasikliovimo riboms. Paprastai bandymui reikia penkių LD_{50} intervalo dozių, išdėstytų geometrine progresija, kurios koeficientas būtų ne didesnis kaip 2,2. Tačiau skiedimo faktorius ir dozavimui naudojamų koncentracijų skaičius turi būti nustatyti pagal toksiškumo kreivės (mirštamumas kaip dozės funkcija) krypties koeficientą ir atsižvelgiant į rezultatams analizuoti pasirinktą statistinį metodą. Dozavimui tinkamas koncentracijas galima pasirinkti pagal intervalo nustatymo bandymo rezultatus.

Kiekvienai bandymo koncentracijai dozę turi gauti ne mažiau kaip trys bandymų grupės po 10 bičių.

Be bandomosios serijos, turi būti bandomos trys kontrolinės grupės po 10 bičių. Jei naudojamas organinis tirpiklis ar drėkiklis, tirpikliui ar drėkikliui turi būti naudojamos papildomos trys kontrolinės grupės, kurių kiekvienoje būtų po 10 bičių

1.6.2. **Toksiškumo etalonas**

Į bandymų seriją turi būti įtrauktas toksiškumo etalonas. Laukiamai LD_{50} dozei apimti turi būti pasirenkamos bent trys dozės. Kiekvienai bandomajai dozei turi būti bent trys narveliai su 10 bičių kiekviename narvelyje. Kaip toksiškumo etaloną geriau naudoti dimetoatą, kuriam literatūroje nurodytas kontaktinės LD_{50} 24 h vertės intervalas yra 0,10– 0,30 μg veikliosios medžiagos vienai bitei (2). Tačiau būtų priimtini ir kiti toksiškumo etalonai, jei būtų pateikta pakankamai duomenų laukiamam atsakui į dozės poveikį patikrinti (pvz., parationas).

1.6.3. **Veikimas**

1.6.3.1. *Dozių davimas*

Apmarintos bitės apdorojamos atskirai darant vietinį užlašinimą. Bitės skirtingoms bandomosioms dozėms ir kontroliniams bandiniams paskirstomos atsitiktinai. Ant kiekvienos bitės krūtinės dorsalinės pusės mikropipete užlašinamas 1 μl tinkamos koncentracijos bandomosios medžiagos tirpalo. Galima naudoti kitokius tūrius, jei tai bus pagrįsta. Po užlašinimo bitės paskirstomos po narvelius ir joms duodama sacharozės tirpalo.

1.6.3.2. *Trukmė*

Geriausia bandymo trukmė yra 48 h. Jei mirštamumas 24–48 h laikotarpiu didėja daugiau kaip 10 %, bandymo trukmė turi būti prailginta ne daugiau kaip iki 96 h, jei mirštamumas kontroliniuose bandiniuose yra ne didesnis kaip 10 %.

▼C1

1.6.4. **Stebėjimai**

Mirštamumas registruojamas po 4 h nuo dozės davimo, o vėliau po 24 h ir 48 h. Jei reikalingas prailgintas stebėjimo laikotarpis, tolesni vertinimai turi būti daromi kas 24 h ne ilgiau kaip iki 96 h, jei mirštamumas kontroliniuose bandiniuose yra ne didesnis kaip 10 %.

Turėtų būti registruojami visi bandymo metu pastebėti neįprasto elgesio reiškiniai

1.6.5. **Ribinis bandymas**

Kartais (pvz., kai manoma, kad bandomosios medžiagos toksiškumas turėtų būti mažas) galima atlikti ribinį bandymą naudojant 100 μg veikliosios medžiagos vienai bitei, taip norint parodyti, kad LD_{50} yra didesnė už šią vertę. Turėtų būti naudojama ta pati metodika, įskaitant tris lygiagrečias bandymų grupes bandomajai dozei, atitinkamus kontrolinius bandinius ir toksiškumo etaloną. Jei pasitaiko mirštamumo atvejų, turi būti daromas visas tyrimas. Jei pastebimas subletalus poveikis (žr. 1.6.4 skirsnį), jis turi būti užregistruotas.

2. **DUOMENYS IR ATASKAITA**

2.1. DUOMENYS

Duomenys turi būti apibendrinti lentelių pavidalu, kiekvienos dozės grupei, taip pat kontrolinių bandinių ir toksiškumo etalono grupėms nurodant naudotų bičių skaičių, mirštamumą kiekvienu stebėjimo momentu ir neįprastai besielgiančių bičių skaičių. Mirštamumo duomenis analizuokite atitinkamais analizės metodais (pvz., probito funkcijos analizė, slenkamasis vidurkis, binominio skirstinio tikimybė) (3) (4). Nubraižykite atsako, kaip dozės funkcijos, kreives kiekvienam rekomenduotam stebėjimo momentui (t. y. 24 h, 48 h ir, jei tinka, 72 h, 96 h) ir apskaičiuokite kreivių krypties koeficientus ir vidutines mirtinas dozes (LD_{50}) su 95 % pasikliovimo ribomis. Galima padaryti pataisas dėl mirštamumo kontroliniuose bandiniuose naudojant Abbotto pataisą (4) (5). LD_{50} turi būti išreikšta μg bandomosios medžiagos vienai bitei.

2.2. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti tokia informacija:

2.2.1. **Bandomoji medžiaga:**

— fizikinė būsena ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės (pvz., stabilumas vandenyje, garų slėgis),

— cheminio identifikavimo duomenys, įskaitant struktūrinę formulę, grynumą (t. y. pesticidams – identiškumas ir veikliosios (-ųjų) medžiagos (-ų) koncentracija).

2.2.2. **Bandomieji gyvūnai:**

— mokslinis pavadinimas, veislė, apytikris amžius (savaitėmis), rinkimo būdas, rinkimo data,

— informacija apie bandymų bičių rinkimui naudotas kolonijas, įskaitant sveikatą, visas suaugusių bičių ligas, prieš tai taikytą apdorojimą ir t. t.

▼C1

2.2.3. **Bandymo sąlygos:**

— bandymo patalpos temperatūra ir santykinis drėgnis,

— laikymo sąlygos, įskaitant narvelių tipą, dydį ir medžiagą,

— bandomosios medžiagos davimo būdai, pvz., naudojamas tirpiklis, užlašinamo bandomojo tirpalo tūris, naudotos anestezuojančios medžiagos,

— bandymo schemą, pvz., naudotos bandomosios dozės ir jų skaičius, kontrolinių bandinių skaičius; kiekvienai bandomajai koncentracijai ir kontroliniam bandiniui naudotų narvelių skaičius ir bičių skaičius viename narvelyje,

— bandymo data.

2.2.4. **Rezultatai:**

— parengtinio intervalo nustatymo tyrimo, jei darytas, rezultatai,

— neapdoroti duomenys: mirštamumas po kiekvienos bandytos dozės ir kiekvienu stebėjimo momentu,

— dozės ir atsako kreivių brėžinys bandymo pabaigoje,

— bandomosios medžiagos ir toksiškumo etalono LD_{50} vertės su 95 % pasikliovimo ribomis, nustatytos kiekvienu rekomenduotu stebėjimo momentu,

— LD_{50} nustatymui taikyti statistiniai metodai,

— mirštamumas kontroliniuose bandiniuose,

— kitas pastebėtas ar išmatuotas biologinis poveikis ir bet koks bičių neįprastas elgesys,

— visi nukrypimai nuo čia aprašytų bandymo metodikų ir visa kita susijusi informacija.

3. **NUORODOS**

1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151–165. March, 1993.

2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981–1992. Journal of Apicultural Research 22 119–125.

3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol, and Exper. Then, 96, p. 99–113.

4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, p. 265–267.

▼C1

C.18. **ADSORBCIJA/DESORBCIJA TAIKANT STATINĖS PUSIAUSVYROS BANDYMĄ**

1. **METODAS**

Šis metodas yra OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development* – Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacijos) TG (*Test Guidlines* – Bandymų gairės) 106 dėl dirvožemio adsorbcijos/desorbcijos taikant statinės pusiausvyros metodą kopija (2000).

1.1. ĮVADAS

Metode atsižvelgiama į tarplaboratorinio lyginimo bandymą ir į seminaro apie dirvožemio atranką tobulinant adsorbcijos metodą medžiagą (1) (2) (3) (4), taip pat į nacionaliniu lygiu taikomas rekomendacijas (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Adsorbcijos/desorbcijos tyrimai yra naudingi kuriant svarbią informaciją apie cheminių medžiagų judrumą ir jų pasiskirstymą biosferos dirvožemio, vandens ir oro dalyse (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Informacija gali būti naudojama prognozuojant ar įvertinant, pvz., cheminės medžiagos skaidymą (22) (23), kitimą ir organizmų įsisavinamą kiekį (24); jos išplovimą per dirvos sluoksnius (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28); lakumą nuo dirvožemio (21) (29) (30); nuotėkį nuo žemės paviršiaus į gamtinius vandenis (18) (31) (32). Adsorbcijos duomenys gali būti naudojami palyginimo ir modeliavimo tikslais (19) (33) (34) (35).

Cheminės medžiagos pasiskirstymas tarp dirvožemio ir vandeninių fazių yra sudėtingas procesas, kuris priklauso nuo daugelio skirtingų veiksnių: medžiagos cheminės prigimties (12) (36) (37) (38) (39) (40), dirvožemio charakteristikų (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) ir klimato veiksnių, pvz., lietaus, temperatūros, saulės šviesos ir vėjo. Čia pateiktas metodas yra supaprastintas laboratorinis modelis, kuris negali iki galo išaiškinti cheminės medžiagos adsorbcijos dirvožemiu reiškinių ir mechanizmų. Ir nors šis metodas negali apimti visų aplinkoje pasitaikančių atvejų, jis suteikia vertingos informacijos apie aplinkai svarbią cheminės medžiagos adsorbciją.

Žr. taip pat bendrąjį įvadą.

1.2. TAIKYMO SRITIS

Metodu siekiama įvertinti, kaip medžiagos dirvožemyje elgiasi adsorbcijos/desorbcijos požiūriu. Tikslas yra gauti sorbcijos vertę, kuri galėtų būti naudojama pasiskirstymui įvairiomis aplinkos sąlygomis prognozuoti; šiuo tikslu nustatomi cheminių medžiagų adsorbcijos pusiausvyros koeficientai kaip dirvožemio charakteristikų (pvz., organinės anglies kiekio, molio kiekio, dirvožemio struktūros bei pH) funkcija. Turi būti naudojamas įvairių tipų dirvožemis, kad būtų galima kiek įmanoma plačiau apimti konkrečios medžiagos sąveiką su natūraliai pasitaikančiu dirvožemiu.

Pagal šį metodą adsorbcija yra cheminės medžiagos susijungimo su dirvožemio paviršiumi procesas; metodas neskiria skirtingų adsorbcijos procesų (fizikocheminės adsorbcijos) ir kitų procesų, pvz., paviršiumi katalizuojamo skaidymo, tūrio adsorbcijos ar cheminės reakcijos. Neatsižvelgiama į adsorbciją, kuri vyksta ant dirvožemyje susidarančių koloidinių dalelių (skersmuo < 0,2 μm).

▼C1

Adsorbcijai svarbiausi dirvožemio parametrai yra: organinės anglies kiekis (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48), molio kiekis, dirvožemio struktūra (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) ir, jei tai jonizuojami junginiai, pH vertė (3) (4) (42). Kiti dirvožemio parametrai, kurie galėtų veikti konkrečios medžiagos adsorbciją/desorbciją, yra efektyvioji katijonų mainų geba (ECEC), amorfinių geležies ir aliuminio oksidų kiekis, ypač vulkaninės kilmės ir tropikų dirvožemiui (4), taip pat savitasis paviršius (49).

Bandymas skirtas cheminės medžiagos adsorbcijai ant skirtingų dirvožemio tipų su kintamu organinės anglies kiekiu, molio kiekiu ir dirvožemio struktūra bei pH įvertinti. Jį sudaro trys tarpsniai:

1 tarpsnis. Pradinis tyrimas norint nustatyti:

— dirvožemio/tirpalo santykį,

— adsorbcijos pusiausvyros nusistovėjimo trukmę ir pusiausvyros sąlygomis adsorbuotos medžiagos kiekį,

— medžiagos adsorbciją ant bandymo indų paviršių ir bandomosios medžiagos stabilumą bandymo laikotarpiu.

2 tarpsnis. Atrankos bandymas: tiriama penkių skirtingų tipų dirvožemio adsorbcija matuojant adsorbcijos kinetiką vienai koncentracijai ir nustatant pasiskirstymo koeficientus K_d ir K_{oc}.

3 tarpsnis. Freundlicho adsorbcijos izotermių apskaičiavimas norint nustatyti koncentracijos įtaką adsorbcijos dirvožemiu laipsniui.

Desorbcijos tyrimas taikant desorbcijos kinetiką/Freundlicho desorbcijos izotermes (1 priedėlis).

1.3. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Simbolis	Apibrėžtis	Vienetai
(A_{t_i})	adsorbcijos procentinė dalis laiku t_i;	%
A_{eq}	adsorbcijos procentinė dalis adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis	%
$(m_s^{ads}(t_i))$	bandomosios medžiagos, adsorbuotos dirvožemiu laiku Δt_i, masė	µg
$(m_s^{ads}(\Delta t_i))$	bandomosios medžiagos, adsorbuotos dirvožemiu per laiką Δt_i, masė	µg
$(m_s^{ads}(eq))$	bandomosios medžiagos, adsorbuotos dirvožemiu adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis, masė	µg
m_0	adsorbcijos bandymo pradžioje mėgintuvėlyje esančios bandomosios medžiagos masė	µg
$(m_m^{ads}(t_i))$	bandomosios medžiagos masė, nustatyta tirpalo alikvotinėje dalyje (v_a^A) laiku t_i	µg
$(m_{aq}^{ads}(eq))$	medžiagos tirpale masė adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis	µg
m_{soil}	dirvožemio fazės kiekis, išreikštas sauso dirvožemio mase	g

▼C1

Simbolis	Apibrėžtis	Vienetai
C_{st}	medžiagos pradinio tirpalo masės koncentracija	$\mu g\ cm^{-3}$
C_o	sąlytyje su dirvožemiu esančio bandomojo tirpalo pradinė masės koncentracija	$\mu g\ cm^{-3}$
$(C_{aq}^{ads}(t_i))$	medžiagos vandeninės fazės masės koncentracija laiku t_i, kai buvo atliekama analizė	$\mu g\ cm^{-3}$
$(C_s^{ads}(eq))$	dirvožemiu adsorbuotos medžiagos kiekis adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis	$\mu g\ g^{-1}$
$(C_{aq}^{ads}(eq))$	medžiagos vandeninės fazės masės koncentracija adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis	$\mu g\ cm^{-3}$
V_0	sąlytyje su dirvožemiu esančios vandeninės fazės pradinis tūris atliekant adsorbcijos bandymą	cm^3
(v_a^A)	alikvotinės tirpalo dalies tūris, kuriame matuojama bandomoji medžiaga	cm^3
K_d	adsorbcijos pasiskirstymo koeficientas	$cm^3\ g^{-1}$
K_{oc}	pagal organinę anglį normalizuotas adsorbcijos koeficientas	$cm^3\ g^{-1}$
k_{om}	pagal organinę medžiagą normalizuotas pasiskirstymo koeficientas	$cm^3\ g^{-1}$
(K_F^{ads})	Freundlicho adsorbcijos koeficientas	$\mu g^{\ -1-1/n}\ (cm^3)^{\ 1/n}\ g^{\ -1}$
1/n	Freundlicho lygties laipsnio rodiklis	
(D_{t_i})	desorbcijos procentinė dalis laiku t_i	%
$(D_{\Delta t_i})$	desorbcijos procentinė dalis, atitinkanti laiko intervalą Δt_i	%
K_{des}	tariamasis desorbcijos koeficientas	$cm^3\ g^{-1}$
(K_F^{des})	Freundlicho desorbcijos koeficientas	$\mu g^{1-1/n}\ (cm^3)^{\ 1/n}\ g^{\ -1}$
$(m_{aq}^{des}(t_i))$	bandomosios medžiagos, desorbuotos nuo dirvožemio laiku t_i masė	μg
$(m_m^{des}(\Delta t_i))$	bandomosios medžiagos, desorbuotos nuo dirvožemio per laiką Δt_i, masė	μg
$(m_m^{des}(eq))$	medžiagos masė, analiziškai nustatyta vandeninėje fazėje desorbcijos pusiausvyros sąlygomis	μg
$(m_{aq}^{des}(eq))$	bandomosios medžiagos, desorbuotos desorbcijos pusiausvyros sąlygomis, bendroji masė	μg
$(m_s^{des}(\Delta t_i))$	medžiagos, kuri liko adsorbuota dirvožemiu praėjus laiko tarpui At_i, masė	μg
(m_{aq}^A)	medžiagos, likusios po adsorbcijos pusiausvyros bandymo dėl nevisiško tūrio pakeitimo, masė	μg
$(C_s^{des}(eq))$	bandomosios medžiagos, kuri liko adsorbuota dirvožemiu desorbcijos pusiausvyros sąlygomis, kiekis	$\mu g\ g^{-1}$

▼C1

Simbolis	Apibrėžtis	Vienetai
$(C_{aq}^{des}(eq))$	bandomosios medžiagos vandeninės fazės masės koncentracija desorbcijos pusiausvyros sąlygomis	μg cm^{-3}
V_T	vandeninės fazės, esančios sąlytyje su dirvožemiu atliekant desorbcijos kinetikos bandymą nuosekliuoju metodu, bendras tūris	cm^3
V_R	tirpalo virš nuosėdų, pašalinto iš mėgintuvėlio pasiekus adsorbcijos pusiausvyrą ir pakeisto tokiu pat tūriu 0,01 M $CaCl_2$ tirpalo, tūris	cm^3
(v_a^D)	tirpalo, paimto iš mėgintuvėlio (i) bandomosios medžiagos kiekiui nustatyti atliekant desorbcijos kinetikos bandymą nuosekliuoju metodu, alikvotinės dalies tūris	cm^3
(V_r^r)	tirpalo, paimto iš mėgintuvėlio (i) bandomosios medžiagos kiekiui nustatyti atliekant desorbcijos kinetikos bandymą (lygiagretusis metodas), tūris	cm^3
(V_r^F)	tirpalo, paimto iš mėgintuvėlio bandomosios medžiagos kiekiui nustatyti desorbcijos pusiausvyros sąlygomis, tūris	cm^3
MB	masių balansas	%
m_E	bandomosios medžiagos, dviem pakopomis ekstrahuotos iš dirvožemio ir nuo sienelių, bendroji masė	μg
V_{rec}	adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis regeneruoto tirpalo virš nuosėdų tūris	cm^3
p_{ow}	pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolis/vanduo)	
pKa	disociacijos konstanta	
S_w	tirpumas vandenyje	g 1–1

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Žinomi bandomosios medžiagos, neturinčios ar turinčios žymėtųjų atomų, tirpalo 0,01 M $CaCl_2$ tūriai yra sumaišomi su žinomos sauso dirvožemio masės bandiniais, prieš tai laikytais pusiausvyrai nusistovėti 0,01 M $CaCl_2$. Mišinys tam tikrą laiką maišomas. Paskui dirvožemio suspensija atskiriama centrifugavimu ir, jei to pageidaujama, filtravimu, o vandeninė fazė analizuojama. Dirvožemio bandiniu adsorbuotos bandomosios medžiagos kiekis apskaičiuojamas kaip skirtumas tarp pradinio bandomosios medžiagos kiekio tirpale ir jos kiekio bandymo pabaigoje (netiesioginis metodas).

Pagal kitą metodą atliekama dirvožemio analizė ir tiesiogiai nustatomas adsorbuotos bandomosios medžiagos kiekis (tiesioginis metodas). Šis metodas, kurį sudaro pakopinis dirvožemio ekstrahavimas atitinkamu tirpikliu, rekomenduojamas tais atvejais, kai negalima tiksliai nustatyti bandomosios medžiagos tirpalo koncentracijos skirtumo. Tokių atvejų pavyzdžiai yra: bandomosios medžiagos adsorbcija ant bandymo indų paviršiaus; bandomosios medžiagos nestabilumas bandymo metu; silpna adsorbcija, todėl tirpalo koncentracijos pokytis yra labai mažas; stipri adsorbcija, todėl tirpalo koncentracija labai sumažėja ir negali būti tiksliai nustatyta. Naudojant medžiagą su žymėtaisiais atomais, dirvožemio galima ir neekstrahuoti, jei dirvožemio fazės analizei taikomas sudeginimo ir skysčių scintiliacijos skaičiavimo metodas. Tačiau skysčių scintiliacijos skaičiavimas nėra specifinis metodas ir juo negalima atskirti pradinių produktų nuo jų kitimo produktų; taigi jis turi būti taikomas tik tokiu atveju, jei cheminė medžiaga yra stabili tyrimo metu.

▼C1

1.5. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

Cheminiai reagentai turi būti analiziškai gryni. Rekomenduojama naudoti bent 95 % grynumo žinomos sudėties žymėtųjų atomų neturinčias bandomąsias medžiagas ar žinomos sudėties radioaktyviai grynas medžiagas su žymėtaisiais atomais. Jei radioaktyviųjų indikatorių pusėjimo trukmė yra trumpa, turi būti taikomos skilimo pataisos.

Prieš atliekant adsorbcijos/desorbcijos bandymą apie bandomąją medžiagą turi būti žinoma ši informacija:

a) tirpumas vandenyje (A.6);

b) garų slėgis (A.4) ir (ar) Henry'o dėsnio konstanta;

c) abiotinis skaidymas: hidrolizė kaip pH funkcija (C.7);

d) pasiskirstymo koeficientas (A.8);

e) lengvas biologinis skaidumas (C.4) ar aerobinis ir anaerobinis kitimas dirvožemyje;

f) jonizuojamų medžiagų pKa;

g) tiesioginė fotolizė vandenyje (t. y. vandeninio tirpalo UV-VIS absorbcijos spektras, kvantinė išeiga) ir fotocheminis skaidymas ant dirvožemio.

1.6. BANDYMO TAIKOMUMAS

Bandymas tinka cheminėms medžiagoms, kurioms yra nustatytas pakankamo tikslumo analizės metodas. Svarbus parametras, kuris gali turėti įtakos rezultatų patikimumui, ypač taikant netiesioginį metodą, yra bandomosios medžiagos stabilumas bandymo metu. Taigi stabilumą būtina tikrinti darant pradinį tyrimą; jei bandymo metu stebimas medžiagos kitimas, darant pagrindinį tyrimą rekomenduojama analizuoti dirvožemio ir vandeninę fazes.

Gali kilti sunkumų atliekant bandymą su bandomosiomis medžiagomis, kurių tirpumas vandenyje yra mažas ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}), taip pat esant dideliam bandomųjų medžiagų kiekiui, nes medžiagos koncentracija vandeninėje fazėje negali būti analiziškai nustatyta pakankamai tiksliai. Šiais atvejais būtina imtis papildomų priemonių. Nurodymai, kaip spręsti šias problemas, pateikti atitinkamuose šio metodo aprašymo skirsniuose.

Bandant lakiąsias medžiagas reikia imtis atsargumo priemonių nuostoliams bandymo metu išvengti.

1.7. METODO APRAŠYMAS

1.7.1. **Aparatūra ir cheminiai reagentai**

Reikalinga ši standartinė laboratorijos įranga:

a) mėgintuvėliai ar indai bandymams atlikti. Svarbu, kad šie mėgintuvėliai ar indai:

— būtų pritaikyti centrifugavimo aparatui, norint sumažinti tvarkymo ir pernešimo paklaidas,

— būtų pagaminti iš inertinės medžiagos, kurios paviršiuje bandomosios medžiagos adsorbcija būtų kuo mažesnė;

▼C1

b) maišymo įtaisas: vertikalioji purtyklė ar lygiavertė įranga; maišant maišymo įtaisu dirvožemis turi sudaryti suspensiją;

c) centrifuga: geriau didelio apsisukimų dažnio, pvz., centrifugavimo jėga > 3 000 g, su termostatu, iš vandeninio tirpalo galinti pašalinti daleles, kurių skersmuo didesnis kaip 0,2 μm. Maišant ir centrifuguojant konteineriai turi būti uždengti dangčiais, kad būtų išvengta nuostolių dėl medžiagų lakumo ir vandens nugaravimo; adsorbcijai ant dangčių sumažinti turi būti naudojami dezaktyvuoti dangčiai, pvz., užsukami teflonu iškloti dangčiai;

d) neprivalomas: filtravimo įtaisas; filtrų poringumas – 0,2 μm, sterilūs, vienkartiniai. Ypatingą dėmesį reikia kreipti parenkant filtro medžiagą, kad būtų išvengta bet kokių bandomosios medžiagos nuostolių ant filtro; mažai tirpioms medžiagoms nerekomenduojama naudoti filtrų iš organinės medžiagos;

e) analizės aparatūra, tinkama bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatyti;

f) laboratorinė krosnis, kurioje galima palaikyti 103–110 °C temperatūrą.

1.7.2. **Dirvožemio tipo apibūdinimas ir parinkimas**

Dirvožemio tipą turėtų apibūdinti trys parametrai, kurie laikomi darančiais didžiausią įtaką adsorbcijos gebai: organinė anglis, molio kiekis ir dirvožemio struktūra bei pH. Kaip minėta (žr. skirsnį „Taikymo sritis“), konkrečios medžiagos adsorbcijai/desorbcijai įtakos gali turėti kitos fizikinės ir cheminės dirvožemio savybės, ir tokiais atvejais į jas turi būti atsižvelgta.

Metodai, taikyti dirvožemiui apibūdinti, yra labai svarbūs ir daro didelę įtaką rezultatams. Taigi atitinkamu ISO metodu (ISO-10390–1) rekomenduojama išmatuoti dirvožemio 0,01 M $CaCl_2$ tirpale (t. y. tirpale, naudojamame adsorbcijos/desorbcijos bandymuose) pH vertę. Taip pat rekomenduojama, kad standartiniais metodais (pvz., ISO „*Handbook of Soil Anglysis*“) būtų nustatytos kitos reikalingos dirvožemio savybės; tai leidžia sorbcijos duomenis analizuoti pagal visam pasauliui standartizuotus dirvožemio parametrus. Kai kurie duomenys apie esamus standartinius dirvožemio analizės ir apibūdinimo metodus pateikti nuorodose (50–52). Dirvožemio bandymo metodams kalibruoti rekomenduojama naudoti etaloninius dirvožemius.

Nurodymai, kaip parinkti dirvožemį adsorbcijos/desorbcijos bandymams, pateikti 1 lentelėje. Parinkti septyni dirvožemio tipai apima vidutinėse geografinėse zonose pasitaikančius dirvožemio tipus. Jei bandomosios medžiagos yra jonizuojamos, parinkti dirvožemio tipai turi apimti platų pH verčių intervalą, kad būtų galima įvertinti jonizuotos ir nejonizuotos medžiagos adsorbciją. Nurodymai, kiek skirtingų dirvožemio tipų naudoti įvairiose bandymo pakopose, pateikti 1.9 skirsnyje „Bandymo procedūra“.

Jei labiau tinka kitų tipų dirvožemis, jis turi būti apibūdintas tais pačiais parametrais ir jo savybės turi įvairuoti panašiai kaip 1 lentelėje aprašytos savybės, net jei tiksliai kriterijų ir neatitinka.

▼C1

1 lentelė

Nurodymai, kaip parinkti dirvožemio bandinius adsorbcijos ir desorbcijos bandymams

Dirvožemio tipas	pH intervalas (0,01 M $CaCl_2$)	Organinės anglies kiekis (%)	Molio kiekis (%)	Dirvožemio struktūra (1)
1	4,5– 5,5	1,0– 2,0	65–80	molis
2	> 7,5	3,5– 5,0	20–40	sunkus priemolis
3	5,5– 7,0	1,5– 3,0	15–25	dulkiškas priemolis
4	4,0– 5,5	3,0– 4,0	15–30	priemolis
5	< 4,0– 6,0 (2)	< 0,5– 1,5 (2) (3)	< 10–15 (2)	rišlus smėlis
6	> 7,0	< 0,5– 1,0 (2) (3)	40–65	sunkus priemolis/molis
7	< 4,5	> 10	< 10	smėlis/rišlus smėlis

(1) Pagal FAO (*Food and Agricultural Organization* – Maisto ir žemės ūkio organizacija) ir JAV sistemą (85).
(2) Būtų geriau, jei atitinkamų kintamųjų vertės būtų nurodytame intervale. Tačiau, jei kyla sunkumų rasti tinkamą dirvožemį, priimtinos mažesnės nei nurodytos mažiausios vertės.
(3) Dirvožemis, kuriame organinės anglies yra mažiau kaip 0,3 %, gali sutrikdyti koreliaciją tarp organinės anglies kiekio ir adsorbcijos. Taigi rekomenduojama naudoti dirvožemį, kuriame organinės anglies būtų ne mažiau kaip 0,3 %.

1.7.3. **Dirvožemio bandinių rinkimas ir laikymas**

1.7.3.1. *Rinkimas*

Specialių bandinių ėmimo metodų arba priemonių rekomenduoti negalima; bandinių ėmimo metodas priklauso nuo tyrimo tikslo (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Reikia atsižvelgti į šiuos dalykus:

a) būtina turėti išsamią informaciją apie lauko sklypo istoriją; informaciją sudaro vieta, augmenijos danga, apdorojimas pesticidais ir (ar) trąšomis, biologiniai priedai ar atsitiktinis užteršimas. Reikia laikytis dirvožemio bandinių ėmimo ISO standarto (ISO 10381–6) rekomendacijų atsižvelgiant į bandinio ėmimo vietos aprašymą;

b) bandinių ėmimo vieta turi būti apibrėžta UTM (*Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum* – Universalioji skersinė Merkatoriaus projekcija/Europos horizontalusis atskaitos lygis) ar geografinių koordinačių; tai leistų ateityje vėl paimti konkretų dirvožemį ar padėtų apibūdinti dirvožemį pagal įvairias klasifikavimo sistemas, taikomas skirtingose šalyse. Be to, reikia rinkti tik A horizonte, ne giliau kaip 20 cm. Jei konkrečiai 7 tipo dirvožemio dalį sudaro O_h horizontas, jis turi būti įtrauktas į bandinį.

Dirvožemio bandiniai turi būti gabenami konteineriuose esant tokiai temperatūrai, kuri garantuotų pradines dirvožemio savybes ir jų labai nepakeistų.

▼C1

1.7.3.2. *Laikymas*

Geriau naudoti ką tik iš lauko paimtą dirvožemį. Jei tai neįmanoma, išdžiovintas ore dirvožemis gali būti laikomas kambario temperatūros sąlygomis. Rekomendacijų apie laikymo trukmės ribas nepateikiama, tačiau daugiau kaip trejus metus laikytas dirvožemis prieš naudojant turi būti vėl analizuojamas organinės anglies kiekiui, pH ir katijonų mainų gebai (CEC) nustatyti.

1.7.3.3. *Dirvožemio bandinių apdorojimas ir paruošimas bandymui*

Dirvožemis džiovinamas ore kambario temperatūros sąlygomis (geriau 20–25 °C). Smulkinti reikia kuo mažesne jėga, kad pradinė dirvožemio sandara pasikeistų kuo mažiau. Dirvožemis sijojamas, kol lieka ≤ 2 mm dydžio dalelės; sijoj ant reikėtų laikytis ISO standarto dirvožemio bandinių ėmimo rekomendacijų (ISO 10381–6). Rekomenduojama dirvožemį kruopščiai homogenizuoti, nes tai pagerina rezultatų atkuriamumą. Kiekvieno dirvožemio bandinio drėgmės kiekis nustatomas tris alikvotines dalis kaitinant 105 °C temperatūroje tol, kol masė daugiau nesikeičia (maždaug 12 h). Visiems skaičiavimams nurodoma krosnyje išdžiovinto dirvožemio masė, t. y. dirvožemio, atėmus drėgmės kiekį, masė.

1.7.4. **Bandomosios medžiagos paruošimas maišymui su dirvožemiu**

Bandomoji medžiaga ištirpinama 0,01 M $CaCl_2$ tirpale, kuriam ruošti naudojamas distiliuotas ar dejonizuotas vanduo; kaip vandeninis tirpiklis $CaCl_2$ tirpalas yra naudojamas centrifugavimui palengvinti ir katijonų mainams kiek įmanoma sumažinti. Pradinio tirpalo koncentracija turi būti trimis dydžio eilėmis didesnė nei taikomo metodo aptikimo riba. Ši riba garantuoja tikslius matavimus taikant šį metodą; be to, pradinio tirpalo koncentracija turi būti mažesnė nei bandomosios medžiagos tirpumo vandenyje vertė.

Pradinį tirpalą geriau gaminti prieš pat maišymą su dirvožemio bandiniais, tirpalas turi būti uždengtas ir laikomas tamsoje esant 4 °C. Laikymo trukmė priklauso nuo bandomosios medžiagos stabilumo ir nuo tirpalo koncentracijos.

Atitinkama tirpinimo medžiaga gali būti reikalinga tik mažai tirpioms medžiagoms (S_w < 10–4 g 1–1), kai bandomąją medžiagą sunku ištirpinti. Ši tirpinimo medžiaga: a) turi maišytis su vandeniu, pvz., metanolis ar acetonitrilas; b) jo koncentracija neturi būti didesnė kaip 1 % bendrojo pradinio tirpalo tūrio ir turi būti mažesnė nei sąlytyje su dirvožemiu esančios bandomosios medžiagos koncentracija (geriau, jei mažesnė kaip 0,1 %); c) neturi būti veiklioji paviršiaus medžiaga arba dalyvauti solvolizės reakcijoje su bandomąja medžiaga. Duomenų ataskaitoje turi būti nurodytas ir pagrįstas tokios tirpinimo medžiagos naudojimas.

Kitas mažai tirpioms medžiagoms taikomas būdas yra pridėti bandomosios medžiagos į bandymo sistemą naudojant pagalbinį tirpiklį: bandomoji medžiaga ištirpinama organiniame tirpiklyje, alikvotinė šio tirpalo dalis pridedama į dirvožemio ir 0,01 M $CaCl_2$ tirpalo distiliuotame ar dejonizuotame vandenyje sistemą. Organinio tirpiklio kiekis vandeninėje fazėje turi būti kuo mažesnis, paprastai ne didesnis kaip 0,1 %. Medžiagos pridėjimas naudojant tirpalą organiniame tirpiklyje gali pabloginti tūrio atkuriamumą. Taigi gali atsirasti papildoma paklaida, nes bandomosios medžiagos ir pagalbinio tirpiklio koncentracija visuose bandymuose gali būti nevienoda.

▼C1

1.8. ADSORBCIJOS/DESORBCIJOS BANDYMO BŪTINOSIOS SĄLYGOS

1.8.1. **Analizės metodas**

Pagrindiniai parametrai, galintys turėti įtakos sorbcijos matavimams, yra tirpalui ir adsorbuotoms fazėms analizuoti taikomo analizės metodo tikslumas, bandomosios medžiagos stabilumas ir grynumas, sorbcijos pusiausvyros pasiekimas, tirpalo koncentracijos pokyčio dydis, dirvožemio/tirpalo santykis ir dirvožemio struktūros pokyčiai nusistovint pusiausvyrai (35) (59–62). Keletas pavyzdžių, susijusių su tikslumo problemomis, pateikta 2 priedėlyje.

Taikomo analizės metodo patikimumas turi būti patikrintas pagal koncentracijų intervalą, kuris greičiausiai bus taikomas atliekant bandymą. Bandytojas gali laisvai tobulinti atitinkamą metodą, turintį reikiamą tikslumą, preciziškumą, atkuriamumą, aptikimo ribas ir regeneravimo lygį. Toliau pateikti nurodymai, kaip tokį bandymą atlikti.

Atitinkamas 0,01 M $CaCl_2$ tirpalo tūris, pvz., 100 cm^3, 4 h purtomas su tam tikra labai adsorbuojančio, t. y. turinčio didelį organinės anglies ir molio kiekį, dirvožemio mase, pvz., 20 g; ši masė ir tūris gali skirtis priklausomai nuo analizės poreikių, tačiau dirvožemio/tirpalo santykis 1:5 yra patogus pradžios taškas. Mišinys centrifuguojamas ir vandeninė fazė gali būti filtruojama. Į vandeninę fazę įpilamas tam tikras tūris bandomosios medžiagos pradinio tirpalo vardinei koncentracijai pasiekti koncentracijos intervale, kuris greičiausiai bus taikomas atliekant bandymą. Šis tūris turi sudaryti ne daugiau kaip 10 % galutinio vandeninės fazės tūrio, kad kuo mažiau pasikeistų pradinio pusiausvyros nusistovėjimo tirpalo savybės. Tirpalas analizuojamas.

Norint patikrinti analizės metodo artefaktus ir dėl dirvožemio atsiradusius matricos efektus, turi būti įtrauktas vienas tuščiasis bandinys, kurį sudaro sistema dirvožemis + $CaCl_2$ tirpalas (be bandomosios medžiagos).

Analizės metodus, kurie gali būti taikomi sorbcijai matuoti, sudaro dujų ir skysčių chromatografija (*Gas-Liquid Chromatography*, GLC), didelio efektyvumo skysčių chromatografija (*high-performance liquid chromatography*, UPLC), spektrometrija (pvz., GC/masių spektrometrija, HPLC/masių spektrometrija) ir skysčių scintiliacijos skaičiavimas (medžiagų su žymėtaisiais atomais). Nesvarbu, koks analizės metodas taikomas, tinkamu laikomas regeneravimo lygis, kuris sudaro 90–110 % vardinės vertės. Norint medžiagą aptikti ir įvertinti po įvykdyto atskyrimo, analizės metodo aptikimo riba turi būti bent dviem dydžio eilėmis mažesnė nei vardinė koncentracija.

Adsorbcijos tyrimams taikomo analizės metodo charakteristikos ir aptikimo riba yra labai svarbios apibrėžiant bandymo sąlygas ir gautus tyrimų rezultatus. Šis metodas nekeičia bendrosios bandymo procedūros ir numato alternatyvius sprendimus, jei galimybes riboja analizės metodas ir laboratorijos įranga.

▼C1

1.8.2. **Optimalaus dirvožemio/tirpalo santykio parinkimas**

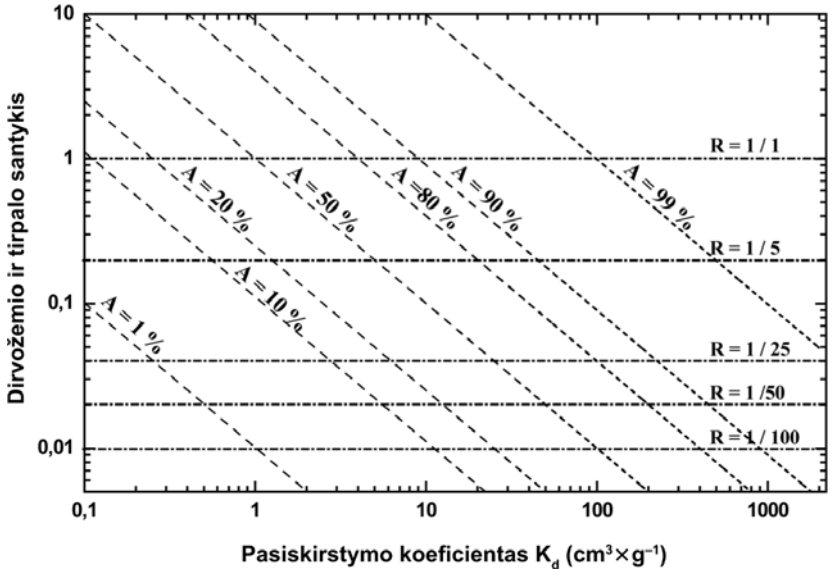
Tinkamo dirvožemio ir tirpalo santykio parinkimas sorbcijos tyrimams priklauso nuo pasiskirstymo koeficiento K_d ir nuo pageidaujamo santykinio adsorbcijos laipsnio. Matavimo, pagrįsto adsorbcijos lygties forma ir analizės metodo riba, statistinį tikslumą nustatant medžiagos tirpalo koncentraciją lemia šios koncentracijos pokytis. Taigi naudinga pasirinkti kelias pastovias santykio vertes, kurioms adsorbuotos medžiagos procentinė dalis yra didesnė kaip 20 %, geriau > 50 % (62), ir pasirūpinti, kad bandomosios medžiagos tirpalo koncentracija norint ją tiksliai nustatyti būtų pakankamai didelė. Tai ypač svarbu, kai yra didelė adsorbcijos procentinė dalis.

Patogus būdas parinkti tinkamą dirvožemio/vandens santykį pagrįstas K_d vertės įverčiu darant išankstinius tyrimus arba taikant sukurtus vertinimo metodus (3 priedėlis). Tinkamą santykį galima pasirinkti pagal dirvožemio/tirpalo santykio ir K_d grafiką nustatytai adsorbcijos procentinei daliai (1 pav.). Šiam grafikui nubrėžti daroma prielaida, kad adsorbcijos lygtis yra tiesiška ([1]). Tinkamas sąryšis gaunamas K_d (4) lygtį pertvarkant į (1) lygtį:

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

ar į jos logaritminę išraišką, darant prielaidą, kad $R = m_{soil}/V_0$ and $A_{eq}\%/100 = \left(\frac{(m_s^{ads}(eq))}{(m_0)}\right)$:

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



1 pvz., Dirvožemio/tirpalo santykio ir K_d sąryšis esant įvairioms adsorbuotos medžiagos procentinėms dalims

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

▼C1

1 pvz., reikiamas dirvožemio/tirpalo santykis pateiktas kaip K_d funkcija esant įvairiems adsorbcijos lygiams. Pvz., jei dirvožemio/tirpalo santykis yra 1:5 ir K_d 20, adsorbcijos laipsnis maždaug 80 %. 50 % adsorbcijai gauti esant tam pačiam K_d turi būti taikomas santykis 1:25. Šis tinkamo dirvožemio/tirpalo santykio pasirinkimo būdas leidžia bandytojui lanksčiai prisitaikyti prie bandymo poreikių.

Sunkiau yra panaudoti tas sritis, kuriose medžiaga adsorbuojama labai stipriai arba labai silpnai. Jei adsorbcija vyksta silpnai, rekomenduojamas 1:1 dirvožemio/tirpalo santykis, nors kai kuriems dirvožemiams su dideliu organinės medžiagos kiekiu šį santykį būtina padidinti norint gauti suspensiją. Reikia pasirūpinti analizės metodu mažiems tirpalo koncentracijos pokyčiams matuoti; kitaip adsorbcijos matavimas bus netikslus. Kita vertus, esant labai dideliems pasiskirstymo koeficientams K_d, dirvožemio/tirpalo santykį galima mažinti iki 1:100, kad cheminės medžiagos tirpale liktų daug. Tačiau reikia stengtis gerai sumaišyti ir būtina duoti pakankamai laiko sistemai pasiekti pusiausvyrą. Alternatyvus šių ribinių atvejų naudojimo būdas, kai nėra tinkamo analizės metodo, yra K_d vertės prognozė taikant vertinimo metodikas, pagrįstas, pvz, P_{ow} vertėmis (3 priedėlis). Tai gali būti naudinga ypač silpnai adsorbuojamoms ar polinėms medžiagoms, kurių $P_{ow} < 20$, ir lipofilinėms ar stipriai sorbuojamoms cheminėms medžiagoms, kurių $P_{ow} > 10^4$.

1.9. BANDYMO PROCEDŪRA

1.9.1. **Bandymo sąlygos**

Visi bandymai atliekami aplinkos temperatūros ir, jei įmanoma, pastovios temperatūros nuo 20 °C iki 25 °C sąlygomis.

Centrifugavimo sąlygos turi būti tokios, kad būtų galima pašalinti iš tirpalo didesnes kaip 0,2 μm daleles. Ši vertė atitinka mažiausią dydį, iki kurio dalelė dar laikoma kietąja dalele, ir tai yra riba tarp kietųjų ir koloidinių dalelių. Kaip nustatyti centrifugavimo sąlygas, nurodyta 4 priedėlyje.

Jei negalima garantuoti, kad centrifugavimo priemonės pašalins didesnes kaip 0,2 μm daleles, būtų galima taikyti centrifugavimo ir filtravimo pro 0,2 μm filtrus derinį. Norint išvengti ant filtrų bet kokių bandomosios medžiagos nuostolių, indai turi būti pagaminti iš tinkamos inertinės medžiagos. Bet kuriuo atveju turi būti įrodyta, kad filtruojant nepatiriama jokių bandomosios medžiagos nuostolių.

1.9.2. **1 tarpsnis. Pradinis tyrimas**

Pradinio tyrimo vykdymo tikslas jau buvo nurodytas skirsnyje „Taikymo sritis“. Toliau pateikiamos rekomendacijos, kaip atlikti tokį bandymą.

1.9.2.1. *Optimalaus dirvožemio/tirpalo santykio verčių parinkimas*

Naudojami du dirvožemio tipai ir trys dirvožemio/tirpalo santykio vertės (šeši bandymai). Vieno tipo dirvožemyje yra didelis organinės anglies ir mažas molio kiekis, kito tipo dirvožemyje – mažas organinės anglies ir didelis molio kiekis. Siūloma naudoti tokius dirvožemio ir tirpalo santykius:

— 50 g dirvožemio 50 cm^3 bandomosios medžiagos vandeninio tirpalo (santykis 1/1),

▼C1

— 10 g dirvožemio ir 50 cm^3 bandomosios medžiagos vandeninio tirpalo (santykis 1/5),

— 2 g dirvožemio ir 50 cm^3 bandomosios medžiagos vandeninio tirpalo (santykis 1/25).

Mažiausias dirvožemio kiekis, su kuriuo gali būti atliekamas bandymas, priklauso nuo laboratorijos įrangos ir taikomų analizės metodų charakteristikų. Tačiau norint gauti patikimus bandymo rezultatus, rekomenduojama naudoti bent 1 g, o geriau 2 g dirvožemio.

Bandomosios medžiagos stabilumui $CaCl_2$ tirpale ir jos galimai adsorbcijai ant bandymo indų paviršių patikrinti vienas kontrolinis bandinys, kurį sudaro 0,01 M $CaCl_2$ tirpale ištirpinta bandomoji medžiaga (be dirvožemio), pereina tiksliai tas pačias pakopas kaip ir bandomosios sistemos.

Tuščiasis bandinys kiekvienam dirvožemiui su tuo pačiu dirvožemio kiekiu ir bendru 50 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ tirpalo tūriu (be bandomosios medžiagos) bandomas pagal tą pačią bandymo metodiką. Atliekant analizę šis bandinys yra fono kontrolės priemonė trukdančioms medžiagoms ar užterštiems dirvožemiams aptikti.

Visi bandymai, įskaitant kontrolinius ir tuščiuosius, turi būti atliekami bent po du kartus. Bendras tyrimui paruoštų bandinių skaičius gali būti apskaičiuotas atsižvelgiant į taikomą metodą.

Pradinio tyrimo ir pagrindinio tyrimo metodai paprastai yra tie patys, būtinos daryti išimtys nurodomos.

Pusiausvyrai pasiekti ore išdžiovinti dirvožemio bandiniai sumaišomi su ne mažesnio kaip 45 cm^3 tūrio 0,01 M $CaCl_2$ tirpalu ir mišinys purtomas per naktį (12 h) prieš bandymo dieną. Po to galutiniam 50 cm^3 tūriui gauti įpilamas tam tikras tūris bandomosios medžiagos pradinio tirpalo. Šis įpilamo pradinio tirpalo tūris: a) neturi sudaryti daugiau kaip 10 % galutinio 50 cm^3 vandeninės fazės tūrio, kad kuo mažiau pasikeistų pradinei pusiausvyrai nusistovėti naudoto tirpalo savybės; b) būtų toks, kad sąlytyje su dirvožemiu esančio bandomosios medžiagos pradinio tirpalo koncentracija (C_0) būtų bent dviem dydžio eilėmis didesnė nei analizės metodo aptikimo ribos vertė; šis ribinis dydis leidžia daryti tikslius matavimus esant didelio laipsnio adsorbcijai (> 90 %) ir vėliau apskaičiuoti adsorbcijos izotermes. Be to, rekomenduojama, kad pradinė medžiagos koncentracija (C_0), jei tai įmanoma, būtų ne didesnė kaip pusė tirpumo vertės.

Toliau pateikiamas pavyzdys, kaip apskaičiuoti pradinio tirpalo koncentraciją (C_{st}). Tarkime, kad aptikimo riba yra 0,01 μg cm^{-3} ir adsorbcijos laipsnis 90 %; taigi sąlytyje su dirvožemiu esančios bandomosios medžiagos pradinė koncentracija turi būti 1 μg cm^{-3} (dviem dydžio eilėmis didesnė kaip aptikimo ribos vertė). Darant prielaidą, kad įpilamo pradinio tirpalo tūris yra didžiausias, koks buvo rekomenduotas, t. y. 5 cm^3 į 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ pusiausvyros nusistovėjimo tirpalo (pradinis tirpalas sudaro 10 % 50 cm^3 bendrojo vandeninės fazės tūrio), pradinio tirpalo koncentracija turi būti 10 μg cm^{-3}; ji yra trimis dydžio eilėmis didesnė kaip analizės metodo aptikimo ribinė vertė.

Vandeninės fazės pH vertė turi būti matuojama prieš sąlytį su dirvožemiu ir po jo, kadangi jos vaidmuo visame adsorbcijos procese yra svarbus, ypač jei tai jonizuojamosios medžiagos.

▼C1

Mišinys purtomas tol, kol pasiekiama adsorbcijos pusiausvyra. Pusiausvyros nusistovėjimo trukmė dirvožemiams yra labai nevienoda, atsižvelgiant į cheminę medžiagą ir dirvožemį; paprastai pakanka 24 h (77). Darant pradinį tyrimą, bandinius 48 h maišymo laikotarpiu galima imti nuosekliai (pvz., 4, 8, 24, 48 h). Tačiau rinktis analizės laiką reikėtų lanksčiai ir atsižvelgus į laboratorijos darbo grafiką.

Yra du būdai bandomosios medžiagos vandeniniam tirpalui analizuoti: a) lygiagretusis metodas ir b) nuoseklusis metodas. Pabrėžtina, kad, nors eksperimentinio darbo lygiagrečiuoju metodu yra daugiau, matematinis rezultatų apdorojimas yra paprastesnis (5 priedėlis). Tačiau metodą pasirinkti leidžiama pačiam bandytojui, kuris turės atsižvelgti į laboratorijos įrangą ir lėšas.

(a) Lygiagretusis metodas: paruošiami bandiniai su vienodu dirvožemio/tirpalo santykiu, bandinių reikia tiek, kiek laiko tarpų pasirinkta adsorbcijos kinetikai tirti. Po centrifugavimo ir, jei pageidaujama, filtravimo vandeninė fazė kiek įmanoma visa regeneruojama ir analizuojama, pvz., pirmojo mėgintuvėlio po 4 h, antrojo mėgintuvėlio – po 8 h, trečiojo mėgintuvėlio – po 24, ir t. t.

(b) Nuoseklusis metodas: kiekvienam dirvožemio/tirpalo santykiui paruošiama tik po du bandinius. Nustatytais laiko tarpais mišinys centrifuguojamas fazėms atskirti. Maža alikvotinė tirpalo dalis tuojau pat analizuojama bandomajai medžiagai nustatyti; bandymas tęsiamas su pradiniu mišiniu. Jei po centrifugavimo taikomas filtravimas, laboratorijoje turi būti priemonių mažiems alikvotinių dalių tūriams filtruoti. Rekomenduojama bendrą alikvotinių dalių tūrį imti ne didesnį kaip 1 % bendrojo tirpalo tūrio, kad atliekant bandymą labai nepakistų dirvožemio/tirpalo santykis ir nesumažėtų adsorbuojamos medžiagos masė.

Pagal vardinę pradinę koncentraciją ir bandinio ėmimo momentui (t_i) išmatuotą koncentraciją, pataisytą tuščiojo bandymo verte, kiekvienam laiko momentui (t_i) apskaičiuojama adsorbcijos (A_{t_i}) procentinė dalis. Braižomi (A_{t_i}) kitimo laike grafikai (5 priedėlis, 1 pav.), kad būtų galima nustatyti, ar jau pasiekta pusiausvyros horizontalioji kreivės dalis [1] Bandomosios medžiagos vandeninės fazės koncentracijos kitimo laike grafikai taip pat gali būti panaudoti nustatant, ar pasiekta pusiausvyros horizontalioji kreivės dalis (žr. 5 priedėlis, 2 pav.). Taip pat apskaičiuojama K_d vertė pusiausvyros sąlygomis. Pagal šią K_d vertę 1 pvz., pasirenkamas tinkamas dirvožemio/tirpalo santykis, kad adsorbcijos procentinė dalis būtų didesnė kaip 20 %, o geriau, jei > 50 % (61). Visos taikomos lygtys ir grafikų sudarymo principai pateikti skirsnyje „Duomenys ir ataskaita“ ir 5 priedėlyje.

1.9.2.2. *Adsorbcijos pusiausvyros nusistovėjimo trukmės ir pusiausvyros sąlygomis adsorbuotos medžiagos kiekio nustatymas*

Kaip jau sakyta, (A_{t_i}) ar (C_{aq}^{ads}) kitimo laike grafikai leidžia įvertinti, ar pasiekta adsorbcijos pusiausvyra ir koks yra pusiausvyros sąlygomis adsorbuotos bandomosios medžiagos kiekis. Tokių grafikų pavyzdžiai pateikti 5 priedėlio 1 ir 2 paveiksluose. Pusiausvyros nusistovėjimo trukmė – tai laikas, per kurį sistema pasiekia kreivės horizontaliąją dalį.

[1] Bandomosios medžiagos vandeninės fazės koncentracijos ((C_{aq}^{ads}) kitimo laike grafikai taip pat gali būti panaudoti nustatant, ar pasiekta pusiausvyros horizontalioji kreivės dalis (žr. 5 priedo 2 pav.).

▼C1

Jei konkrečiai medžiagai kreivės lygiagrečioji dalis nepasiekiama, bet adsorbcija visą laiką didėja, gali būti padėtį sunkinančių veiksnių, pvz., biologinis skaidymas ar lėta difuzija. Biologinį skaidymą galima įrodyti bandymą pakartojant su steriliu dirvožemio bandiniu. Jei ir dabar lygiagrečios kreivės dalies nėra, bandytojas turi ieškoti kitų reiškinių, trukdančių vykdyti specifinį tyrimą; tai galima padaryti atitinkamai pakeitus bandymo sąlygas (temperatūrą, purtymo trukmę, dirvožemio/tirpalo santykį). Bandytojas pats turi spręsti, ar tęsti bandymą, nepaisant to, kad gali ir nepavykti pasiekti pusiausvyrą.

1.9.2.3. *Adsorbcija ant bandymo indų paviršiaus ir bandomosios medžiagos stabilumas*

Tam tikros informacijos apie bandomosios medžiagos adsorbciją ant bandymo indų paviršiaus, taip pat apie jos stabilumą galima gauti analizuojant kontrolinius bandinius. Jei pastebimas medžiagos išeikvojimas yra didesnis nei analizės metodo standartinė paklaida, gali vykti abiotinis skaidymas ir (ar) adsorbcija ant bandymo indų paviršiaus. Šiuos du reiškinius galima atskirti, jei indų sienelės gerai nuplaunamos žinomu kiekiu atitinkamo tirpiklio ir plovimui naudotas tirpalas analizuojamas ieškant bandomosios medžiagos. Jei adsorbcija ant indų paviršiaus nevyksta, medžiagos išeikvojimas rodo abiotinį bandomosios medžiagos nestabilumą. Jei adsorbcija įrodoma, būtina keisti medžiagas, iš kurių pagaminti bandymo indai. Tačiau šiuo bandymu surinkti duomenys apie adsorbciją ant bandymo indų sienelių negali būti tiesiogiai ekstrapoliuoti dirvožemio/tirpalo bandymui. Šiai adsorbcijai įtakos gali turėti dirvožemis.

Papildomos informacijos apie bandomosios medžiagos stabilumą galima gauti nustatant pradinės medžiagos masės balansą per tam tikrą laiką. Tokiu atveju atliekama vandeninės fazės, dirvožemio ekstraktų ir bandymo indų sienelių analizė ieškant bandomosios medžiagos. Skirtumas tarp pridėtos bandomosios medžiagos masės ir bandomosios medžiagos vandeninėje fazėje, ekstraktuose ir ant bandymo indų sienelių masių sumos yra lygus masei medžiagos, kuri buvo suardyta ir (ar) išgaravo, ir (ar) nebuvo ekstrahuota. Norint nustatyti masių balansą, atliekant bandymą turi būti pasiekta adsorbcijos pusiausvyra.

Masių balansas daromas dviem dirvožemiams ir kiekvieno dirvožemio vienam dirvožemio/tirpalo santykiui, kuriam pusiausvyros sąlygomis gaunamas didesnis kaip 20 %, o geriau > 50 % išeikvojimas. Baigus santykio nustatymo bandymą, kai po 48 h atliekama paskutinė vandeninės fazės bandinio analizė, fazės yra atskiriamos centrifugavimu ir, jei pageidaujama, filtravimu. Vandeninė fazė regeneruojama kuo didesniu laipsniu, paskui bandomajai medžiagai iš dirvožemio ekstrahuoti į jį įpilama tinkamo ekstrahavimo tirpiklio (ekstrahavimo faktorius bent 95 %). Rekomenduojama nuosekliai ekstrahuoti bent du kartus. Nustatomas medžiagos kiekis dirvožemio ir bandymo indų ekstraktuose ir apskaičiuojamas masių balansas (10 lygtis, „Duomenys ir ataskaita“). Jei jis yra mažesnis kaip 90 %, laikoma, kad bandomoji medžiaga bandymo metu yra nestabili. Tačiau tyrimus galima tęsti toliau, atsižvelgiant į bandomosios medžiagos nestabilumą; šiuo atveju rekomenduojama darant pagrindinį tyrimą analizuoti abi fazes.

▼C1

1.9.3. *2 tarpsnis. Adsorbcijos kinetika vienai bandomosios medžiagos koncentracijai*

Naudojamas iš 1 lentelės pasirinktų penkių tipų dirvožemis. Jei tinka, tarp šių penkių tipų naudinga turėti kai kuriuos dirvožemio tipus, naudotus darant pradinį tyrimą. Tuomet pradiniam tyrimui naudotiems dirvožemio tipams 2 tarpsnio bandymų atlikti nereikia.

Pusiausvyros nusistovėjimo trukmė, dirvožemio/tirpalo santykis, dirvožemio bandinio masė, sąlytyje su dirvožemiu esančios vandeninės fazės tūris ir bandomosios medžiagos tirpalo koncentracija pasirenkami pagal pradinio tyrimo rezultatus. Analizę būtų geriau atlikti maždaug po 2, 4, 6, 8 (galbūt dar po 10 h) ir po 24 h sąlyčio; maišymo trukmė gali būti padidinta ne daugiau kaip iki 48 h, jei cheminei medžiagai pagal santykio nustatymo rezultatus reikalinga didesnė pusiausvyros nusistovėjimo trukmė. Tačiau analizės laiką reikėtų rinktis lanksčiai.

Kiekvienas bandymas (vienas dirvožemis ir vienas tirpalas) atliekamas bent du kartus, kad būtų galima įvertinti rezultatų sklaidą. Atliekant kiekvieną bandymą imamas tuščiasis bandinys. Jį sudaro dirvožemis ir 0,01 M $CaCl_2$ tirpalas be bandomosios medžiagos, kurių masė ir tūris yra atitinkamai tokie pat kaip ir bandinio su bandomąja medžiaga. Norint išvengti netikėtumų, pagal tą pačią bandymo metodiką tiriamas kontrolinis bandinys tik su bandomąja medžiaga, ištirpinta 0,01 M $CaCl_2$ tirpale (be dirvožemio).

Adsorbcijos procentinė dalis apskaičiuojama kiekvienam laiko momentui (A_{t_i}) ir (ar) laiko tarpui ($A_{\Delta t_i}$) (pagal poreikį) ir pateikiamas adsorbcijos kitimo laike grafikas. Apskaičiuojamas pasiskirstymo koeficientas K_d pusiausvyros sąlygomis, taip pat pagal organinę anglį normalizuotas adsorbcijos koeficientas K_{oc} (nepolinių organinių medžiagų).

Adsorbcijos kinetikos bandymo rezultatai

Tiesinė K_d vertė paprastai tiksliai aprašo dirvožemio sorbcinę elgseną (35) (78) ir yra cheminių medžiagų būdingo judrumo dirvožemyje išraiška. Pvz., paprastai cheminės medžiagos, kurių $K_d \leq 1$ cm^3 g^{-1}, kokybiškai laikomos judriomis. Panašiai MacCall *et al*. (16) buvo sukurta judrumo klasifikavimo schema, pagrįsta K_{oc} vertėmis. Be to, yra išplovimo klasifikavimo schemos, pagrįstos K_{oc} ir DT-50 [1] santykiu (32) (79).

Pagal paklaidų analizės tyrimus (61) mažesnės kaip 0,3 cm^3 g^{-1} K_d vertės negali būti tiksliai įvertintos pagal vandeninės fazės koncentracijos mažėjimą, netgi taikant palankiausią (tikslumo požiūriu) dirvožemio/tirpalo santykį, t. y. 1:1. Šiuo atveju rekomenduojama analizuoti abi fazes, dirvožemį ir tirpalą.

[1] DT-50: laikas, per kurį suskaidoma 50 % bandomosios medžiagos.

▼C1

Atsižvelgiant į šias pastabas, rekomenduojama tęsti adsorbcinį cheminės medžiagos dirvoje elgsenos ir jos potencialaus judrumo tyrimą nustatant Freundlicho adsorbcijos izotermes toms sistemoms, kurioms pagal šio metodo aprašymą galima tiksliai nustatyti K_d vertes. Tiksliai nustatyti galima, jei K_d ir dirvožemio/tirpalo santykio sandaugos vertė yra > 0,3 matuojant vandeninės fazės koncentracijos mažėjimą (netiesioginis metodas) ar > 0,1, kai analizuojamos abi fazės (tiesioginis metodas) (61).

1.9.4. *3 tarpsnis. Adsorbcijos izotermės ir desorbcijos kinetika/desorbcijos izotermės*

1.9.4.1. Adsorbcijos izotermės

Taikomos penkio[2]s bandomosios medžiagos koncentracijos, ir būtų gerai, jei jų vertė apimtų dvi dydžio eiles; pasirenkant šias koncentracijas reikia atsižvelgti į tirpumą vandenyje ir gaunamą vandeninės fazės pusiausvyros koncentraciją. Tas pats dirvožemio/tirpalo santykis turi būti taikomas per visą tyrimą. Adsorbcijos bandymas atliekamas taip, kaip aprašyta pirmiau, skirtumas tik toks, kad vandeninė fazė analizuojama vieną kartą pusiausvyros nusistovėjimo momentu, nustatytu pagal 2 tarpsnio rezultatus. Nustatoma tirpalų pusiausvyros koncentracija ir pagal medžiagos kiekio tirpale sumažėjimą arba tiesioginiu metodu apskaičiuojamas adsorbuotos medžiagos kiekis. Adsorbuotos medžiagos masė, tenkanti dirvožemio masės vienetui, grafiškai pateikiama kaip bandomosios medžiagos pusiausvyros koncentracijos funkcija (žr. „Duomenys ir ataskaita“).

Bandymo adsorbcijos izotermei gauti rezultatai

Iš ligi šiol pasiūlytų matematinių adsorbcijos modelių dažniausiai adsorbcijos procesams apibūdinti taikoma Freundlicho izotermė. Smulkesnė informacija aiškinant adsorbcijos modelius ir jų svarbą pateikta nuorodose (41) (45) (80) (81) (82).

Pastaba. Reikėtų paminėti, kad skirtingų medžiagų K_F (Freundlicho adsorbcijos koeficiento) vertes galima lyginti, jei šios K_F vertės yra išreikštos tais pačiais vienetais (83).

1.9.4.2. Desorbcijos kinetika

Šio bandymo tikslas yra ištirti, ar cheminę medžiagą dirvožemis adsorbuoja grįžtamai ar negrįžtamai. Ši informacija yra svarbi, kadangi, cheminei medžiagai esant lauko dirvožemyje, desorbcijos procesas taip pat vaidina svarbų vaidmenį. Be to, desorbcijos duomenys yra naudingi kaip įvesties duomenys kompiuteriu modeliuojant išplovimą ir ištirpusių medžiagų nuotėkį. Jei norima vykdyti desorbcijos tyrimą, rekomenduojama, kad kiekvienai sistemai, kuriai ankstesniame adsorbcijos kinetikos bandyme buvo galima tiksliai nustatyti K_d, būtų daromas toliau aprašytas tyrimas.

Panašiai kaip darant adsorbcijos kinetikos tyrimą, yra du desorbcijos kinetikos bandymo metodai: a) lygiagretusis metodas ir b) nuoseklusis metodas. Pasirinkti metodą leidžiama bandytojui, kuris turi atsižvelgti į laboratorijos įrangą ir lėšas.

▼C1

(a) Lygiagretusis metodas: kiekvienam desorbcijai tirti pasirinktam dirvožemio tipui paruošiami bandiniai, kurių dirvožemio/tirpalo santykis būtų vienodas ir kurių būtų tiek, kiek laiko tarpų pasirinkta desorbcijos kinetikai tirti. Geriau naudoti laiko tarpus, pasirinktus adsorbcijos kinetikai tirti; tačiau bendras laikas gali būti atitinkamai padidintas, kad sistema galėtų pasiekti desorbcijos pusiausvyrą. Atliekant kiekvieną bandymą (vienas dirvožemis, vienas tirpalas) imamas vienas tuščiasis bandinys. Jį sudaro dirvožemis ir 0,01 M $CaCl_2$ tirpalas be bandomosios medžiagos, kurių masė ir tūris atitinkamai yra tokie pat kaip ir bandinio su bandomąja medžiaga. Pagal tą pačią bandymo metodiką tiriamas kontrolinis bandinys tik su bandomąja medžiaga, ištirpinta 0,01 M $CaCl_2$ tirpale (be dirvožemio). Visi dirvožemio ir tirpalo mišiniai purtomi, kol pasiekiama adsorbcijos pusiausvyra (kaip nustatyta pirmiau pagal 2 tarpsnį). Toliau fazės atskiriamos centrifugavimu ir vandeninės fazės yra kuo daugiau pašalinamos. Pašalinti tirpalai pakeičiami tokiu pat tūriu 0,01 M $CaCl_2$ tirpalo be bandomosios medžiagos ir nauji mišiniai vėl purtomi. Pirmojo mėgintuvėlio vandeninė fazė kuo geriau regeneruojama ir analizuojama, pvz., po 2 h, antrojo mėgintuvėlio – po 4 h, trečiojo mėgintuvėlio – po 6 h ir t. t., kol pasiekiama desorbcijos pusiausvyra.

(b) Nuoseklusis metodas: baigus adsorbcijos kinetikos bandymą, mišinys centrifuguojamas ir vandeninė fazė kiek įmanoma daugiau pašalinama. Pašalintas tirpalas pakeičiamas tokiu pat tūriu 0,01 M $CaCl_2$ tirpalo be bandomosios medžiagos. Naujas mišinys purtomas tol, kol pasiekiama desorbcijos pusiausvyra. Per tą laiką tam tikrais laiko tarpais mišinys yra centrifuguojamas fazėms atskirti. Maža alikvotinė tirpalo dalis tuojau pat analizuojama bandomajai medžiagai nustatyti; toliau bandymas tęsiamas su pradiniu mišiniu. Kiekvienos atskiros alikvotinės dalies tūris turi sudaryti mažiau kaip 1 % bendro tūrio. Dirvožemio ir tirpalo santykiui palaikyti įpilamas toks pat kiekis šviežio 0,01 M $CaCl_2$ tirpalo ir purtoma iki kito laiko tarpo.

Apskaičiuojama desorbcijos procentinė dalis kiekvienam laiko momentui (D_{t_i}) ir (ar) laiko tarpui ($D_{\Delta t_i}$) (pagal tyrimo poreikius) ir braižomas kitimo laike grafikas. Taip pat apskaičiuojamas desorbcijos koeficientas K_{des} pusiausvyros sąlygomis. Visos taikomos lygtys pateiktos skirsnyje „Duomenys ir ataskaita“ ir 5 priedėlyje.

Desorbcijos kinetikos bandymo rezultatai

Bendri desorbcijos procentinės dalies (D_{t_i}) ir adsorbcijos (A_{t_i}) kitimo laike grafikai leidžia įvertinti adsorbcijos proceso grįžtamumą. Adsorbcija laikoma grįžtama, jei laikas desorbcijos pusiausvyrai pasiekti yra trumpesnis nei dvigubas laikas adsorbcijos pusiausvyrai pasiekti ir bendra desorbcija sudaro daugiau kaip 75 % adsorbuoto kiekio.

1.9.4.3. Desorbcijos izotermės

Freundlicho desorbcijos izotermės apskaičiuojamos dirvožemiams, kuriems buvo apskaičiuojamos adsorbcijos izotermės. Desorbcijos bandymas atliekamas, kaip aprašyta skirsnyje „Desorbcijos kinetika“, išskyrus tai, kad vandeninė fazė analizuojama tik vieną kartą, kai nusistovi desorbcijos pusiausvyra. Apskaičiuojamas desorbuotos bandomosios medžiagos kiekis. Desorbcijos pusiausvyros sąlygomis likęs dirvožemiu adsorbuotos bandomosios medžiagos kiekis grafiškai pateikiamas kaip bandomosios medžiagos tirpalo pusiausvyros koncentracijos funkcija (žr. „Duomenys ir ataskaita“ ir 5 priedėlį).

▼C1

2. **DUOMENYS IR ATASKAITA**

Analizės duomenys pateikiami lentelėse (žr. 6 priedėlį). Pateikiami atskiri matavimai ir apskaičiuotos vidutinės vertės. Adsorbcijos izotermės pateikiamos grafiškai. Apskaičiavimai daromi, kaip nurodyta toliau.

Atliekant šį bandymą laikoma, kad 1 cm^3 vandeninio tirpalo masė yra 1 g. Dirvožemio/tirpalo santykis gali būti išreikštas m/m ar m/v, skaitmeninė šių dydžių vertė yra vienoda.

2.1. ADSORBCIJA

Adsorbcija (A_{t_i}) yra apibrėžiama bandymo sąlygomis dirvožemiu adsorbuotos medžiagos procentine dalimi nuo jos kiekio bandymo pradžioje. Jei bandomoji medžiaga yra stabili ir indo sienelės jos žymiai neadsorbuoja, (A_{t_i}) kiekvienu laiko momentu t_i apskaičiuojama pagal lygtį:

$$A_{t_i} = \left(\frac{(m_s^{ads}(t_i) \cdot 100)}{(m_0)}\right)(\%) \qquad (3)$$

čia:

(A_{ti}) = adsorbcijos procentinė dalis laiko momentu t_i (%),

$m_s^{ads}(t_i)$ = laiku t_i dirvožemiu adsorbuotos bandomosios medžiagos masė (μg),

m_0 = bandymo pradžioje mėgintuvėlyje esančios bandomosios medžiagos masė (μg).

Informacija, kaip apskaičiuoti adsorbciją (A_{t_i}) lygiagrečiuoju ir nuosekliuoju metodu, išsamiai aprašyta 5 priedėlyje.

Pasiskirstymo koeficientas K_d yra medžiagos kiekio dirvožemio fazėje ir vandeninio tirpalo masės koncentracijos santykis bandymo sąlygomis, pasiekus adsorbcijos pusiausvyrą.

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

čia:

$(C_s{}^{ads}(eq))$ = dirvožemiu adsorbuotos medžiagos kiekis adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis (μg g^{-1}),

$(C_{aq}{}^{ads}(eq))$ = medžiagos vandeninės fazės masės koncentracija adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis (μg g^{-3}). Ši koncentracija nustatoma analizės būdu atsižvelgiant į vertes, gautas tuščiaisiais bandymais;

$(m_s{}^{ads}(eq))$ = dirvožemiu adsorbuotos medžiagos masė adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis (μg);

$(m_{aq}{}^{ads}(eq))$ = tirpale esančios medžiagos masė adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis (μg);

m_{soil} = dirvožemio fazės kiekis, išreikštas sauso dirvožemio mase (g);

V_o = sąlytyje su dirvožemiu esančios vandeninės fazės pradinis tūris (cm^3).

A_{eq} ir K_d santykis aprašomas lygtimi:

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

▼C1

čia:

A_{eq} = adsorbcijos procentinė dalis adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis %

Pagal organinę anglį normalizuotas adsorbcijos koeficientas K_{oc} susieja pasiskirstymo koeficientą K_d ir dirvožemio bandinio organinės anglies kiekį:

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

čia:

OC % = organinės anglies dirvožemio bandinyje procentinė dalis ($g\ g^{-1}$).

K_{oc} koeficientas rodo vienintelę vertę, kuri apibūdina daugiausia nepolinių organinių cheminių medžiagų pasiskirstymą tarp dirvožemio organinės anglies ar nuosėdų ir vandens. Šių cheminių medžiagų adsorbcija susiejama su organinės medžiagos kiekiu adsorbuojančioje kietojoje medžiagoje (7); taigi K_{oc} vertės priklauso nuo humusinių dalių, kurių sorbcijos galia labai skiriasi dėl kilmės, genezės ir t. t. specifinių charakteristikų.

2.1.1. **Adsorbcijos izotermės**

Freundlicho adsorbcijos izotermių lygtis susieja adsorbuotos bandomosios medžiagos kiekį ir bandomosios medžiagos tirpalo koncentraciją pusiausvyros sąlygomis (8 lygtis).

Duomenys apdorojami, kaip nurodyta skirsnyje „Adsorbcija“, ir kiekvienam mėgintuvėliui po adsorbcijos bandymo apskaičiuojamas dirvožemiu adsorbuotos bandomosios medžiagos kiekis ($C_s^{ads}(eq)$), kitur žymimas x/m). Daroma prielaida, kad pusiausvyra yra pasiekta ir kad ($C_s^{ads}(eq)$) rodo pusiausvyros vertę:

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

Freundlicho adsorbcijos lygtis pateikta (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n}\ (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

ar tiesės pavidalu:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \left(\frac{\log K_F^{ads} + 1}{n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq)}\right) \quad (9)$$

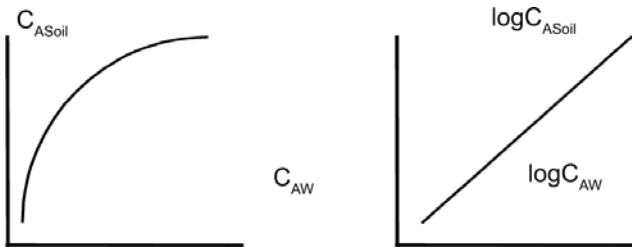
čia:

(K_F^{ads}) = Freundlicho adsorbcijos koeficientas; jo dimensija yra $cm^3\ g^{-1}$, tik jei l/n = 1; visais kitais atvejais į (K_F^{ads}) ($\mu g^{1-1/n}\ (cm^3)^{1/n} g^{-1}$);

n = regresijos konstanta; l/n dažniausiai kinta 0,7– 1,0 intervale, ir tai rodo, kad sorbcijos duomenys dažnai yra šiek tiek netiesiški.

Gali būti nubrėžti 8 ir 9 lygčių grafikai ir taikant 9 lygtį regresijos analizės metodu apskaičiuojami (K_F^{ads}) ir l/n. Taip pat apskaičiuojamas logaritminės lygties koreliacijos koeficientas r^2. Tokių grafikų pavyzdys pateiktas 2 pav.

▼C1



2 pvz., Freundlicho adsorbcijos įprastas ir ištiesintas grafikas

2.1.2. **Masių balansas**

Masių balansas (MB) apibrėžiamas kaip medžiagos, galinčios būti analiziškai regeneruotos po adsorbcijos bandymo, procentinė dalis nuo medžiagos vardinio kiekio bandymo pradžioje.

Duomenų apdorojimas skirsis, jei tirpiklis visiškai maišosi su vandeniu. Jei tirpiklis maišosi su vandeniu, ekstrahuojant tirpikliu regeneruojamos medžiagos kiekiui nustatyti galima taikyti duomenų apdorojimo būdą, aprašytą skirsnyje „Desorbcija“. Jei tirpiklis su vandeniu maišosi blogiau, reikia nustatyti regeneruotos medžiagos kiekį.

Adsorbcijos atveju masių balansas MB apskaičiuojamas, kaip nurodyta toliau. Daroma prielaida, kad narys (m_E) atitinka bandomosios cheminės medžiagos, organiniu tirpikliu ekstrahuojamos iš dirvožemio ir nuo bandymo indo sienelių, masių sumą:

$$MB = \left(\frac{((V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100)}{(V_0 \cdot C_0)}\right)(\%) \qquad (10)$$

čia:

MB = masių balansas (%),

m_E = bandomosios medžiagos, dviem pakopomis ekstrahuotos iš dirvožemio ir nuo sienelių, bendroji masė (μg);

C_o = sąlytyje su dirvožemiu esančio bandomojo tirpalo pradinė masės koncentracija (μg cm^{-3}),

V_{rec} = adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis regeneruoto tirpalo virš nuosėdų tūris (cm^{-3}).

2.2. DESORBCIJA

Desorbcija (D) apibrėžiama kaip desorbuotos bandomosios medžiagos procentinė dalis nuo medžiagos, prieš tai adsorbuotos bandymo sąlygomis, kiekio:

$$D_{t_i} = \left(\frac{(m_{aq}^{des}(t_i))}{(m_s^{ads}(eq))}\right) \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

čia:

(D_{ti}) = desorbcijos procentinė dalis laiko momentu t_i (%),

▼C1

$(m_{aq}^{des}(t_i))$ = laiko momentu t_i (μg) nuo dirvožemio desorbuotos bandomosios medžiagos masė,

$(m_s^{ads}(eq))$ = adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis dirvožemiu adsorbuotos bandomosios medžiagos masė (μg).

Informacija, kaip apskaičiuoti desorbcijos procentinę dalį D_{t_i} lygiagrečiuoju ir nuosekliuoju metodu, išsamiai aprašyta 5 priedėlyje.

Tariamasis desorbcijos koeficientas (K_{des}) bandymo sąlygomis yra dirvožemio fazėje likusios medžiagos kiekio ir desorbuotos medžiagos vandeninio tirpalo masės koncentracijos santykis pasiekus desorbcijos pusiausvyrą:

$$K_{des} = \left(\left(\frac{(m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq))}{(m_{aq}^{des}(eq))}\right)\left(\frac{(V_T)}{(m_{soil})}\right)\right) \ (cm^3\ g^{-1}) \qquad (12)$$

čia:

K_{des} = desorbcijos koeficientas ($cm^3\ g^{-1}$);

$(m_{aq}^{des}(eq))$ = nuo dirvožemio desorbuotos bandomosios medžiagos bendroji masė desorbcijos pusiausvyros sąlygomis (ug);

V_T = atliekant desorbcijos kinetikos bandymą sąlytyje su dirvožemiu esančios vandeninės fazės bendrasis tūris (cm^3).

Kaip apskaičiuoti $(m_{aq}^{des}(eq))$ nurodyta 5 priedėlio skirsnyje „Desorbcija“.

Pastaba.

Jei prieš tai atliekant adsorbcijos bandymą buvo taikomas lygiagretusis metodas, laikoma, kad tūris V_T 12 lygtyje yra lygus V_o.

2.2.1. **Desorbcijos izotermės**

Freundlicho desorbcijos izotermių lygtis susieja desorbcijos pusiausvyros sąlygomis likusios dirvožemiu adsorbuotos bandomosios medžiagos kiekį ir bandomosios medžiagos tirpalo koncentraciją (16 lygtis).

Desorbcijos pusiausvyros sąlygomis likusios dirvožemiu adsorbuotos medžiagos kiekis kiekvienam mėgintuvėliui apskaičiuojamas taip:

$$C_s^{des}(eq) = \left(\frac{(m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq))}{(m_{soil})}\right) \ (\mu g\ g^{-1}) \qquad (13)$$

$(m_{aq}^{des}(eq))$ yra apibrėžiama taip:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \left(\frac{(V_0)}{(V_r^F)}\right) - m_{aq}^A \ (\mu g) \qquad (14)$$

čia:

$(C_s^{des}(eq))$ = bandomosios medžiagos, kuri liko adsorbuota dirvožemiu desorbcijos pusiausvyros sąlygomis, kiekis ($\mu g\ g^{-1}$);

$(m_m^{des}(eq))$ = medžiagos, analiziškai nustatytos vandeninėje terpėje desorbcijos pusiausvyros sąlygomis, masė (μg);

▼C1

(m_{aq}^{A}) = bandomosios medžiagos, likusios po adsorbcijos pusiausvyros bandymo dėl nevisiško tūrio pakeitimo, masė (μg);

$(m_{aq}^{des}(eq))$ = medžiagos, esančios tirpale adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis, masė (μg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{(V_0 - V_R)}{(V_0)}\right) \quad (15)$$

(V_r^F) = tirpalo, paimto iš mėgintuvėlio bandomosios medžiagos kiekiui nustatyti desorbcijos pusiausvyros sąlygomis, tūris (cm^3)

V_R = tirpalo virš nuosėdų, pašalinto iš mėgintuvėlio pasiekus adsorbcijos pusiausvyrą ir pakeisto tokiu pat tūriu 0,01 M $CaCl_2$ tirpalo, tūris (cm^3);

Freundlicho desorbcijos lygtis pateikta (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} \quad (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

ar tiesės pavidalu:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n\ \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

čia:

(K_F^{des}) = Freundlicho desorbcijos koeficientas;

n = regresijos konstanta;

$(C_{aq}^{des}(eq))$ = medžiagos vandeninėje fazėje masės koncentracija desorbcijos pusiausvyros sąlygomis $(\mu g\ cm^{-3})$.

Gali būti nubrėžti 16 ir 17 lygčių grafikai ir taikant 17 lygtį regresijos analizės metodu apskaičiuojami (K_F^{des}) ir l/n.

Pastaba:

Jei Freundlicho adsorbcijos ar desorbcijos laipsnio rodiklis l/n yra lygus 1, Freundlicho lygčių adsorbcijos ar desorbcijos konstantos $((K_F^{ads})$ ir $(K_F^{des}))$ bus lygios atitinkamai adsorbcijos ar desorbcijos pusiausvyros konstantoms (K_d ir K_{des}), ir C_s priklausomybės nuo C_{aq} grafikas bus tiesė. Jei laipsnių rodikliai nėra lygūs 1, C_s priklausomybės nuo C_{aq} grafikai nebus tiesės ir adsorbcijos bei desorbcijos konstantos keisis išilgai izotermių.

2.2.2. **Bandymo ataskaita**

Bandymo ataskaitoje turi būti ši informacija:

— išsamus naudotų dirvožemio bandinių identifikavimas, įskaitant:

— geografinę vietos nuorodą (platuma, ilguma),

— bandinio ėmimo datą,

▼C1

— naudojimo paskirtį (pvz., žemės ūkio paskirties dirvožemis, miškas ir t. t.),

— bandinio ėmimo gylį,

— smėlio/dumblo/molio kiekį,

— pH vertes (0,01 M CaCl2),

— organinės anglies kiekį,

— organinės medžiagos kiekį,

— azoto kiekį,

— C/N santykį,

— katijonų mainų gebą (mmol/kg),

— visą informaciją apie dirvožemio bandinių rinkimą ir laikymą,

— jei tinka, visą informaciją, reikalingą bandomosios medžiagos adsorbcijai/desorbcijai aiškinti,

— metodus, taikomus kiekvienam parametrui nustatyti,

— atitinkama informacija apie bandomąją medžiagą,

— bandymo temperatūra,

— centrifugavimo sąlygos,

— analizės metodika, taikyta bandomajai medžiagai analizuoti,

— priežastys, kurios pagrįstų tirpinimo medžiagos naudojimą pradiniam bandomosios medžiagos tirpalui ruošti,

— apskaičiavimuose darytų pataisų aiškinimai, jei tinka,

— duomenys pagal formą (6 priedėlis) ir grafikai,

— visa informacija ir pastebėjimai, padedantys aiškinti bandymų rezultatus.

3. **NUORODOS**

1) Kukowski H. and Brūmmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.

2) Franzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.

3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995 (June 1995).

5) US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163–1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09–88–096, Date: 1/1988.

▼C1

6) US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96–048, April 1996.

7) ASTM Standards, E 1195–85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

12) Calvet R., (1989), „Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils“, in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

13) Calvet R., (1980) „Adsorption-Desorption Phenomena“ in Interactions between herbicides and the soil. (RJ. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83–122.

14) Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), „The sorption of nonpolar organics by soils and sediments“ in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S. A), Special Publication no. 22, pp 31–44.

15) van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), „An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media“. Soil Sci. Soc. Am. Proc, Vol. 38(1), 29–35.

16) McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), „Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis“, in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

17) Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965), „Movement and sorption of chemicals applied to the soil“. Weeds, 13, 185–190.

18) Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) „Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils“. J. Agric. Food Chem., 18, 524–528.

19) Russell M.H., (1995), „Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil“ in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

20) Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), „Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides“, IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, 901–932.

▼C1

21) Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), „Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils“. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp 137–157, BCPC, Surrey, UK.

22) Furminge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), „Persistence of herbicides in soil“. J. Sci. Fd Agric, 18, 269–273.

23) Burkhard N., and Guth J.A., (1981), „Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-l, 3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption“. Pestic. Sci. 12, 45–52.

24) Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). „Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides“. Proc. Br. Crop Prot. Conf, 3, 961–971.

25) Osgerby J.M., (1973), „Process affecting herbicide action in soil“. Pestic. Sci., 4, 247–258.

26) Guth J.A., (1972), „Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Boden“. Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, 143–154.

27) Hamaker J.W., (1975), „The interpretation of soil leaching experiments“, in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R Haque and V.H. freed), pp. 135–172, Plenum Press, NY.

28) Helling C.S., (1971), „Pesticide mobility in soils“. Soil Sci. Soc. Amer. Proc, 35, 732–210.

29) Hamaker J.W., (1972), „Diffusion and volatilization“ in Organic chemicals in the soil environment (CAT. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, 49–143.

30) Burkhard N. and Guth J.A., (1981), „Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system“. Pestic. Sci. 12, 37–44.

31) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses“, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297–325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

32) Gustafson D.I., (1989), „Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide teachability“. J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), 339–357.

33) Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). „Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils“. J. of Soil Sci., 28, 340–350.

34) Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), „Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils“. Pest. Sci., 11, 389–395.

35) Green R.E., and Karickoff S.W., (1990), „Sorption estimates for modeling“, in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp.80–101,

36) Lambert S.M., (1967), „Functional relationship between sorption in soil and chemical structure“. J. Agri. Food Chem., 15, 572–576.

▼C1

37) Hance R.J., (1969), „An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils“. J. Agri. Food Chem., 17, 667–668.

38) Briggs G. G (1969), „Molecular structure of herbicides and their sorption by soils“. Nature, 223, 1288.

39) Briggs G.G. (1981). „Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor“. J. Agric. Food Chem., 29, 1050–1059.

40) Sabljic A., (1984), „Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology“. J. Agric. Food Chem., 32, 243–246.

41) Bailey G.W., and White J.L., (1970), „Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil“. Residue Rev., 32, 29–92.

42) Bailey G.W., J.L. White and Y. Romberg., (1968), „Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate“. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32:222–234.

43) Karickhoff S.W., (1981) „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils“. Chemosphere 10, 833–846.

44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), „Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners“. Environ. Toxicol. SAFEty 21, 1–17.

45) Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972). „Adsorption in organic chemicals“ in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49–143.

46) Deli J., and Warren G.F., 1971, „Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils“. Weed Sci. 19:67–69.

47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), „Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils“. Weed Science, Vol. 23, 454–457.

48) Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) „Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations“ in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p. 75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

49) Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), „Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase“, CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Runoff and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

51) Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.

52) Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. „Methods of Soil Analysis“, Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼C1

53) ISO/DIS 10381–1 Soil Quality – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

54) ISO/DIS 10381–2 Soil Quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.

55) ISO/DIS 10381–3 Soil Quality – Sampling – Part 3: Guidance on safety of sampling.

56) ISO/DIS 10381–4 Soil Quality – Sampling – Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

57) ISO/DIS 10381–5 Soil Quality – Sampling – Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

58) ISO 10381–6, 1993: Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

59) Green R.E., and Yamane V.K., (1970) „Precision in pesticide adsorption measurements“. Soil Sci. Am. Proc., 34, 353–354.

60) Grover R., and Hance R.J. (1970), „Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine“. Soil Sci., 109–138.

61) Boesten, J.J.T. I, „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system“. Pest. Sci. 1990, 30, 31–41.

62) Boesten, J.J.T.I. „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106“ Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26–29 April 1994.

63) Bastide J., Cantier J.M., et Coste C, (1980), „Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique“. Weed Res. 21, 227–231.

64) Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), „Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments“. J. Environ. Qual., 10(3), 382–386.

65) Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), „Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water“. Environ. Sci. Technol., 17(4), 227–2311.

66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), „Sorption of organic substances by soils and sediments“. J. Environm. Sci. Health, B19 (3), 297–312.

67) Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), „Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons“. Chemosphere, 16(1), 109–116.

68) Lyman W.J., Reehl W.F.and Rosenblatt D.H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

69) Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). „Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota“ in Aquatic Toxicology (eds J. G Eaton, et al.), pp.78–115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼C1

70) Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), „A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds“. Science, Vol. 206, 831–832.

71) Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), „Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption“. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, 38–42.

72) Karickhoff S.W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils“. Chemosphere, Vol. 10(8), 833–846.

73) Moreale A., van Bladel R., (1981), „Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité – reactivité“. Revue de l'Agric, 34 (4), 319–322.

74) Müller M., Kordel W. (1996), „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil“. Chemosphere, 32(12), 2493–2504.

75) Kordel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), „HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – results of a ring test“. Chemosphere 30 (7), 1373–1384.

76) Kordel W., Stutte J., Kotthoff G (1993), „HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – comparison of different stationary phases“. Chemosphere 27 (12), 2341–2352.

77) Hance, R.J., (1967), „The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides“. Weed Research, Vol. 7, pp. 29–36.

78) Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), „The retention processes: mechanisms“ in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

79) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C. G (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses“, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp.297–325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

80) Giles C.H., (1970), „Interpretation and use of sorption isotherms“ in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, 14–32.

81) Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), „Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils“. J. Chem. Soc, 3973–93.

82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980), „Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caracteristiques gènèrales de 1'adsorption“. Ann. Agron. 31: 239–251.

83) Bedbur E., (1996), „Anomalies in the Freundlich equation“, Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13–15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.

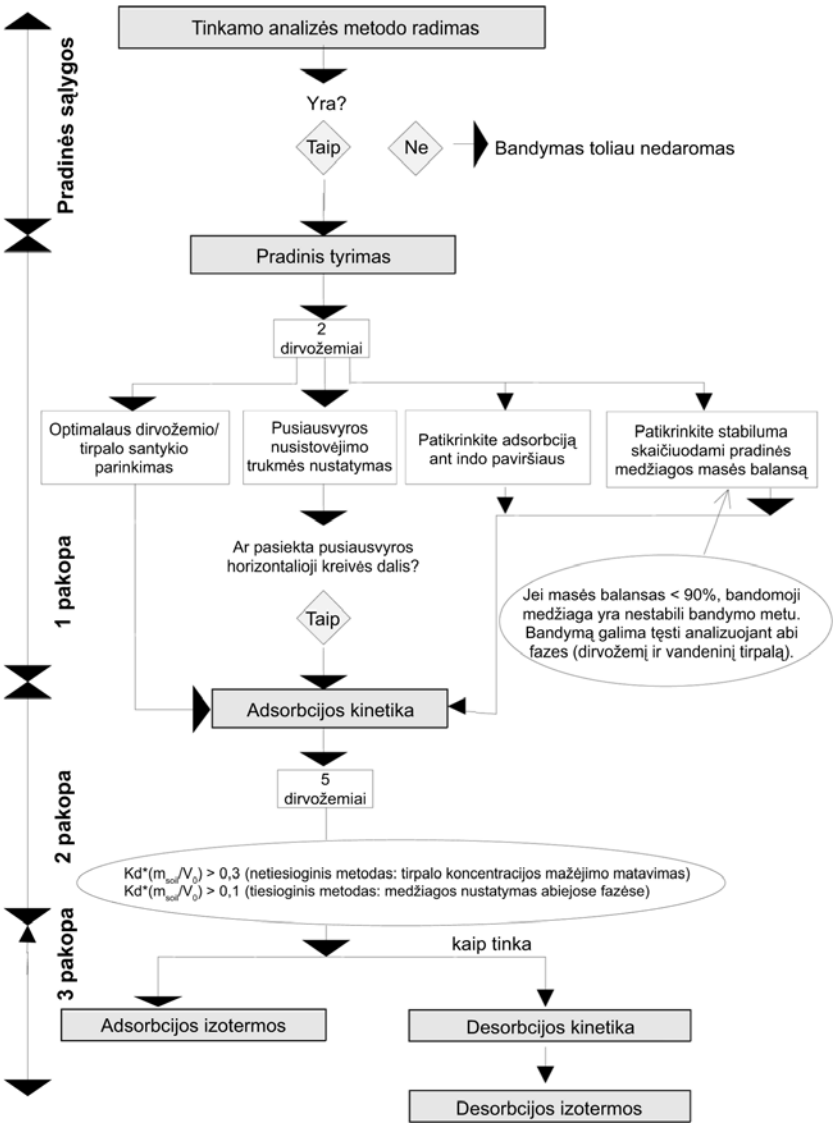
84) Guth, J.A., (1985), „Adsorption/desorption“, in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1–3, Canterbury, UK.

85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼C1

1 PRIEDĖLIS

Bandymo schema



▼C1

2 priedėlis

ANALIZĖS METODO IR KONCENTRACIJOS POKYČIO ĮTAKA ADSORBCIJOS REZULTATŲ TIKSLUMUI

Iš toliau pateiklamos lentelės (84) matyti, kad, jei tirpale esančios bandomosios medžiagos pradinės masės (m_0 = 110 μg) ir pusiausvyros masės (($m_{aq}^{ads}((eq))$ = 100 μg) skirtumas labai mažas, dėl 5 % paklaidos matuojant pusiausvyros koncentraciją, susidaro 50 % paklaida apskaičiuojant dirvožemiu adsorbuotos medžiagos masę (($m_s^{ads}(eq)$)) ir 52,4 % paklaida apskaičiuojant K_d.

Dirvožemio kiekis m_{soil} = 10 g

Tirpalo tūris V_0 = 100 cm^3

	(m_{aq}^{ads} (eq)) (μg)	(C_{aq}^{ads} (eq)) (μg cm^{-3})	R	(m_s^{ads} (eq)*) (μg)	(C_s^{ads} (eq)*) (μg g^{-1})	R‡	K_d*	R‡
	Kai A = 9 %							
m_0 = 110 μg ar C_0 = 1,100 μg/cm^3	100	1,000	Tikroji vertė	10	1,00	Tikroji vertė	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
	Kai A = 55 %							
m_0 = 110 μg ar C_0 = 1,100 μg/cm^3	50,0	0,500	Tikroji vertė	60,0	6,00	Tikroji vertė	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
	Kai A = 99 %							
m_0 = 110 μg ar C_0 = 1,100 μg/cm^3	1,100	0,011	Tikroji vertė	108,9	10,89	Tikroji vertė	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

$$(*m_s^{ads}(eq)) = ((m_0) - (m_{aq}^{ads})(eq)), (C_s^{ads}(eq)) = \left(\frac{([(C_0) - (C_{aq}^{ads})(eq)]V_0)}{(m_{soil})}\right).$$

$$Kd = \left(\frac{((m_s^{ads})(eq))}{((m_{aq}^{ads})(eq))}\right) \times \left(\frac{(V_0)}{(m_{soil})}\right)$$

$m_s^{ads}(eq)$ = bandomosios medžiagos dirvožemio fazėje masė pusiausvyros sąlygomis, μg;

$(m_{aq}^{ads}(eq))$ = bandomosios medžiagos vandeninėje fazėje masė pusiausvyros sąlygomis, μg;

$(C_s^{ads}(eq))$ = bandomosios medžiagos dirvožemio fazėje kiekis pusiausvyros sąlygomis, μg g^{-1};

$(C_{aq}^{ads}(eq))$ = bandomosios medžiagos vandeninės fazės koncentracija pusiausvyros sąlygomis, μg cm^{-3};

R = analizinė paklaida nustatant$(m_{aq}^{ads}(eq;))$

R‡ = apskaičiuota paklaida dėl analizinės paklaidos R.

▼C1

3 priedėlis

K_D VERTINIMO METODAI

1. Vertinimo metodai leidžia daryti K_d vertės prognozę, pagrįstą koreliacija, su, pvz., P_{ow} vertėmis (12) (39) (63–68), tirpumo vandenyje duomenimis (12) (19) (21) (39) (68–73) ar poliškumo duomenimis, gautais taikant atvirkštinių fazių HPLC metodą (74–76). Kaip parodyta 1 ir 2 lentelėse, pagal tas lygtis apskaičiuojamos K_{OC} ar K_{om} vertės ir po to netiesiogiai pagal šias lygtis apskaičiuojama K_d:

$$K_{oc} = K_d \cdot \left(\frac{(100)}{(\%oc)}\right)(cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \left(\frac{(K_d)}{(1{,}724)}\right) \cdot \left(\frac{(100)}{(\%oc)}\right)(cm^3 g^{-1})$$

2. Šių koreliacijų koncepcija pagrįsta dviem prielaidomis: 1) tai dirvožemio organinė medžiaga, kuri iš esmės daro įtaką medžiagos adsorbcijai; ir 2) vykstančios sąveikos yra daugiausia nepolinės. Todėl šios koreliacijos: 1) netinka arba tik iš dalies tinka polinėms medžiagoms, ir 2) netinka tais atvejais, kai organinės medžiagos dirvožemyje kiekis yra labai mažas (12). Be to, nors tarp P_{ow} ir adsorbcijos buvo nustatytos patenkinamos koreliacijos (19), to negalima pasakyti apie tirpumo vandenyje ir adsorbcijos laipsnio priklausomybę (19) (21); taigi tyrimai yra labai prieštaringi.

3. Kai kurie adsorbcijos koeficiento ir pasiskirstymo koeficiento (n-oktanolis/-vanduo) bei tirpumo vandenyje koreliacijų pavyzdžiai pateikti atitinkamai 1 ir 2 lentelėse.

1 lentelė

Koreliacijos tarp adsorbcijos pasiskirstymo koeficiento ir pasiskirstymo koeficiento (n-oktanolis/vanduo) pavyzdžiai; kiti pavyzdžiai pateikti (12) (68)

Medžiagos	Koreliacijos lygtys	Autoriai
Pakeisto karbamido dariniai	$\log Ko_m = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{ow}$	Briggs (1981)(39)
Chlorinti aromatiniai junginiai	$\log K_{oc} = - 0{,}779 + 0{,}904 \log P_{ow}$	Chiou *et al*. (1983) (65)
Įvairūs pesticidai	$\log Ko_m = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{ow}$	Gerstl ir Mingelgrin (1984) (66)
Aromatiniai angliavandeniliai	$\log K_{oc} = - 2{,}53 + 1{,}15 \log P_{ow}$	Vowles ir Mantoura (1987) (67)

2 lentelė

Koreliacijos tarp adsorbcijos pasiskirstymo koeficiento ir tirpumo vandenyje pavyzdžiai; kiti pavyzdžiai pateikti (68) (69)

Junginiai	Koreliacijos lygtys	Autoriai
Įvairūs pesticidai	$\log K_{om} = 3{,}8–0{,}561 \log S_w$	Gerstl ir Mingelgrin (1984) (66)
Alifatinės, aromatinės chlorintos medžiagos	$\log K_{om} = (4{,}040 +/- 0{,}038) – (0{,}557 +/- 0{,}012) \log S_w$	Chiou *et al*. (1979) (70)
α-naftolis	$\log K_{oc} = 4{,}273–0{,}686 \log S_w$	Hassetetal. (1981) (71)
Ciklinės, alifatinės aromatinės medžiagos	$\text{Log } K_{oc} = – 1{,}405–0{,}921 \log S_w – 0{,}00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Įvairūs junginiai	$\log K_{om} = 2{,}75–0{,}45 \log$	Moreale van Blade (1982)

▼C1

4 priedėlis

SKAIČIAVIMAI CENTRIFUGAVIMO SĄLYGOMS APIBRĖŽTI

1. Centrifugavimo trukmė nustatoma pagal šią formulę darant prielaidą, kad dalelės yra rutulio formos:

$$t = \left(\frac{(9)}{(2)}\right)\left[\frac{(\eta)}{(\omega^2 r p^2(\rho_s - \rho_{aq}))}\right]\ln(R_b/R_t) \qquad (1)$$

Siekiant supaprastinti, visi paramerai yra išreikšti ne SI vienetais (g, cm).

Čia:

ω = sukimosi greitis (= 2 π rpm/60), rad s^{-1},

rpm = apsisukimų dažnis, min^{-1}, m

η = tirpalo klampumas, g s^{-1} cm^{-1},

r_p = dalelių spindulys, cm,

ρ_s = dirvožemio tankis, g cm^{-3},

ρ_{aq} = tirpalo tankis, g cm^{-3},

R_t = nuotolis nuo centrifugos rotoriaus centro iki tirpalo centrifugavimo mėgintuvėlyje viršaus, cm,

R_b = nuotolis nuo centrifugos rotoriaus centro iki tirpalo centrifugavimo mėgintuvėlyje apačios, cm,

R_b-R_t = dirvožemio ir tirpalo mišinio stulpelio centrifugavimo mėgintuvėlyje ilgis, cm.

Kad būtų garantuotas visiškas atskyrimas, praktikoje dažniausiai vartojama trukmė yra lygi dvigubai apskaičiuotai trukmei.

2. 1 lygtis gali būti dar supaprastinta darant prielaidą, kad tirpalo klampumas (η) ir tankis (ρ_{aq}) yra lygūs vandens 25 °C klampumui ir tankiui; taigi, η = 8,95 × 10–3g s^{-1} cm^{-1} ir ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3}.

Tuomet centrifugavimo trukmė išreiškiama 2 lygtimi:

$$t = \left(\frac{(3.7)}{((rpm)^2 . (r_p)^2(\rho_s - 1))}\right)\ln\left(\frac{(Rb)}{(Rt)}\right) \qquad (2)$$

3. Iš 2 lygties aišku, kad norint pasiekti tam tikro dydžio dalelių atsiskyrimą (mūsų atveju 0,1 μm spindulio) centrifugavimo režimui, t. y. laikui (t) ir apsisukimų dažniui (min^{-1}), apibrėžti yra svarbūs du parametrai: 1) dirvožemio tankis ir 2) mišinio stulpelio centrifugavimo mėgintuvėlyje ilgis (R_b – R_t), t. y. nuotolis, kurį dirvožemio dalelė įveikia nuo tirpalo viršaus iki mėgintuvėlio dugno; akivaizdu, kad tam tikro tūrio mišinio stulpelio mėgintuvėlyje ilgis priklauso nuo mėgintuvėlio spindulio kvadratu.

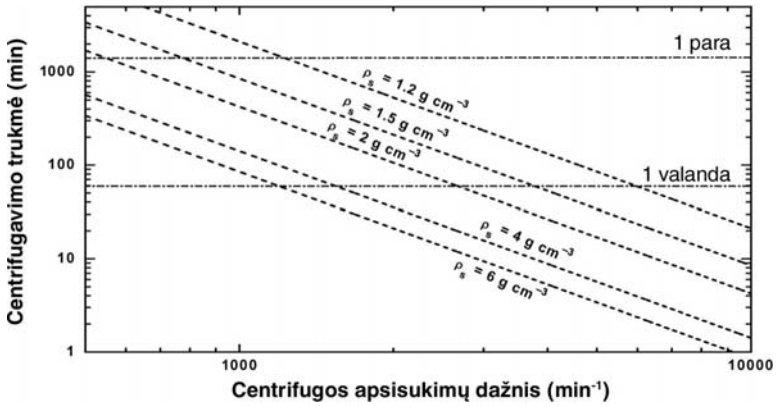
4. 1 pvz., pavaizduotas centrifugavimo trukmės (t) kitimas pagal centrifugos apsisukimų dažnį (min^{-1}) esant skirtingiems dirvožemių tankiams (ρ_s) (1a pav.) ir skirtingiems mišinio stulpelio centrifugavimo mėgintuvėlyje ilgiams (1b pav.). Iš 1a pvz., matyti, kad dirvožemio tankio įtaka yra akivaizdi; pvz., tradicinis centrifugavimas 3000 min^{-1} dažniu trunka maždaug 240 min, kai dirvožemio tankis 1,2 g cm^{-3}, tuo tarpu ši trukmė yra tik 50 min, jei tankis 2,0 g cm^{-3}. Panašiai, pagal 1b pvz., centrifuguojant tradiciniu 3 000 min^{-1} dažniu, centrifugavimo trukmė yra maždaug 50 min, jei mišinio stulpelio ilgis lygus 10 cm, ir tik 7 min, jei ilgis lygus 1 cm. Tačiau svarbu rasti optimalų santykį tarp centrifugavimo režimo, kai turi būti kuo mažesnis ilgis, ir galimybės bandymą darančiajam lengvai atskirti fazes po centrifugavimo.

▼C1

5. Be to, apibrėžiant bandymų sąlygas dirvožemio/tirpalo fazėms atskirti, svarbu atsižvelgti į galimą trečios „pseudofazės“, koloidinių dalelių buvimą. Šios dalelės, kurios yra mažesnės kaip 0,2 μm, gali daryti didelę įtaką visam medžiagos adsorbcijos dirvožemio suspensija mechanizmui. Centrifuguojant, kaip aprašyta pirmiau, koloidinės dalelės lieka vandeninėje fazėje ir analizuojamos kartu su ja. Taigi prarandama informacija apie jų poveikį.

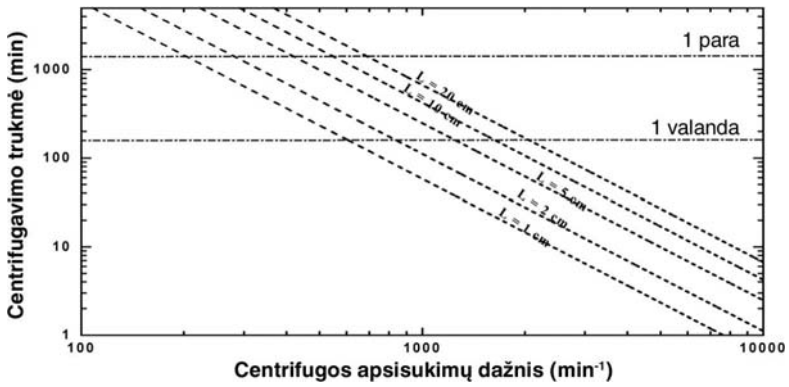
Jei bandymus atliekanti laboratorija turi ultracentrifugavimo ar ultrafiltravimo priemones, medžiagos adsorbcija/desorbcija dirvožemiu galėtų būti ištirta išsamiau, įskaitant informaciją apie medžiagos adsorbciją koloidinėmis dalelėmis. Šiuo atveju norint atskirti tris fazes: dirvožemį, koloidines daleles ir tirpalą, turi būti taikomas ultracentrifugavimas 60 000 min^{-1} apsisukimų dažniu ar ultrafiltravimas pro filtrą, kurio akytumas 100 000 Daltonų. Atitinkamai turi būti pakeistas bandymų protokolas, kad visos trys fazės būtų išanalizuotos.

1a pav.



Centrifugavimo trukmės (t) kitimas pagal centrifugos apsisukimų dažnį (min^{-1}) esant skirtingam dirvožemio tankiui (ρ_s). R_t = 10 cm, R_b -R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10–3 g s^{-1} cm^{-1} ir ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} esant 25 °C temperatūrai.

1b pav.



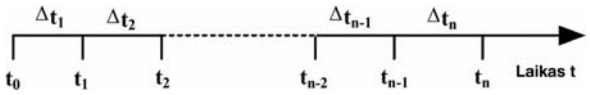
Centrifugavimo trukmės (t) kitimas pagal centrifugos apsisukimų dažnį (min^{-1}) esant skirtingam mišinio stulpelio centrifugavimo mėgintuvėlyje ilgiui (R_b -R_t) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10–3g s- cm^{-1}, ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} esant 25 °C temperatūrai ir ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

▼C1

5 priedėlis

ADSORBCIJOS A (%) IR DESORBCIJOS D (%) APSKAIČIAVIMAS

Metodikai taikyta tokia laiko schema:



Darant visus skaičiavimus daroma prielaida, kad bandomoji medžiaga yra stabili, ir jos labai neadsorbuoja indo sienelės.

ADSORBCIJA A (A %)

a) *Lygiagretusis metodas*

Kiekvienam mėgintuvėliui (i) kiekvienu laiko momentu (t_i) adsorbcijos procentinė dalis apskaičiuojama pagal lygtį:

$$A_{t_i} = \frac{(m_s^{ads}(t_i) \cdot 100)}{(m_0)} \ (\%) \qquad (1)$$

Šios lygties nariai gali būti apskaičiuoti taip:

$$m_0 = C_0 \ V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$(m_s^{ads}(t_i)) = (m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \ V_0) \ (\mu g) \qquad (3)$$

kai:

A_{ti} = adsorbcijos procentinė dalis (%) laiko momentu t_i;

$(m_s^{ads}(t_i))$ = dirvožemiu adsorbuotos bandomosios medžiagos masė laiko momentu t_i, kai buvo atliekama analizė (μg);

m_0 = bandymo pradžioje mėgintuvėlyje buvusios bandomosios medžiagos masė (μg);

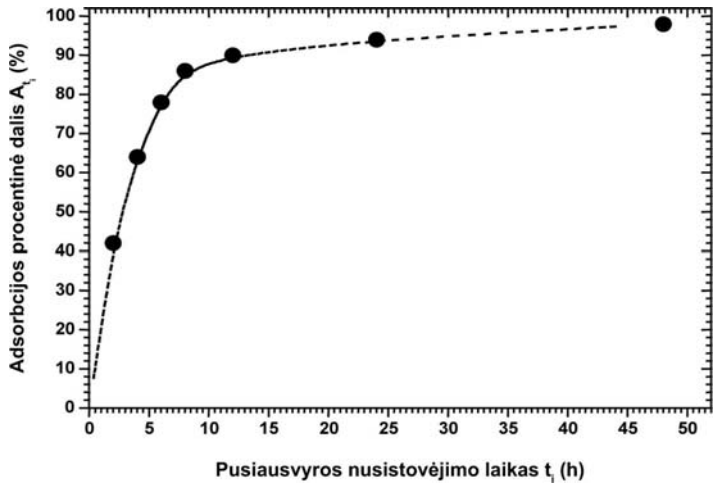
C_0 = sąlytyje su dirvožemiu esančio bandomojo tirpalo pradinė masės koncentracija (μg cm^{-3});

▼C1

$(C_{aq}^{ads}(t_i))$ = medžiagos vandeninės fazės masės koncentracija laiko momentu t_i, kai atliekama analizė (μg × cm^{-3}); ši koncentracija nustatoma analizės būdu atsižvelgiant į tuščiuosiuose bandymuose gautas vertes,

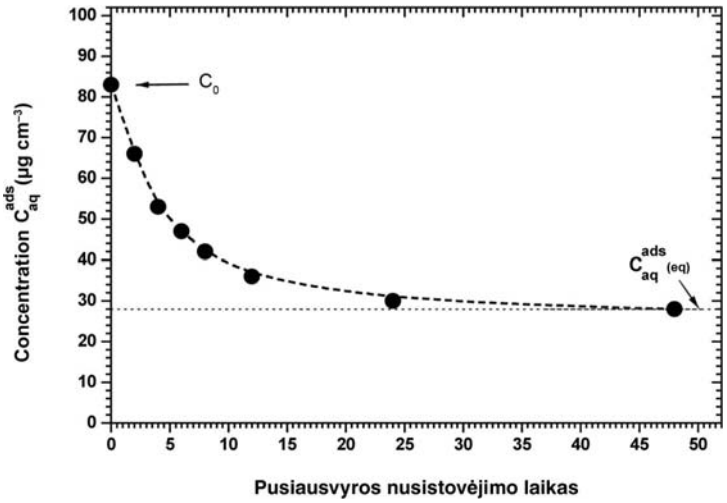
V_0 = sąlytyje su dirvožemiu esančio bandomojo tirpalo pradinis tūris (cm^3).

Adsorbcijos procentinės daliesA_{t_i} ar $C_{aq}^{ads}(t_i)$ vertės pažymimos grafike pagal laiką ir nustatomas sorbcijos pusiausvyros pasiekimo laikas. Tokių grafikų pavyzdžiai pateikti atitinkamai 1 pvz., ir 2 pav.



1 pav.

Adsorbcijos pusiausvyros grafikas



2 pav.

Bandomosios medžiagos masės koncentracijos (C_{aq}) kitimas laike

▼C1

b) *Nuoseklusis metodas*

Toliau pateiktose lygtyse atsižvelgiama į tai, kad pagal adsorbcijos matavimo metodiką bandomosios medžiagos kiekis tam tikrais laiko tarpais nustatomas mažose vandeninės fazės alikvotinėse dalyse.

— Kiekvienam laiko tarpui dirvožemiu adsorbuotos medžiagos kiekis apskaičiuojamas taip:

— pirmajam laiko tarpui $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$(m_s^{ads}(\Delta t_1)) = (m_0 - m_m^{ads}(t_1)) \cdot \left(\frac{(V_0)}{(v_a^A)}\right) \quad (4)$$

— antrajam laiko tarpui $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{(v_a^A)}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{(V_0 - v_a^A)}{(v_a^A)}\right) \quad (5)$$

— trečiajam laiko tarpui $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{(V_0 - v_a^A)}{(v_a^A)}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{(V_0 - 2 \cdot v_a^A)}{(v_a^A)}\right) \quad (6)$$

— n-ajam laiko tarpui $\Delta t_n = t_n - t_n\text{-}l$

$$(m_s^{ads}(\Delta t_n)) = (m_m^{ads}(t_{n-1})) \cdot \left(\frac{(V_0 - (n-2) \cdot v_a^A)}{(v_a^A)}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A)}{(v_a^A)}\right) \quad (7)$$

— Kiekvienam laiko tarpui procentinė adsorbcijos$A_{\Delta t_i}$ dalis apskaičiuojama pagal šią lygtį:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{(m_s^{ads}(\Delta t_i))}{(m_0)} \cdot 100(\%) \quad (8)$$

tuo tarpu procentinė adsorbcijos dalis A_{t_i} laiko momentu t_i apskaičiuojama pagal lygtį:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (9)$$

Adsorbicijos vertėsA_{t_i} ar $A_{\Delta t_i}$ (žiūrint, kuri reikalinga tyrimui) pažymimos grafike pagal laiką ir nustatomas sorbcijos pusiausvyros pasiekimo laikas.

— Pusiausvyros pasiekimo laiku t_{eq}:

— dirvožemiu adsorbuotos bandomosios medžiagos masė lygi:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼C1

— bandomosios medžiagos tirpale masė yra lygi:

$$\left(m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i)\right) \quad (11)$$

— ir adsorbcijos procentinė dalis pusiausvyros sąlygomis yra lygi:

$$A_{eq} = \frac{(m_s^{ads}(eq))}{(m_0)} \cdot 100(\%) \quad (12)$$

Pirmiau naudoti parametrai apibrėžiami kaip:

$(m_s^{ads})(\Delta t_1)$, $(m_s^{ads})(\Delta t_2)$, ..., $(m_s^{ads})(\Delta t_n)$ = bandomosios medžiagos, adsorbuotos dirvožemiu atitinkamai per laiko tarpus Δ_{t1}, Δ_{t2},…, Δ_{tn} masė (μg);

$(m_m^{ads})(t_1)$, $(m_m^{ads})(t_2)$, ..., $(m_n^{ads})(t_n)$ = atitinkamai laiko momentu t_1, t_2, t_n nustatyta bandomosios medžiagos masė (μg);

$(m_s^{ads}(eq))$ = adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis dirvožemiu adsorbuotos medžiagos masė (μg);

$(m_{aq}^{ads}(eq))$ = adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis tirpale esančios medžiagos masė (μg);

$(v_a{}^A)$ = alikvotinės dalies, kurioje nustatoma bandomoji medžiaga, tūris (cm^3);

$(A_{\Delta ti})$ = adsorbcijos, atitinkančios laiko tarpą Δt_i, procentinė dalis (%);

(A_{eq}) = adsorbcijos procentinė dalis adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis (%).

DESORBCIJA D (%)

Laikas t_0, kuris laikomas desorbcijos kinetikos bandymo pradžia, yra tas momentas, kai kuo didesnis regeneruoto bandomosios medžiagos tirpalo tūris (kai pasiekiama adsorbcijos pusiausvyra) yra pakeičiamas tokiu pat 0,01 M $CaCl_2$ tirpalo tūriu.

a) *Lygiagretusis metodas*

Laiko momentu t_i matuojama masė bandomosios medžiagos, esančios iš mėgintuvėlio (i) paimtame vandeninės terpės tūryje (V_r^i), ir desorbuotos medžiagos masė apskaičiuojama pagal lygtį:

$$(m_{aq}^{des}(t_i)) = (m_m^{des}(t_i)) \cdot \left(\frac{(V_0)}{(v_r^i)}\right) - (m_{aq}^{A}) \quad (13)$$

Desorbcijos pusiausvyros sąlygomis $t_i = t_{eq}$, todėl $(m_{aq}^{des}(t_i)) = (m_{aq}^{des}(eq))$

Per laiko tarpą (Δt_i) desorbuotos medžiagos masė nustatoma pagal lygtį:

$$(m_{aq}^{des}(\Delta t_i)) = (m_{aq}^{des})(t_i) - \left(\sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j)\right) \quad (14)$$

Desorbcijos procentinė dalis apskaičiuojama:

laiko momentu t_i pagal lygtį:

▼C1

$$D_{t_i} = \frac{((m_{aq}^{des})(t_i))}{(m_s^{ads}(eq))} \cdot 100(\%) \quad (15)$$

ir per laiko tarpą (Δt_i) pagal lygtį:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{((m_{aq}^{des})(\Delta t_i))}{((m_s^{ads})(eq))} \cdot 100(\%) \quad (16)$$

čia:

(D_{ti}) = desorbcijos procentinė dalis laiko momentu t_i (%),

($D_{\Delta ti}$) = desorbcijos procentinė dalis, atitinkanti laiko tarpą Δt_i (%),

($m_{aq}^{des}(t_1)$) = laiko momentu t_i desorbuotos bandomosios medžiagos masė (μg),

($m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$) = per laiko tarpą Δt_i desorbuotos bandomosios medžiagos masė (μg),

($m_m^{des}(t_i)$) = bandomosios medžiagos, analizės būdu nustatytos laiko momentu t_i analizei paimtame tirpalo tūryje (V_r^i) masė (μg);

($m_{aq}{}^{A}$) = bandomosios medžiagos, likusios po adsorbcijos pusiausvyros bandymo dėl nevisiško tūrio pakeitimo, masė (μg);

$$(m_{aq}^{A}) = (m_{aq}^{ads}(eq)) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{(V_0)}\right) \quad (17)$$

(m_{aq}^{ads})(eq) = tirpale esančios bandomosios medžiagos masė adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis (μg);

V_R = tirpalo virš nuosėdų, pašalinto iš mėgintuvėlio pasiekus adsorbcijos pusiausvyrą ir pakeisto tokiu pat tūriu 0,01 M $CaCl_2$ tirpalo, tūris (cm^3);

(V_r^i) = tirpalo, paimto iš mėgintuvėlio (i) bandomosios medžiagos kiekiui nustatyti atliekant desorbcijos kinetikos bandymą, tūris (cm^3).

Desorbcijos vertės (D_{ti}) ar ($D_{\Delta t_i}$) (žiūrint, kuri reikalinga tyrimui) pažymimos pagal laiką grafike ir nustatomas desorbcijos pusiausvyros pasiekimo laikas.

b) *Nuoseklusis metodas*

Šiose lygtyse atsižvelgta į tai, kad anksčiau taikytoje adsorbcijos metodikoje bandomoji medžiaga buvo nustatinėjama nedidelėse vandeninės fazės alikvotinėse dalyse (v_a^A) (nuoseklusis metodas pagal 1.9 poskyrį „Bandymo eiga“). Daroma prielaida, kad: a) po adsorbcijos kinetikos bandymo iš mėgintuvėlio pašalintas tirpalas virš nuosėdų buvo pakeistas tokiu pat tūriu 0,01 M $CaCl_2$ tirpalo (v_R) ir b) sąlytyje su dirvožemiu esančios vandeninės fazės bendras tūris (V_T) darant desorbcijos kinetikos bandymą yra pastovus ir apibrėžiamas lygtimi:

$$(V_T) = (V_0) - \left(\sum_{i=1}^{n} v_a^A(i)\right) \quad (18)$$

▼C1

Laiko momentu t_i:

— bandomosios medžiagos masė matuojama mažame alikvotinės dalies tūryje (v_a^D) ir desorbuotos medžiagos masė apskaičiuojama pagal lygtį:

$$(m_{aq}^{des}(t_i)) = (m_m^{des}(t_i)) \cdot \left(\frac{(V_T)}{(v_a^D)}\right) - \left(m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (i-1)\, v_a^D)}{(V_T)}\right)\right) \quad (19)$$

— desorbcijos procentinė dalis pusiausvyros sąlygomis $t_i = t_{eq}$, todėl $(m_{aq}^{des})(t_i) = (m_{aq}^{des})(eq)$.

— desorbcijos procentinė dalis (D_{t_i}) apskaičiuojama pagal šią lygtį:

$$D_{t_i} = \frac{((m_{aq}^{des})(t_i))}{((m_s^{ads})(eq))} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

Per laiko tarpą (Δt_i):

Per kiekvieną laiko tarpą desorbuotos medžiagos kiekis apskaičiuojamas taip:

— pirmajam laiko tarpui $\Delta t_1 = t_1\text{-}t_0$

$$(m_{aq}^{des}(\Delta t_1)) = (m_m^{des}(t_1)) \cdot \left(\frac{(V_T)}{(v_a^D)}\right) - (m_{aq}^A) \text{ and } (m_s^{des}(t_1)) = (m_s^{aq}(eq)) - (m_{aq}^{des}(\Delta t_1)) \quad (21)$$

— antrajam laiko tarpui $\Delta t_2 = t_2\text{-}t_1$

$$(m_{aq}^{des}(\Delta t_2)) = (m_m^{des}(t_2)) \cdot \left(\frac{(V_T)}{(v_a^D)}\right) - (m_{aq}^{des}(\Delta t_1)) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{(V_T)}\right) - (m_{aq}^A) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{(V_T)}\right) \quad (22)$$

$$(m_s^{des}(t_2)) = (m_s^{ads}(eq)) - [m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + (m_{aq}^{des}(\Delta t_2))]$$

— n-ajam laiko tarpui $\Delta t_n = t_n\text{-}t_{n-1}$

$$(m_{aq}^{des}(\Delta t_n)) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right] \text{et} \quad (23)$$

$$\left(m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \left(\sum_{i=1, n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right)$$

Galiausiai desorbcijos procentinė dalis kiekvienam laikotarpiui ($D_{\Delta t_i}$) apskaičiuojama pagal šią lygtį:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{(m_{aq}^{des}(\Delta t_i))}{(m_s^{ads}(eq))} 100(\%) \quad (24)$$

tuo tarpu desorbcijos procentinė dalis D_{t_i} laiko momentu t_i; nustatoma pagal lygtį:

$$D_{t_i} = \left(\frac{\left(\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)\right)}{(m_s^{ads}(eq))} \cdot 100\right) = \frac{\left(m_{aq}^{des}(t_i)\right)}{(m_s^{ads}(eq))} \cdot 100(\%) \quad (25)$$

▼C1

Šiose lygtyse naudoti parametrai apibrėžiami kaip:

$(m_s^{des}(\Delta t_1))$, $(m_s^{des}(\Delta t_2))$,…, $(m_s^{des}(\Delta t_n))$ = medžiagos, kuri dar liko adsorbuota dirvožemiu pasibaigus atitinkamai laiko tarpams At_1, At_2,…, Δt_n masė (μg);

$(m_{aq}^{des}(\Delta t_1))$, $(m_{aq}^{des}(\Delta t_2))$,…, $(m_{aq}^{des}(\Delta t_n))$ = bandomosios medžiagos, desorbuotos atititinkamai per laiko tarpus At_1, At_2,…, Δt_n, masė (μg);

$(m_m^{des}(t_1))$, $(m_m^{des}(t_2))$,…, $(m_m^{des}(t_n))$ = medžiagos masė, nustatyta alikvotinės dalies tūryje (v_a^D)atitinkamai laiko momentais t_1, t_2,…, t_n, (μg);

V_T = vandeninės fazės, esančios sąlytyje su dirvožemiu atliekant desorbcijos kinetikos bandymą pagal nuosekluįį metodą, bendras tūris (cm^3);

(m_{aq}^A) = bandomosios medžiagos, likusios po adsorbcijos pusiausvyros bandymo dėl nevisiško tūrio pakeitimo, masė (μg);

$$(m_{aq}^A) = \left(\frac{\left(\left(V_0 - \left(\sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) \right) - (V_R) \right)}{\left(V_0 - \left(\sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) \right)} \right) \cdot \left(m_{aq}^{ads}(eq) \right) \quad (26)$$

V_R = tirpalo virš nuosėdų, pašalinto iš mėgintuvėlio pasiekus adsorbcijos pusiausvyrą ir pakeisto tokiu pat tūriu 0,01 M $CaCl_2$ tirpalo, tūris (cm^3);

(v_a^D) = tirpalo, paimto iš mėgintuvėlio (i) bandomosios medžiagos kiekiui nustatyti atliekant desorbcijos kinetikos bandymą, alikvotinės dalies tūris (cm^3);

$$(v_a^D \leq 0{,}02 \cdot V_T) \quad (27)$$

▼C1

6 priedėlis

DIRVOŽEMIŲ ADSORBCIJA IR DESORBCIJA. DUOMENŲ PATEIKIMO LENTELĖS

Bandyta medžiaga:

Bandytas dirvožemis:

Sauso dirvožemio masės dalis (105 °C, 12h): ..... %

Temperatūra: ..... °C

Analizės metodo tinkamumas

Pasverta dirvožemio	g	
Sauso dirvožemio masė	g	
$CaCl_2$ tirpalo tūris	cm^3	
Galutinio tirpalo vardinė koncentracija	$\mu g\ cm^3$	
Galutinio tirpalo analizinė koncentracija	$\mu g\ cm^3$	

Taikyto analizės metodo esmė:

Analizės metodo kalibravimas:

Bandyta medžiaga:

Bandytas dirvožemis:

Sauso dirvožemio masės dalis (105 °C, 12h): ..... %

Temperatūra: ..... °C

Taikytas analizės metodas: Netiesioginis ☐ Lygiagretusis ☐ Nuoseklusis ☐ Tiesioginis ☐

Adsorbcijos bandymas. Bandiniai

	Simbolis	Vienetai	Pusiausvyros nusistovėjimo laikas		Pusiausvyros nusistovėjimo laikas		Pusiausvyros nusistovėjimo laikas		Pusiausvyros nusistovėjimo laikas	
Mėgintuvėlio Nr.										
Pasverta dirvožemio	—	g								
Sauso dirvožeio masė	m_{soil}	g								
Vandens pasvertame dirvožemyje tūris (apskaičiuotas)	V_{WS}	cm^3								
0,01 M $CaCl_2$ tirpalo tūris pusiausvyrai su dirvožemiu pasiekti		cm^3								
Pradinio tirpalo tūris		cm^3								
Su dirvožemiu sąlytyje esančios vandeninės fazės bendras tūris	V_0	cm^3								
Bandomosios medžiagos tirpalo pradinė koncentracija	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Bandomosios medžiagos masė bandymo pradžioje	m_0	μg								

▼C1

	Simbolis	Vienetai	Pusiausvyros nusistovėjimo laikas		Pusiausvyros nusistovėjimo laikas		Pusiausvyros nusistovėjimo laikas		Pusiausvyros nusistovėjimo laikas	
Po sumaišymo ir centrifugavimo										
NETIESIOGINIS METODAS										
Lygiagretusis metodas										
Bandomosios medžiagos vandeninės fazės koncentracija, įskaitant tuščiojo bandymo pataisą	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Nuoseklusis metodas										
Alikvotinės tirpalo dalies tūryje V_a^A išmatuota medžiagos masė	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
NETIESIOGINIS METODAS										
Dirvožemiu adsorbuotos bandomosios medžiagos masė	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Adsorbcijos apskaičiavimas										
Adsorbcija	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Vidutinės vertės										
Adsorbcijos koeficientas	K_d	$cm^3\ g^{-1}$								
Vidutinės vertės										
Adsorbcijos koeficientas	K_{oc}	$cm^3\ g^{-1}$								
Vidutinės vertės										

Bandyta medžiaga:

Bandytas dirvožemis:

Sauso dirvožemio masės dalis (105 °C,12h): .....%

Temperatūra: .....°C

Adsorbcijos bandymas: tuštieji ir kontroliniai bandymai

	Simbolis	Vienetai	Tuščiasis bandymas		Tuščiasis bandymas		Kontrolinis bandymas	
Mėgintuvėlio Nr.								
Pasverta dirvožemio		g					0	0
Vandens pasvertame dirvožemyje tūris (apskaičiuotas)		cm^3					—	—
Įpilto 0,01 M $CaCl_2$ tirpalo tūris		cm^3						
Įpiltas bandomosios medžiagos pradinio tirpalo tūris		cm^3	0	0				
Bendras vandeninės fazės tūris (apskaičiuotas)		cm^3					—	—

▼C1

	Simbolis	Vienetai	Tuščiasis bandymas		Tuščiasis bandymas		Kontrolinis bandymas	
Pradinė bandomosios medžiagos vandeninės fazės koncentracija		µg cm^{-3}						
Po sumaišymo ir centrifugavimo								
Vandeninės fazės koncentracija		µg cm^{-3}						

Pastaba. Prireikus stulpelių galima pridėti.

Bandyta medžiaga:

Bandytas dirvožemis:

Sauso dirvožemio masės dalis (105 °C, 12h):.....%

Temperatūra:.....°C

Masių balansas

	Simbolis	Vienetai				
Mėgintuvėlio Nr.						
Pasverta dirvožemio	—	g				
Sauso dirvožemio masė	m_{soil}	g				
Vandens pasvertame dirvožemyje tūris (apskaičiuotas)	V_{WS}	ml				
0,01 M $CaCl_2$ tirpalo tūris pusiausvyrai su dirvožemiu pasiekti		ml				
Pradinio tirpalo tūris		cm^3				
Su dirvožemiu sąlytyje esančios vandeninės fazės bendras tūris	V_0	cm^3				
Bandomosios medžiagos tirpalo pradinė koncentracija	C_0	µg cm^{-3}				
Pusiausvyros nusistovėjimo trukmė	—	h				
Po sumaišymo ir centrifugavimo						
Bandomosios medžiagos vandeninės fazės koncentracija, iskaitant tuščiojo bandymo pataisą	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}				
Pusiausvyros nusistovejimo trukmė	t_{eq}	h				
1-asis praskiedimas tirpikliu						
Nupiltos vandeninės fazės tūris	V_{rec}	cm^3				
Įpilto tirpiklio tūris	ΔV	cm^3				
1-asis ekstrahavimas tirpikliu						
Tirpiklio fazėje analizuojamos medžiagos signalas	S_{E1}	var.				
Tirpiklyje ištirpusios bandomosios medžiagos koncentracija	C_{E1}	µg cm^{-3}				

▼C1

	Simbolis	Vienetai				
Medžiagos, ekstrahuotos iš dirvožemio ir nuo indo sienelių, masė	m_{E1}	µg				
2-asis praskiedimas tirpikliu						
Nupilto tirpiklio tūris	ΔV_s	cm^3				
Įpilto tirpiklio tūris	$\Delta V'$	cm^3				
2-asis ekstrahavimas tirpikliu						
Tirpiklio fazėje analizuojamos medžiagos signalas	S_{E2}	var.				
Tirpiklyje ištirpusios bandomosios medžiagos koncentracija	C_{E2}	µg cm^{-3}				
Medžiagos, ekstrahuotos is dirvožemio ir nuo indo sienelių, masė	m_{E2}	µg				
Per dvi pakopas ekstrahuotos bandomosios medžiagos bendra masė	m_E	µg				
Masių balansas	MB	%				

Bandyta medžiaga:

Bandytas dirvožemis:

Sauso dirvožemio masės dalis (105 °C, 12h):.....%

Temperatūra:.....°C

Adsorbcijos izotermės

	Simbolis	Vienetai								
Mėgintuvėlio Nr.										
Pasverta dirvožemio	—	g								
Sauso dirvožemio masė	E	g								
Vandens pasvertame dirvožemyje tūris (apskaičiuotas)	V_{WS}	cm^3								
0,01 M $CaCl_2$ tirpalo tūris pusiausvyrai su dirvožemiu pasiekti		cm^3								
Įpilto pradinio tirpalo tūris		cm^3								
Su dirvožemiu sąlytyje esančios vandeninės fazės bendras tūris (apskaičiuotas)	V_0	cm^3								
Tirpalo koncentracija	C_0	µg cm^{-3}								
Pusiausvyros nusistovėjimo trukmė	—	h								

▼C1

	Simbolis	Vienetai								
Po sumaišymo ir centrifugavimo										
Bandomosios medžiagos vandeninės fazės koncentracija, įskaitant tuščiojo bandymo pataisą	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Temperatūra		°C								
Adsorbuotos medžiagos masė, tenkanti dirvožemio masės vienetui	$C_{s}^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Regresijos analizė:

K_F^{ads} vertė:

l/n vertė:

Regresijos koeficientas r^2:

Bandyta medžiaga:

Bandytas dirvožemis:

Sauso dirvožemio masės dalis (105 °C, 12h): ..... %

Temperatūra: ..... °C

Taikytas analizės metodas: Netiesioginis ☐ Lygiagretusis ☐ Nuoseklusis ☐

Desorbcijos bandymas

		Simbolis	Vienetai	Laiko tarpas	Laiko tarpas	Laiko tarpas	Laiko tarpas
Mėgintuvėlio, gauto iš adsorbcijos pakopos tarpsnio, Nr.							
Adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis dirvožemio adsorbuotos medžiagos masė		$m_s^{ads}(eq)$	µg				
Pašalintos vandeninės fazės tūris, pakeistas 0,01 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Su dirvožemiu sąlytyje esančios vandeninės fazės bendras tūris (apskaičiutas)	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Bandomosios medžiagos, likusios po adsorbcijos pusiausvyros bandymo dėl nevisiško tūrio pakeitimo, masė		m_{aq}^{A}	µg				
Desorbcijos kinetika							
Laiko momentu t_i nuo dirvožemio desorbuotos medžiagos išmatuota masė		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Tirpalo, paimto iš mėgintuvėlio (i) bandomajai medžiagai nustatyti, tūris	PM	V_f^{i}	cm^3				
	SM	v_a^{D}	cm^3				
Laiko momentu t_i nuo dirvožemio desorbuotos medžiagos masė (apskaičiuota)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Per laiko tarpą Δt_i nuo dirvožemio desorbuotos medžiagos masė (apskaičiuota)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼C1

	Simbolis	Vienetai	Laiko tarpas	Laiko tarpas	Laiko tarpas	Laiko tarpas
Desorbcijos procentinė dalis						
Desorbcija laiko momentu t_i	D_{ti}	%				
Desorbcija per laiko tarpą Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Tariamas desorbcijos koeficientas	K_{des}					

PM: lygiagretusis metodas

SM: nuoseklusis metodas

▼C1

C.19. **ADSORBCIJOS KOEFICIENTO (K_{oc}) NUSTATYMAS DIRVOŽEMYJE IR AKTYVIAJAME DUMBLE AUKŠTOS SKYRIMO GALIOS SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJA (HPLC)**

1. **METODAS**

Šis metodas yra OECD TG121 (2001) kopija.

1.1. ĮVADAS

Medžiagų sorbciją dirvožemiu ar nuotekų dumblu gali apibūdinti parametrai, bandymais nustatyti taikant C.18 bandymo metodą. Svarbus parametras yra adsorbcijos koeficientas, kuris apibrėžiamas kaip medžiagos dirvožemyje/dumble koncentracijos ir medžiagos vandeninės fazės koncentracijos santykis adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis. Adsorbcijos koeficientas, normalizuotas pagal dirvožemio organinės anglies kiekį, K_{oc} yra naudingas cheminės medžiagos ir dirvožemio bei nuotekų dumblo organinės medžiagos surišimo gebos rodiklis ir leidžia lyginti įvairias chemines medžiagas. Šis parametras gali būti įvertintas taikant koreliacijas su tirpumu vandenyje ir pasiskirstymo koeficientu (n-oktanolis/vanduo) (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Pagal aprašytą šio bandymo metodą adsorbcijos dirvožemiu ir nuotekų dumblu koeficientui K_{oc} nustatyti taikomas HPLC (8). Įvertis yra patikimesnis nei gauti pagal QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships* – kiekybiniai struktūros ir aktyvumo ryšiai) apskaičiavimus (9). Kaip vertinimo metodas, jis negali visiškai pakeisti įkrovos pusiausvyros bandymų, atliekamų pagal C.18 bandymo metodą. Tačiau įvertintas K_{oc} gali būti naudingas tinkamiems bandymų parametrams pasirinkti adsorbcijai/desorbcijai tirti pagal C.18 bandymo metodą apskaičiuojant Kd (pasiskirstymo koeficientą) ar K_f (Freundlicho adsorbcijos koeficientą) pagal 3 lygtį (žr. 1.2 skirsnį).

1.2. APIBRĖŽTYS

K_D – pasiskirstymo koeficientas, apibrėžiamas kaip dviejų fazių sistemoje, sudarytoje iš sorbento (dirvožemio ar nuotekų dumblo) ir vandeninės fazės, ištirpintos bandomosios medžiagos pusiausvyros koncentracijos C santykis; jis yra bematis dydis, jei abiejų fazių koncentracija išreikšta masės/masės koncentracija. Jei vandeninės fazės koncentracija išreikšta masės/tūrio koncentracija, vienetas yra ml g^{-1}. K_d gali keistis keičiantis sorbento savybėms ir gali priklausyti nuo koncentracijos.

$$K_d = \left(\frac{(C_{soil})}{(C_{aq})}\right) \; or \; \left(\frac{(C_{sludge})}{(C_{aq})}\right) \qquad (1)$$

čia:

C_{soil} = bandomosios medžiagos dirvožemyje koncentracija pusiausvyros sąlygomis (μg g^{-1})

C_{sludge} = bandomosios medžiagos dumble koncentracija pusiausvyros sąlygomis (μg g^{-1})

C_{aq} = bandomosios medžiagos vandeninės fazės koncentracija pusiausvyros sąlygomis (μg g^{-1}, μg ml^{-1}).

▼C1

K_f – Freundlicho adsorbcijos koeficientas, apibrėžiamas kaip bandomosios medžiagos dirvožemyje ar nuotekų dumble koncentracija (x/m), kai vandeninės fazės pusiausvyros koncentracija C_{aq} lygi vienetui; vienetai yra μg g^{-1} sorbento. Vertė gali keistis keičiantis sorbento savybėms.

$$\log\left(\frac{(x)}{(m)}\right) = \log K_f + \left(\frac{(1)}{(n)} \cdot \log C_{aq}\right) \quad (2)$$

čia:

x/m = kiekis x (μg) bandomosios medžiagos, pusiausvyros sąlygomis adsorbuotos sorbentu, kurio kiekis m (g)

l/n = Freundlicho adsorbcijos izotermės lygties krypties koeficientas

C_{aq} = bandomosios medžiagos vandeninės fazės koncentracija pusiausvyros sąlygomis (μg ml^{-1})

Kai $C_{aq} = 1; \log K_f = \log\left(\frac{(x)}{(m)}\right)$

K_{oc} – pasiskirstymo koeficientas (K_d) ar Freundlicho adsorbcijos koeficientas (K_f), normalizuoti pagal sorbento organinės anglies kiekį (f_{oc}); ypač nejoninių cheminių medžiagų atveju jis yra apytikris medžiagos ir sorbento adsorbcijos laipsnio rodiklis ir leidžia lyginti skirtingas chemines medžiagas. Pagal tai, kokios yra K_d ir K_f dimensijos, K_{oc} gali būti bematis arba jo vienetai yra ml g^{-1} ar μg g^{-1} organinės medžiagos.

$$\text{Koc} = \left(\frac{(\text{Kd})}{(\text{foc})}\right) \text{ (bedimensinis arba ml} \cdot g^{-1}) \text{ ar } \left(\frac{(\text{Kf})}{\text{foc}}\right) (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (3)$$

K_{oc} ir K_d santykis nėra visuomet tiesiškas, taigi įvairių dirvožemių K_{oc} vertės gali būti skirtingos, tačiau jų kintamumas yra daug mažesnis lyginant su K_d ar K_f verčių kintamumu.

Adsorbcijos koeficientas (K_{oc}) nustatomas iš sulaikymo faktoriaus (k') naudojant pasirinktų etaloninių medžiagų log k' pagal log K_{oc} kalibracinį grafiką.

$$k' = \left(\frac{(t_R - t_0)}{(t_0)}\right) \quad (4)$$

čia:

t_R = bandomosios ir etaloninės medžiagos sulaikymo trukmė HPLC metodu (minutės),

t_0 = eliuento sulaikymo trukmė (*dead time*) HPLC metodu (minutės) (žr. 1.8.2 skirsnį).

P_{ow} – pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolis/vanduo), apibrėžiamas kaip medžiagos n – oktanolio tirpalo ir vandens tirpalo koncentracijos santykis; jis yra bematis dydis.

$$\text{Pow} = \left(\frac{(\text{Coctanol})}{(\text{Caq})}\right) (= \text{Kow}) \quad (5)$$

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Prieš taikant metodą reikia žinoti struktūrinę formulę, grynumą ir disociacijos konstantą (jei tinka). Vertinga yra informacija apie tirpumą vandenyje ir organiniuose tirpikliuose, apie pasiskirstymo koeficientą (n-oktanolis/vanduo) ir apie hidrolizės charakteristikas.

▼C1

Išmatuotiems bandomosios medžiagos HPLC sulaikymo duomenims ir jos adsorbcijos koeficientui K_{oc} susieti turi būti gauta log K_{oc} pagal log k kalibracinė kreivė. Turi būti panaudoti ne mažiau kaip šeši etaloniniai taškai, bent vienas jų žemiau laukiamos bandomosios medžiagos vertės ir vienas aukščiau šios vertės. Metodo tikslumas labai padidėja, jei naudojamos etaloninės medžiagos struktūra yra panaši į bandomosios medžiagos. Jei tokių duomenų nėra, vartotojas gali pats pasirinkti atitinkamas kalibravimo medžiagas. Tokiu atveju reikėtų pasirinkti bendresnį rinkinį struktūriškai nevienalyčių medžiagų. Rekomenduojamos naudoti medžiagos ir nuotekų dumblo K_{oc} vertės yra pateiktos 1 priedėlio 1 lentelėje ir dirvožemio – 3 lentelėje. Kitų kalibravimo medžiagų pasirinkimą būtina pagrįsti.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandymas HPLC metodu atliekamas analizės kolonėlėse, kurių kietąją fazę sudaro pramoninės gamybos cianpropilo kietoji fazė, turinti lipofilines ir polines dalis. Naudojama vidutinio poliškumo nejudama fazė, nešiklis – silicio dioksidas:

– O –Si	– CH_2 – CH_2 –CH_2	– CN
silicio dioksidas	nepolinė tarpinė dalis	polinė dalis

Bandymo metodo principas yra panašus į A.8 bandymo metodo (pasiskirstymo koeficientas, HPLC metodas) principą. Bandomajai medžiagai einant per kolonėlę kartu su judamąja faze, vyksta medžiagos ir nejudamosios fazės sąveika. Dėl pasidalijimo tarp judamosios ir nejudamosios fazių bandomoji medžiaga sulaikoma. Kadangi nejudamoji fazė susideda iš polinės ir nepolinės dalies, vyksta jos sąveika su molekulės polinėmis ir nepolinėmis grupėmis, panašiai kaip ant organinės medžiagos, kurios nešiklis yra dirvožemis ar nuotekų valymo dumblas. Taip galima nustatyti santykį tarp kolonėlės sulaikymo trukmės ir adsorbcijos ant organinės medžiagos koeficiento.

Didelę įtaką sorbcijai turi pH vertė, ypač polinių medžiagų sorbcijai. Žemės ūkio paskirties dirvožemio ar nuotekų valymo įrenginių talpyklų pH paprastai yra 5,5–7,5. Jei medžiagos gali jonizuotis, naudojant tinkamus buferinius tirpalus turi būti atliekami du bandymai medžiagai esant joninio ir nejoninio pavidalo, tačiau tik tais atvejais, kai bandomosios medžiagos disociacijos laipsnis pH 5,5–7,5 intervale yra bent 10 %.

Kadangi vertinimui naudojamas santykis tarp HPLC kolonėlės sulaikymo trukmės ir adsorbcijos koeficiento, nereikia jokio kiekybinio analizės metodo, būtina nustatyti tik sulaikymo trukmę. Jei yra tinkamas etaloninių medžiagų rinkinys ir galima naudoti standartines bandymo sąlygas, metodas leidžia greitai ir veiksmingai įvertinti adsorbcijos koeficientą K_{oc}.

1.5. METODO TAIKOMUMAS

HPLC metodas taikomas cheminėms medžiagoms (nežymėtoms ar su žymėtaisiais atomais), kurioms galima pritaikyti tinkamą aptikimo sistemą (pvz., spektrofotometrą, radioaktyvumo detektorių) ir kurios yra gana stabilios vykstant bandymui. Jis gali būti ypač naudingas cheminėms medžiagoms, sunkiai tiriamoms kitomis bandymo sistemomis (t. y. lakioms medžiagoms; medžiagoms, kurios tirpsta esant mažesnei nei analiziškai nustatoma koncentracija; medžiagoms, kurių gimiringumas inkubavimo sistemų paviršiams yra didelis). Metodas gali būti taikomas mišiniams, kurių išplovimo juostos neatsiskiria. Tokiu atveju turi būti nurodyta mišinio junginių viršutinė ir apatinė log K_{oc} verčių riba.

▼C1

Kartais priemaišos gali trukdyti aiškinant HPLC rezultatus, tačiau jos nėra tokios svarbios, jei bandomoji medžiaga gali būti aiškiai identifikuota analiziškai ir atskirta nuo priemaišų.

Metodas patikrintas naudojant medžiagas, išvardytas priedėlio 1 lentelėje, taip pat juo buvo tiriamos įvairios šių klasių medžiagos:

— aromatiniai aminai (pvz., trifluralinas, 4-chloranilinas, 3,5-dinitroanilinas, 4-metilanilinas, N-metilanilinas, 1-naftilaminas),

— aromatinių karboksilinių rūgščių esteriai (pvz., benzenkarboninės rūgšties metilesteris, 3,5-dinitrobenzenkarboninės rūgšties etilesteris),

— aromatiniai angliavandeniliai (pvz., toluenas, ksilenas, etilbenzenas, nitrobenzenas),

— ariloksifenoksipropioninės rūgšties esteriai (pvz., diklofopmetilas, fenoksapropetilas, fenoksaprop-P-etilas),

— fungicidai benzimidazolo ir imidazolo pagrindu (pvz., karbendazimas, fuberidazolas, triazoksidas),

— karboksilinių rūgščių amidai (pvz., 2-chlorbenzamidas, N, N-dimetilbenzamidas, 3,5-dinitrobenzamidas, N-metilbenzamidas, 2-nitrobenzamidas, 3-nitrobenzamidas),

— chlorinti angliavandeniliai (pvz., endosulfanas, DDT, heksachlorbenzenas, kvintozenas, 1,2,3-trichlorbenzenas),

— fosforo organiniai insekticidai (pvz., azinfosmetilas, disulfotonas, fenamifosas, izofenfosas, pirazofosas, sulprofosas, triazofosas),

— fenoliai (pvz., fenolis, 2-nitrofenolis, 4-nitrofenolis, pentachlorfenolis, 2,4,6-trichlorfenolis, 1-naftolis),

— fenilkarbamido dariniai (pvz., izoproturonas, monolinuronas, pencikuronas),

— pigmentiniai dažai (pvz., rūgštusis geltonas 219, bazinis mėlynas 41, tiesioginis raudonas 81),

— poliaromatiniai angliavandeniliai (pvz., acenaftenas, naftalenas),

— herbicidai 1,3,5-triazino pagrindu (pvz., prometrinas, propazinas, simazinas, terbutrinas),

— triazolo dariniai (pvz., tebukonazolas, triadimefonas, tradimenolis, triapentenolis).

Metodas netinka medžiagoms, reaguojančioms su eliuentu ar su nejudamąja faze. Jis taip pat netinka medžiagoms, kurios su neorganiniais komponentais reaguoja specifiniu būdu (pvz., su molio mineralais sudaro klasterinius kompleksinius junginius). Metodas gali netikti paviršiaus veikliosioms medžiagoms, neorganiniams junginiams ir vidutinio stiprumo ar stiprioms organinėms rūgštims ir bazėms. Galima nustatyti log K_{oc} vertes 1,5–5,0 intervale. Jonizuojamos medžiagos turi būti matuojamos naudojant buferinę judamąją fazę, tačiau reikia žiūrėti, kad nesusidarytų buferinio tirpalo komponentų ar bandomosios medžiagos nuosėdų.

▼C1

1.6. KOKYBĖS KRITERIJAI

1.6.1. **Tikslumas**

Paprastai bandomosios medžiagos adsorbcijos koeficientas gali būti įvertintas ± 0,5 log vieneto tikslumu lyginant su verte, nustatyta įkrovos pusiausvyros metodu (žr. priedėlio 1 lentelę). Galima pasiekti didesnį tikslumą, jei naudota etaloninė medžiaga ir bandomoji medžiaga yra panašios struktūros.

1.6.2. **Pakartojamumas**

Nustatymas turi būti daromas bent du kartus. Atskirų matavimų log K_{oc} turi skirtis mažiau kaip 0,25 log vieneto.

1.6.3. **Atkuriamumas**

Iki šiol sukaupta patirtis taikant metodą patvirtina jo tinkamumą. Tiriant HPLC metodą pagal 48 medžiagas (daugiausia pesticidus), apie kurias yra patikimų adsorbcijos dirvožemiu K_{oc} duomenų, gautas koreliacijos koeficientas R = 0,95 (10) (11).

Metodui tobulinti ir jo tinkamumui patvirtinti buvo atliekamas tarplaboratorinio palyginimo bandymas dalyvaujant 11 laboratorijų (12). Rezultatai pateikti priedėlio 2 lentelėje.

1.7. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.7.1. **Adsorbcijos koeficiento pradinis įvertinimas**

Adsorbcijos laipsnio rodikliu, ypač nejonizuotų medžiagų atveju, gali būti naudojamas pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolis/vanduo) P_{ow} (= K_{ow}) ir tam tikru laipsniu tirpumas vandenyje, taigi jie gali būti naudojami pradiniam intervalui nustatyti. Kelioms cheminių medžiagų grupėms buvo paskelbta nemažai naudingų koreliacijų (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. **Aparatūra**

Būtina turėti skysčių chromatografą su nepulsuojančiu siurbliu ir atitinkamu aptikimo įtaisu. Rekomenduojama naudoti injekcijos vožtuvą ir injekcijos kilpą. Naudojamos pramoninės gamybos cianpropilo dervos, chemiškai surištos su silicio dioksido nešikliu (pvz., Hypersil ir Zorbax CN). Tarp injekcijos sistemos ir analizės kolonėlės galima įtaisyti tos pačios medžiagos apsauginę kolonėlę. Skirtingų tiekėjų kolonėlių skiriamoji galia gali labai skirtis. Vadovautis reikėtų šiomis sulaikymo faktorių k' vertėmis: log k' > 0,0, jei log K_{oc} = 3,0, ir log k' > 0,4, jei log K_{oc} = 2,0, jei judamąja faze naudojamas metanolio/vandens 55/45 % mišinys.

1.7.3. **Judamosios fazės**

Buvo bandytos kelios judamosios fazės, rekomenduoti galima šias dvi:

— metanolio/vandens (55/45 % v/v) mišinį,

— metanolio/0,01 M citratinio buferio pH 6,0 (55/45 % v/v) mišinį.

▼C1

Eliuavimo tirpikliui ruošti naudojamas HPLC grynumo metanolis ir distiliuotas vanduo ar citratinis buferinis tirpalas. Prieš naudojant mišinys nudujinamas. Turi būti taikomas izokratinis eliuavimas. Jei metanolio/vandens mišiniai netinka, galima išmėginti kitus organinio tirpiklio/vandens mišinius, pvz., etanolio/vandens ar acetonitrilo/vandens mišinius. Tiriant jonizuojamas medžiagas pH vertei stabilizuoti, rekomenduojama naudoti buferinį tirpalą. Reikia vengti druskų nuosėdų susidarymo ir nesugadinti kolonėlės, o taip gali atsitikti su kai kuriais organinės fazės/buferinio tirpalo mišiniais.

Negalima naudoti priedų, pvz., jonų porų reagentų, nes jie gali veikti nejudamosios fazės sorbcines savybes. Tokie nejudamosios fazės pokyčiai gali būti negrįžtami. Dėl šios priežasties privaloma, kad bandymai naudojant priedus būtų atliekami atskirose kolonėlėse.

1.7.4. **Tirpiniai**

Bandomoji ir etaloninė medžiagos turi būti ištirpintos judamojoje fazėje.

1.8. BANDYMO PROCEDŪRA

1.8.1. **Bandymo sąlygos**

Darant matavimus turi būti registruojama temperatūra. Sąlygų pastovumui užtikrinti labai rekomenduojama kolonėlę laikyti termostatuojamoje kameroje, kai daromi kalibravimo, vertinimo ir bandomosios medžiagos matavimai.

1.8.2. **Eliuento sulaikymo trukmės t_o nustatymas**

Eliuento sulaikymo trukmei nustatyti galima taikyti du skirtingus metodus (žr. taip pat 1.2 skirsnį).

1.8.2.1. *Eliuento sulaikymo trukmės nustatymas naudojant homologines serijas*

Įrodyta, kad šiuo metodu gaunamos patikimos ir etaloninės t_o vertės. Detalės pateiktos bandymo metodo A.8 „Pasiskirstymo koeficientas (n–oktanolis/vanduo), HPLC metodas“ aprašyme.

1.8.2.2. *Eliuento sulaikymo trukmės nustatymas naudojant inertiškas medžiagas, kurių nesulaiko kolonėlė*

Metodas pagrįstas formamido, karbamido ar natrio nitrato tirpalų injekcija. Matavimai turi būti daromi bent du kartus.

1.8.3. **Sulaikymo trukmės t_R nustatymas**

Etaloninės medžiagos turi būti parinktos, kaip aprašyta 1.3 skirsnyje. Jų sulaikymo trukmei nustatyti medžiagos gali būti įšvirkštos kaip mišrusis etalonas, jei būtų patvirtinta, kad kiekvieno etaloninio standarto sulaikymo trukmei kiti esantys etaloniniai standartai įtakos neturi. Kalibruoti būtina lygiais tarpais bent du kartus per dieną, kad būtų galima atsižvelgti į netikėtus kolonėlės veikimo pokyčius. Gera praktika reikalauja, kad kalibravimo injekcijos būtų daromos prieš ir po bandomosios medžiagos injekcijos, norint patikrinti, ar neįvyko sulaikymo trukmės poslinkis. Bandomosios medžiagos kuo mažesniais kiekiais (kad būtų išvengta kolonėlės perkrovos) įšvirkščiamos atskirai ir nustatoma jų sulaikymo trukmė.

▼C1

Matavimo patikimumui padidinti turi būti daromi bent du matavimai. Atskirų matavimų log K_{oc} turi skirtis mažiau kaip 0,25 log vieneto.

1.8.4. **Įvertinimas**

Pagal eliuento sulaikymo trukmę t_o ir pasirinktų etaloninių medžiagų t_R taikant 4 lygtį apskaičiuojami sulaikymo faktoriai k' (žr. 1.2 skirsnį). Etaloninių medžiagų log k' duomenys brėžiami grafike pagal jų log K_{oc} vertes, gautas įkrovos pusiausvyros bandymuose ir pateiktas priedėlio 1 ir 3 lentelėse. Toliau pagal šį grafiką gauta bandomosios medžiagos log k' vertė yra naudojama jos log K_{oc} vertei nustatyti. Jei gauti rezultatai rodo, kad bandomosios medžiagos log K_{oc} yra už kalibravimo intervalo ribų, bandymą reikia pakartoti naudojant kitas labiau tinkamas etalonines medžiagas.

2. **DUOMENYS IR ATASKAITA**

Ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

— bandomosios ir etaloninės medžiagos identifikavimas bei jų grynumas ir, jei tinka, pK_a vertės,

— įrangos ir darbo sąlygų aprašymas, pvz., analizės (ir apsauginės) kolonėlės tipas bei matmenys, aptikimo būdas, judamoji fazė (komponentų santykis ir pH), bandymų temperatūros intervalas,

— eliuento sulaikymo trukmė ir jos nustatymo metodas,

— į kolonėlę įšvirkštos bandomosios ir etaloninės medžiagos kiekiai,

— kalibravimui naudotų etaloninių medžiagų sulaikymo trukmė,

— regresijos kreivės detalės (log k' pagal log K_{oc}) ir šios kreivės grafikas,

— vidutiniai sulaikymo duomenys ir įvertinta bandomosios medžiagos log K_{oc} vertė,

— chromatogramos.

3. **NUORODOS**

1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, chapt. 4, McGraw-Hill, New York.

2) J. Hodson, N.A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1 67.

3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, 1050–1059.

4) C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, 227–231.

5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, 297–312.

▼C1

6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, 831–832.

7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, 833–846.

8) W. Kordel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121–128.

9) M. Mueller, W. Kordel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), 2493–2504.

10) W. Kordel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), 2341–2352.

11) B. von Oepen, W. Kordel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, 285–304.

12) W. Kordel, G. Kotthoff, J. Muller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373–1384.

▼C1

Priedėlis

1 lentelė

Dirvožemių ir nuotekų dumblų K_{oc} verčių ir HPLC atrankos metodu apskaičiuotų verčių palyginimas ([1]), ([2])

Medžiaga	CAS Nr.	Nuotek ų dumblo log K_{oc}	log K_{oc} HPLC	A	Dirvo žemių log K_{oc}	log K_{oc} HPLC	A
Atrazinas	1912–24–9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuronas	330–55–2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fentionas	55–38–9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuronas	150–68–5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantrenas	85–01–8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Benzoinės rūgšties fenilesteris	93–99–2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamidas	55–21–0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-nitrobenzamidas	619–80–7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilidas	103–84–4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilinas	62–53–3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-dichloranilinas	95–82–9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

([1]) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121–128.
([2]) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107–119.

2 lentelė

Tarplaboratorinio palyginimo bandymo (11 dalyvaujančių laboratorijų), atlikto HPLC metodui patobulinti ir tinkamumui patvirtinti, rezultatai ([1])

Medžiaga	CAS-Nr.	log K_{oc}	K_{oc}	log K_{oc}
		(OECD 106)	(HPLC-metodas)	
Atrazinas	1912–24–9	1,81	78 + 16	1,89
Monuronas	150–68–5	1,99	100 + 8	2,00
Triapentenolis	77608–88–3	2,37	292 + 58	2,47
Linuronas	330–55–2	2,59	465 + 62	2,67
Fentionas	55–38–9	3,31	2 062 + 648	3,31

([1]) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373–1384.

▼C1

3 lentelė

Rekomenduojamos etaloninės medžiagos HPLC atrankos metodui, pagrįstam duomenimis apie adsorbciją dirvožemiu

Etaloninė medžiaga	CAS-Nr.	log K_{oc} vidutinės vertės pagal įkrovos pusiausvyrą	K_{oc} duomenų skaičius	log S.D.	Šaltinis
Acetanilidas	103–84–4	1,25	4	0,48	[a]
Fenolis	108–95–2	1,32	4	0,70	[a]
2-Nitrobenzamidas	610–15–1	1,45	3	0,90	[b]
N, N-dimetilbenzamidas	611–74–5	1,52	2	0,45	[a]
4-Metilbenzamidas	619–55–6	1,78	3	1,76	[a]
Metilbenzoatas	93–58–3	1,80	4	1,08	[a]
Atrazinas	1912–24–9	1,81	3	1,08	[c]
Izoproturonas	34123–59–6	1,86	5	1,53	[c]
3 -Nitrobenzamidas	645–09–0	1,95	3	1,31	[b]
Anilinas	62–53–3	2,07	4	1,73	[a]
3,5-Dinitrobenzamidas	121–81–3	2,31	3	1,27	[b]
Karbendazimas	10605–21-	2,35	3	1,37	[c]
Triadimenolis	55219–65–3	2,40	3	1,85	[c]
Triazoksidas	72459–58–6	2,44	3	1,66	[c]
Triazofosas	24017–47– 4017–47–8	2,55	3	1,78	[c]
Linuronas	330–55–2	2,59	3	1,97	[c]
Naftalenas	91–20–3	2,75	4	2,20	[a]
Endosulfandiolis	2157–19–9	3,02	5	2,29	[c]
Metiokarbas	2032–65–7	3,10	4	2,39	[c]
Rūgštusis geltonas 219	63405–85–6	3,16	4	2,83	[a]
1,2,3-trichlorobenzenas	87–61–6	3,16	4	1,40	[a]
y-HCH	58–89–9	3,23	5	2,94	[a]
Fentionas	55–38–9	3,31	3	2,49	[c]
Tiesioginis raudonasis 81	2610–11–9	3,43	4	2,68	[a]
Pirazofosas	13457–18–6	3,65	3	2,70	[c]
α-Endosulfanas	959–98–8	4,09	5	3,74	[c]
Dichlofopmetilas	51338–27–3	4,20	3	3,77	[c]
Fenantrenas	85–01–8	4,09	4	3,83	[a]
Bazinis mėlynasis 41 (mišinys)	26850–47–5 12270–13–2	4,89	4	4,46	[a]
DDT	50–29–3	5,63		—	[b]

[a] W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01 044 (1994).
[b] B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285–304
[c] Pramonės pateikti duomenys.

▼M7

C.20. DAPHNIA MAGNA REPRODUKCIJOS BANDYMAS

ĮVADAS

Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) 211 (2012). EBPO bandymų gairės, atsižvelgiant į mokslo pažangą, yra periodiškai peržiūrimos ir atnaujinamos. Reprodukcijos bandymo gairės 211 kilo iš bandymų gairių 202, II dalies, *Daphnia* sp. reprodukcijos bandymas (1984). Bendrai visų buvo pripažinta, kad duomenys, gauti taikant testą, atitinkantį TG 202, gali būti kintami. Todėl įdėta daug pastangų norint nustatyti šių duomenų kintamumo priežastis, siekiant sukurti geresnį bandymų metodą. Bandymų gairės 211 pagristos šių įvairių tyrimo darbų, tarplaboratorinių tyrimų ir tinkamumo patvirtinimo tyrimų, atliktų 1992 m. (1), 1994 m. (2) ir 2008 m. (3), rezultatais.

Pagrindiniai skirtumai tarp reprodukcijos bandymo gairių pirmosios versijos (TG 202, 1984 m.) ir antrosios versijos (TG 211, 1998 m.) yra:

— rekomenduojama naudoti rūšis yra *Daphnia magna*;

— bandymo trukmė – 21 para;

— atliekant pusiau statinius bandymus, kiekvienai atskirai koncentracijai, naudojamų gyvūnų skaičius buvo sumažintas nuo ne mažiau kaip 40 gyvūnų, pageidautina, suskirstytų į keturias grupes po 10 gyvūnų, iki ne mažiau kaip 10 gyvūnų, laikomų atskirai (nors atliekant dinaminius bandymus galima naudoti skirtingas schemas);

— pateiktos patikslintos rekomendacijos dėl bandymų terpės ir maitinimo sąlygų.

— Pagrindiniai skirtumai tarp reprodukcijos bandymo gairių antrosios versijos (TG 211, 1998 m.) ir šios versijos yra:

— įtrauktas 7 priedėlis, kuriame aprašytos naujagimių lyties nustatymo, jei reikia, procedūros. Kaip ir pagal ankstesnes šio bandymų metodo versijas, lyčių santykis yra neprivaloma vertinamoji baigtis;

— atsako kintamasis – gyvų palikuonių vienam išgyvenusiam motininiam gyvūnui skaičius, buvo papildytas dar vienu dafnijų reprodukcijos atsako kintamuoju, t. y. suminiu skaičiumi gyvų palikuonių, bandymo pabaigoje gautų vienai bandymo pradžioje buvusiai motininei dafnijai, į analizę neįtraukiant atsitiktinio ir (arba) netyčinio motininių gyvūnų gaištamumo. Papildomo atsako kintamojo tikslas – suderinti šį atsako kintamąjį su kitais reprodukcijos bandymų su bestuburiais metodais. Be to, taikant šį bandymų metodą, galima pašalinti šio atsako kintamojo paklaidos šaltinį, t. y. netyčinį ir (arba) atsitiktinį motininių gyvūnų gaištamumą, jei jis pasitaikytų veikimo laikotarpiu.

— įtraukti papildomi statistiniai nurodymai dėl bandymo schemos ir dėl rezultatų apdorojimo, abu juos pritaikant EC_X (pvz., EC_{10} ar EC_{50}) ir NOEC/LOEC būdams;

— Įtrauktas ribinis bandymas.

Taikomų sąvokų apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

Pagrindinis šio bandymo tikslas – įvertinti cheminių medžiagų poveikį *Daphnia magn*a reprodukcijos našumui. Šiuo tikslu jaunos moteriškos lyties dafnijos (motininiai gyvūnai), kurių amžius bandymo pradžioje jaunesnis kaip 24 h, yra veikiamos kelių koncentracijos verčių vandenyje ištirpinta bandomąja chemine medžiaga. Bandymo trukmė – 21 para. Baigus bandymą vertinamas suminis gautų gyvų palikuonių skaičius. Motininių gyvūnų reprodukcijos našumą galima išreikšti kitais būdais (pvz., gyvų palikuonių, gautų iš vieno gyvūno per parą nuo pirmos palikuonių pastebėjimo dienos, skaičiumi), tačiau šie skaičiai turėtų būti pateikti ataskaitoje papildomai prie gyvų palikuonių, gautų iki bandymo pabaigos, suminio skaičiaus. Dėl ypatingos pusiau statinio bandymo schemos,

▼M7

palyginti su kitais bestuburių reprodukcijos bandymų metodais, taip pat galima suskaičiuoti iš kiekvieno atskiro motininio gyvūno gautus gyvus palikuonis. Kitaip nei taikant kitus bestuburių reprodukcijos bandymų metodus, į vertinimo duomenis galima neįtraukti bandymo laikotarpiu atsitiktinai ir (arba) netyčia žuvusių motininių gyvūnų palikuonių skaičiaus. Todėl, jei motininių gyvūnų gaištamumas pasitaiko apdorotų kartotinių ėminių induose, reikėtų ištirti, ar gaištamumas atitinka koncentracijos ir atsako priklausomybės kreivę ar jos neatitinka, pvz., ar yra reikšminga atsako regresija su teigiamu krypties koeficientu bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos atžvilgiu (čia gali būti naudingas statistinis kriterijus, pvz., Cochran-Armitage tendencijos kriterijus). Jei gaištamumas neatkartoja koncentracijos ir atsako priklausomybės kreivės, šie kartotiniai ėminiai su žuvusiais motininiais gyvūnais neturėtų būti įtraukti į rezultatų analizę. Jei gaištamumas atkartoja koncentracijos ir atsako priklausomybės kreivę, motininių gyvūnų gaištamumą reikėtų priskirti prie bandomosios cheminės medžiagos poveikio ir kartotiniai ėminiai neturėtų būti pašalinti iš analizės. Jei motininis gyvūnas žūsta bandymo metu atsitiktinai dėl netinkamų veiksmų ar nelaimingo atsitikimo, arba netyčia dėl nepaaiškinamo incidento, nesusijusio su bandomosios cheminės medžiagos poveikiu, arba jei paaiškėja, kad gyvūnas yra vyriškos lyties, kartotinis ėminys pašalinamas iš analizės (daugiau pateikta 51 pastraipoje). Bandomosios cheminės medžiagos toksinis poveikis reprodukcijos našumui yra išreiškiamas kaip ECx, duomenis derinant netiesinės regresijos metodu prie atitinkamo modelio, kad būtų įvertinta koncentracija, kuriai esant reprodukcijos našumas sumažėtų x %, arba kaip NOEC ar LOEC vertė (4). *Pageidautina, kad bandymų koncentracijos vertės aprėptų mažiausią iš naudotų poveikio koncentracijos verčių (pvz., EC_{10}), nes tai reikštų, kad ši vertė apskaičiuojama interpoliavimo, o ne ekstrapoliavimo būdu.*

Ataskaitoje taip pat turėtų būti pateikta išgyvenusių motininių gyvūnų dalis ir pirmosios vados atsiradimo laikas. Taip pat galima tirti kitokį su chemine medžiaga susijusį poveikį parametrams, pvz., augimui (ilgiui), ir galimam populiacijos prieaugio greičiui (žr. 44 pastraipą).

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

Renkantis reprodukcijos bandymo reikiamą koncentracijos verčių intervalą, gali būti naudingi su *Daphnia magna* atliekamo ūmaus toksiškumo bandymo rezultatai (žr. šio priedo C.2 skyrių *Daphnia* sp. *ūmaus judrumo slopinimo bandymas*). Turėtų būti žinomas bandomosios cheminės medžiagos tirpumas vandenyje ir garų slėgis, be to, reikėtų turėti patikimą analizės metodą medžiagos kiekiui bandymo tirpaluose nustatyti, kurio atgavimo laipsnis ir nustatymo riba būtų žinomi.

Informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą, kuri gali būti naudinga bandymo sąlygoms nustatyti, sudaro struktūrinė formulė, cheminės medžiagos grynumas, atsparumas šviesai, stabilumas bandymo sąlygomis, pKa, P_{ow} ir lengvo biologinio skaidymo bandymo rezultatai (žr. šio priedo C.4 (Lengvo biodegradavimo nustatymas) ir C.29 (Lengvas biodegradavimas. CO_2 sandariuose induose) skyrius).

BANDYMO TINKAMUMAS

Bandymas laikomas tinkamu, jei kontroliniai ėminiai atitinka nurodytus charakteristikų kriterijus:

— bandymo pabaigoje motininių gyvūnų gaištamumas (moteriškos lyties dafnijų) nesiekia 20 %;

— iš vieno iki bandymo pabaigos išgyvenusio motininio gyvūno gautų gyvų palikuonių vidutinis skaičius yra > 60.

Pastaba. Tas pats tinkamumo kriterijus (20 %) gali būti taikomas atsitiktiniam ir netyčiniam kontrolinių ėminių, taip pat kiekvienos bandymo koncentracijos ėminių motininių gyvūnų gaištamumui.

▼M7

METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

Bandymo indai ir kita aparatūra, kuri liečiasi su bandymo tirpalais, turėtų būti pagaminta vien tik iš stiklo arba kitos chemiškai inertinės medžiagos. Bandymo indai paprastai yra laboratorinės stiklinės.

Papildomai reikalinga visa ar tam tikra įranga:

— deguonies matuoklis (su mikroelektrodu arba kitokiu įtaisu, tinkamu ištirpusiam deguoniui mažo tūrio ėminiuose matuoti);

— tinkamas įtaisas temperatūrai kontroliuoti;

— pH-metras;

— įranga vandens kietumui nustatyti;

— įranga suminės organinės anglies vandenyje koncentracijai (TOC) ar įranga cheminiam deguonies suvartojimui (COD) nustatyti;

— tinkama aparatūra apšvietimo režimui kontroliuoti ir šviesos stipriui matuoti.

Bandymo organizmai

Bandymui reikėtų naudoti *Daphnia magna* Straus ([1]).

Kloną geriau būtų identifikuoti pagal genotipą. Tyrimas (1) parodė, kad A klono (jo kilmė – IRCHA (*Institut de Recherche en Chimie Appliquee*), Prancūzija) (5) reprodukcijos našumas visą laiką atitinka tinkamumo kriterijų, pagal kurį auginant šiame metode aprašytomis sąlygomis vieno gyvo likusio motininio gyvūno vidutinis palikuonių skaičius ≥ 60. Tačiau priimtini ir kiti klonai, jei parodoma, kad dafnijų kultūra atitinka bandymo tinkamumo kriterijus.

Bandymo pradžioje gyvūnai turėtų būti jaunesnio kaip 24 h amžiaus ir tai neturėtų būti pirmoji palikuonių karta. Jos turėtų būti gautos iš sveikos pradinės kultūros (t. y. neturi būti streso požymių, tokių kaip, didelis gaištamumas, vyriškos lyties atstovai ir efipijų buvimas, pirmosios vados vėlavimas, gyvūnų spalvos pasikeitimas ir kt.). Pradinės kultūros gyvūnus reikėtų laikyti tokiomis sąlygomis (šviesos, temperatūros, terpės, maitinimo ir gyvūnų skaičiaus tūrio vienetui), kurios būtų panašios į bandymo sąlygas. Jei bandant naudota kultūros terpė skiriasi nuo įprastinės dafnijų kultūros, motininių gyvūnų stresui išvengti pagal gerąją praktiką reikalaujama leisti dafnijoms aklimatizuotis maždaug tris savaites (t. y. vienos kartos laikotarpiu).

Bandymo terpė

Rekomenduojama šiems bandymams naudoti visiškai apibrėžtą terpę. Taip galima išvengti sunkiai apibūdinamų priedų naudojimo (pvz., jūros dumblių, dirvožemio ekstrakto), taigi pagerėja tarplaboratorinio standartizavimo galimybės. Buvo nustatyta, kad labiausiai tinka Elendt M4 (6) ir M7 terpės (žr. 2 priedėlį). Tačiau yra priimtinos ir kitos terpės (pvz., (7) (8)), jei jose išauginta dafnijų kultūra atitinka bandymui nustatytus tinkamumo kriterijus.

([1]) Galima naudoti kitas dafnijų rūšis, jei jos atitinka reikiamus tinkamumo kriterijus (su kontrolinių ėminių reprodukcijos našumu susijęs tinkamumo kriterijus turėtų būti taikomas *visoms* rūšims). Jei naudojamos kitų rūšių dafnijos, jas reikėtų aiškiai identifikuoti ir jų naudojimą pagrįsti.

▼M7

Jei naudojamos terpės su neapibrėžtais priedais, šie priedai turėtų būti aiškiai apibūdinti ir bandymo ataskaitoje turėtų būti informacija apie jų sudėtį, ypač apie organinės anglies kiekį, nes ji gali būti tiekiamo maisto dalis. Rekomenduojama nustatyti organinio priedo pradinio tirpalo suminę organinę anglį (TOC) ir (arba) cheminį deguonies suvartojimą (COD) ir įvertinti jų indėlį į paruoštos terpės TOC ar COD. Papildomai rekomenduojama, kad terpės (t. y. prieš pridedant dumblių) TOC koncentracija būtų mažesnė kaip 2 mg/l (9).

Bandant metalų turinčias chemines medžiagas, svarbu suvokti, kad bandomosios terpės savybės (pvz., kietumas, chelatinimo geba) gali turėti įtakos bandomosios cheminės medžiagos toksiškumui. Dėl šios priežasties pageidautina turėti visiškai apibrėžtą terpę. Tačiau vienintelės visiškai apibrėžtos terpės, kurios, kiek šiandien žinoma, tiktų ilgą laiką auginti *Daphnia magna*, yra Elendt M4 ir M7. Abiejose terpėse esama chelanto EDTA. Šis darbas (2) parodė, kad, reprodukcijos bandymą atliekant M4 ir M7 terpėje, kadmio „tariamasis toksiškumas“ paprastai yra mažesnis palyginti su EDTA neturinčia terpe. Todėl M4 ir M7 nerekomenduojama naudoti bandant metalų turinčias chemines medžiagas, taip pat reikėtų vengti naudoti terpes, turinčias žinomus chelantus. Jei cheminės medžiagos turi metalų, galima patarti naudoti alternatyviąją terpę, pvz., ASTM atkurtojo kieto gėlo vandens terpę (9), kuri neturi EDTA. Šis ASTM atkurtojo kieto gėlo vandens ir jūros dumblių ekstrakto derinys (10) tinka ilgą laiką auginti *Daphnia magna* (2).

Ištirpusio deguonies koncentracija bandymo pradžioje ir visą bandymų laikotarpį turėtų būti didesnė kaip 3 mg/l. pH turėtų būti 6–9 intervale ir kurio nors bandymo metu paprastai neturėtų kisti daugiau kaip 1,5 vieneto. Rekomenduojamas didesnis kaip 140 mg/l kietumas (išreikštas $CaCO_3$). Bandymai, atlikti esant šiai arba didesnei koncentracijai, parodė, kad reprodukcijos našumas atitinka tinkamumo kriterijus (11) (12).

Bandymų tirpalai

Pasirinktų koncentracijos verčių bandymo tirpalai paprastai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Pradinius tirpalus reikėtų ruošti nenaudojant jokių tirpiklių ar dispergentų, jei įmanoma, maišant arba purtant bandomąją cheminę medžiagą bandymo terpėje mechaninėmis priemonėmis, pvz., naudojant maišyklę, purtyklę, ultragarsinę vonelę, ar taikant kitus tinkamus metodus. Prieš dedant bandymų organizmus, pageidautina veikti bandymų sistemas bandomąja chemine medžiaga tokios koncentracijos, kurią numatoma naudoti atliekant tyrimą, ir taip ilgai, kad būtų galima įrodyti veikimo koncentracijos verčių stabilumą. Jei bandomoji cheminė medžiaga sunkiai tirpsta vandenyje, reikėtų taikyti procedūras, aprašytas EBPO rekomendaciniame dokumente apie sunkiai apdorojamas chemines medžiagas (13). Reikėtų vengti naudoti tirpiklius ar dispergentus, bet kartais jie gali būti būtini, kad būtų galima gauti dozavimui tinkamos koncentracijos pradinį tirpalą.

Be bandymo koncentracijos ėminių reikėtų bandyti reikiamą skaičių skiedimo vandens kartotinių kontrolinių ėminių ir, jei tinka, reikiamą skaičių tirpiklio kartotinių kontrolinių ėminių. Atliekant bandymą, reikėtų naudoti tik tuos tirpiklius ar dispergentus, kuriuos tiriant įrodyta, kad jie nedaro jokio reikšmingo poveikio atsako kintamiesiems ar šis poveikis yra labai mažas. Tinkami tirpikliai

▼M7

(pvz., acetonas, etanolis, metanolis, dimetilformamidas ir trietilenglikolis) ir dispergentai (pvz., Cremophor RH40, 0,01 % metilceliuliozė ir HCO-40) kaip pavyzdžiai yra pateikti (13). Jei naudojamas tirpiklis, jo galutinė koncentracija neturėtų būti didesnė kaip 0,1 ml/l (13) ir ji turėtų būti vienoda visose bandymo induose, išskyrus skiedimo vandens kontrolinių ėminių indus. Tačiau reikėtų imtis visų priemonių, kad tirpiklio koncentracija būtų kuo mažesnė.

PROCEDŪRA

Veikimo sąlygos

Trukmė

Bandymo trukmė – 21 para.

Įkrova

Jei bandymams atlikti nebūtina dinaminių bandymų schema, motininiai gyvūnai laikomi atskirai po vieną inde, paprastai su 50–100 ml terpės kiekviename inde (*Daphnia magna* atveju, bet galimas mažesnis tūris, ypač jei dafnijos mažesnės, pvz., *Ceriodaphnia dubia*).

Atsižvelgiant į analizės procedūros bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatytus reikalavimus, kartais gali prireikti didesnio tūrio, nors taip pat leidžiama sujungti kartotinius ėminius cheminei analizei atlikti. Jei naudojamas didesnis kaip 100 ml tūris, gali tekti padidinti dafnijų maisto davinį, kad turimo maisto pakaktų ir būtų užtikrinta tinkamumo kriterijų atitiktis.

Bandymo gyvūnai

Pusiau statiniams bandymams kiekvienai koncentracijai imama bent 10 atskirai laikomų gyvūnų ir bent 10 atskirai laikomų kontrolinių ėminių serijos gyvūnų.

Buvo parodyta, kad dinaminiams bandymams kiekvienai koncentracijai tinka naudoti 40 gyvūnų, padalytų į keturias grupes po 10 gyvūnų (1). Galima naudoti mažiau bandymo organizmų, bet kiekvienai koncentracijai rekomenduojama naudoti ne mažiau kaip po 20 gyvūnų, padalytų dviem ėminiams ar daugiau su vienodu gyvūnų skaičiumi (pvz., keturiems ėminiams su 5 dafnijomis kiekvienam ėminiui). Reikia pažymėti, kad atliekant bandymus, kai gyvūnai laikomi grupėmis, iš statistinės analizės nebus įmanoma pašalinti nei vieno palikuonio, jei reprodukcijos pradžioje atsitiktinai ar netyčia nugaišta motininiai gyvūnai, todėl šiais atvejais reprodukcijos našumą reikėtų išreikšti gautų gyvų palikuonių skaičiumi vienam bandymo pradžioje buvusiam motininiam gyvūnui.

Apdorojimo dozės turėtų būti priskirtos bandymų indams, o toliau visi bandymų indai turėtų būti tvarkomi atsitiktiniu būdu. Taip nedarant, gali atsirasti sisteminga paklaida, kuri galėtų būti aiškinama koncentracijos poveikiu. Ypač jei bandymo vienetai tvarkomi tokia seka, kokia jie buvo apdoroti, arba pagal koncentraciją, todėl kai kurie su laiku susiję veiksniai, pvz., operatoriaus nuovargis ar kita klaida esant didesnėms koncentracijos vertėms galėtų turėti didesnį poveikį. Be to, jei bandymo rezultatai galimai yra susiję su bandymo pradinėmis ar aplinkos sąlygomis, pvz., padėtimi laboratorijoje, reikėtų svarstyti galimybę stabdyti bandymą.

Maitinimas

Atliekant pusiau statinius bandymus geriau maitinti kasdien, tačiau ne mažiau kaip tris kartus per savaitę (t. y. kartu su terpės pakeitimu). Reikėtų atsižvelgti į galimą veikimo koncentracijos verčių sumažėjimą dėl praskiedimo dedant maistą ir to kiek įmanoma vengti imant didelės koncentracijos dumblių suspensiją. Nukrypimai nuo šių sąlygų (pvz., dinaminių bandymų) nurodomi ataskaitoje.

Atliekant bandymą motininių gyvūnų maistą turėtų sudaryti šių gyvų dumblių ląstelės: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (seniau *Selenastrum capricornutum*) ir *Desmodesmus subspicatus* (seniau *Scenedesmus subspicatus*). Tiekiamas maistas turėtų būti apskaičiuotas pagal organinės anglies (C) kiekį,

▼M7

duodamą kiekvienam motininiam gyvūnui. Tyrimas (14) parodė, kad *Daphnia magna* pakanka duoti 0,1–0,2 mg C/dafnijai/parai, kad būtų gautas reikiamas gyvų palikuonių skaičius, kuris atitiktų bandymo tinkamumo kriterijus. Maistą galima duoti vienodu kiekiu visą bandymo trukmę, ar, jei norima, mažiau bandymo pradžioje ir daugiau bandymo eigoje, atsižvelgiant į motininių gyvūnų augimą. Šiuo atveju davinys turi visą laiką atitikti rekomenduotą 0,1–0,2 mg C/dafnijai/parai intervalą.

Jei maisto kiekiui nustatyti reikia naudoti pakaitinius parametrus, pvz., dumblių ląstelių skaičių ar šviesos absorbciją (t. y., kad būtų patogiau, nes anglies kiekiui nustatyti reikia daug laiko), kiekviena laboratorija turėtų daryti savo nomogramą, kuri pakaitinį parametrą susietų su anglies kiekiu dumbliuose (žr. 3 priedėlį dėl patarimo, kaip gauti nomogramą). Nomogramas reikėtų tikrinti bent kartą per metus ar dažniau, jei kinta dumblių auginimo sąlygos. Buvo nustatyta, kad šviesos absorbcija yra geresnis anglies kiekio pakaitinis parametras nei ląstelių skaičius (15).

Dafnijas reikėtų maitinti koncentruota dumblių suspensija, kad į bandymų indus įpiltos kultūros terpės tūris būtų kuo mažesnis. Dumblius galima koncentruoti centrifugavimu ir ruošti naują suspensiją dafnijų kultūros terpėje.

Apšvietimas

16 h trukmės apšvietimas, kurio intensyvumas, išmatuotas indo vandens paviršiuje, būtų ne didesnis kaip 15–20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Jei apšvietimo matavimo prietaisai kalibruoti liuksais, šaltos baltos šviesos 1 000–1 500 liuksų apšvieta beveik atitinka rekomenduotą 15–20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ šviesos stiprį.

Temperatūra

Bandymų terpės temperatūra turėtų būti 18–22 °C. Tačiau, atliekant kurį nors bandymą, temperatūra neturėtų kisti daugiau kaip 2 °C, jei įmanoma, esant šioms dienos intervalo riboms (pvz., 18–20, 19–21 ar 20–22 °C). Temperatūrai kontroliuoti gali būti naudingas papildomas bandymų indas.

Aeravimas

Atliekant bandymą bandymo indai neturėtų būti aeruojami.

Bandymų schema

Intervalo nustatymo bandymas

Prireikus atliekamas intervalo nustatymo bandymas, pvz., imant penkių koncentracijos verčių bandomąją cheminę medžiagą ir du kartotinius kiekvienos koncentracijos ir kontrolinius ėminius. Sprendžiant dėl intervalo nustatymo bandymo koncentracijos verčių, gali būti naudinga papildoma informacija, gauta atliekant panašių cheminių medžiagų bandymus, ar žinios iš literatūros šaltinių apie ūmų toksiškumą dafnijoms ir (arba) kitiems vandens organizmams.

Intervalo nustatymo bandymo trukmė – 21 para arba tokia trukmė, kurios pakaktų patikimai prognozuoti poveikio lygius. Baigus bandymą, vertinama dafnijų reprodukcija. Reikėtų registruoti motininių gyvūnų skaičių ir palikuonių buvimą.

Galutinis bandymas

Paprastai reikėtų naudoti ne mažiau kaip penkias bandymų koncentracijos vertes, kurios aprėptų efektyviąją koncentraciją (pvz., EC_x), ir būtų išdėstytos geometrine progresija, kurios vardiklis turėtų būti ne didesnis kaip 3,2. Kiekvienai koncentracijai reikėtų naudoti reikiamą kartotinių ėminių skaičių (žr. 24–25 pastraipas). Reikėtų pagrįsti mažesnio nei penkių koncentracijos verčių

▼M7

skaičiaus naudojimą. Cheminės medžiagos neturėtų būti bandomos didesnės koncentracijos, nei jų tirpumo bandymų terpėje ribinė koncentracija. Prieš atliekant bandymą, patartina atsižvelgti į bandymų schemos statistinę galią ir taikyti reikiamus statistinius metodus (4). Nustatant koncentracijos verčių intervalą reikėtų turėti omenyje, kad:

i) kai dėl poveikio reprodukcijai vertinama EC_x, reikėtų naudoti pakankamą koncentracijos verčių skaičių jai nustatyti esant reikiamam pasikliovimo lygiui. Pageidautina, kad bandymo koncentracijos vertės aprėptų vertinamą EC_x, tam, kad EC_x būtų nustatoma interpoliacijos, o ne ekstrapoliacijos būdu. Vėliau atliekant statistinę analizę, geriau turėti daugiau bandymo koncentracijos verčių (pvz., 10), bet mažiau kiekvienos koncentracijos kartotinių ėminių (pvz., 5, kai suminis indų skaičius lieka pastovus) ir 10 kontrolinių ėminių.

ii) įvertinant LOEC ir (arba) NOEC, mažiausia bandymų koncentracija turėtų būti pakankamai maža, kad tai koncentracijai gautas reprodukcijos našumas, palyginti su kontroliniu ėminiu, nebūtų reikšmingai mažesnis. Jei taip nėra, bandymą reikėtų pakartoti su mažesne mažiausia koncentracija;

iii) įvertinant LOEC ir (arba) NOEC, didžiausia bandymų koncentracija turėtų būti pakankamai didelė, kad tai koncentracijai gautas reprodukcijos našumas, palyginti su kontroliniu ėminiu, būtų reikšmingai mažesnis. Jei taip nėra, bandymą reikėtų pakartoti su didesne didžiausia koncentracija, nebent kaip didžiausia pradinio bandymo koncentracija būtų naudojama maksimali koncentracija, kurios reikia lėtinio poveikio bandymams atlikti (t. y., 10 mg/l).

Jei atliekant intervalo nustatymo bandymą, nestebima jokio poveikio, esant didžiausiai koncentracijai (pvz., 10 mg/l), arba kai yra labai didelė tikimybė, kad, atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą kitiems organizmams, jos toksiškumas yra mažas arba jo nėra ir (arba) sugertis yra maža arba jos nėra, reprodukcijos bandymas gali būti atliekamas kaip ribinis bandymas, naudojant bandymo koncentraciją, pvz., 10 mg/l, ir kontrolinį ėminį. Apdorojimo ir kontrolinei grupei reikėtų naudoti dešimt kartotinių ėminių. Jei ribinį bandymą tektų atlikti dinaminio bandymo sistemoje, pakaktų mažiau kartotinių ėminių. Ribinis bandymas suteiks galimybę įrodyti, kad, esant ribinei koncentracijai, nėra statistiškai reikšmingo poveikio, bet jei poveikis registruojamas, paprastai reikėtų atlikti visą bandymą.

Kontroliniai ėminiai

Be bandomosios cheminės medžiagos ėminių serijos, bandoma viena bandymų terpės kontrolinių ėminių serija ir, jei tinka, viena tirpiklio ar dispergento kontrolinių ėminių serija. Naudojamo tirpiklio ar dispergento koncentracija turėtų atitikti koncentraciją induose su bandomąja chemine medžiaga. Reikėtų naudoti reikiamą kartotinių ėminių skaičių (žr. 23–24 pastraipas).

Paprastai tinkamai atliekant bandymą, kontrolinio (-ių) ėminio (-ių) variacijos koeficientas turėtų būti $\geq$ 25 %, skaičiuojant vidutiniam iš vieno motininio gyvūno gautų palikuonių skaičiui, ir jis turėtų būti pateiktas bandymo schemų su atskirai laikomais gyvūnais ataskaitose.

Bandymų terpės atnaujinimas

Bandymų terpės atnaujinimo dažnumas priklauso nuo bandomosios cheminės medžiagos, tačiau terpė turėtų būti atnaujinama bent tris kartus per savaitę. Jei pagal išankstinius stabilumo bandymus (žr. 7 pastraipą) bandomosios cheminės medžiagos koncentracija ilgiausiu (t. y. trijų parų) atnaujinimo laikotarpiu nėra pastovi (t. y. neatitinka 80–120 % nominalios koncentracijos ribų ar sumažėja iki mažesnės kaip 80 % išmatuotos pradinės koncentracijos), reikėtų numatyti dažnesnį terpės atnaujinimą arba atlikti dinaminį bandymą.

▼M7

Kai atnaujinama pusiau statinių bandymų terpė, paruošiama antra bandymų indų serija, ir į juos pernešami motininiai gyvūnai, pvz., tinkamo skersmens stikline pipete. Su dafnijomis pernešamos terpės tūris turėtų būti kuo mažesnis.

Stebėjimai

Stebėjimų rezultatai, gauti atliekant bandymą, registruojami duomenų lentelėse (pavyzdžiai pateikti 4 ir 5 priedėlyje). Jei reikia atlikti kitus matavimus (žr. 44 pastraipą), gali prireikti papildomų stebėjimų.

Palikuonys

Iš kiekvieno motininio gyvūno gautus palikuonis geriau atskirti ir skaičiuoti kasdien nuo pirmosios vados atsiradimo, kad jie nevartotų motininiams gyvūnams skirto maisto. Pagal šį bandymų metodą reikia skaičiuoti tik gyvus palikuonis, tačiau reikėtų registruoti neapvaisintų kiaušinių ar negyvų palikuonių skaičių.

Gaištamumas

Motininių gyvūnų gaištamumą pageidautina registruoti kasdien arba bent jau taip dažnai, kaip skaičiuojami palikuonys.

Kiti parametrai

Nors pagrindinis šio metodo tikslas – poveikio reprodukcijos našumui vertinimas, įmanoma gana kiekybiškai įvertinti kitus poveikio būdus, kad būtų įmanoma jų statistinė analizė. Galima registruoti reprodukcijos našumą vienam išgyvenusiam motininiam gyvūnui, t. y. gyvų palikuonių skaičių, gautą bandymo metu iš vieno išgyvenusio motininio gyvūno. Jį galima palyginti su pagrindiniu atsako kintamuoju (reprodukcijos našumu vienam motininiam gyvūnui bandymo pradžioje, kuris netyčia ar atsitiktinai nežuvo atliekant bandymą). Jei motininių gyvūnų gaištamumas pasitaiko apdorotų kartotinių ėminių induose, reikėtų ištirti, ar gaištamumas atitinka koncentracijos ir atsako priklausomybės kreivę ar jos neatitinka, pvz., ar yra reikšminga atsako regresija su teigiamu krypties koeficientu bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos atžvilgiu (čia gali būti naudingas statistinis kriterijus, pvz., Cochran-Armitage tendencijos kriterijus). Jei gaištamumas neatkartoja koncentracijos ir atsako priklausomybės kreivės, šie kartotiniai ėminiai su žuvusiais motininiai gyvūnais neturėtų būti įtraukti į rezultatų analizę. Jei gaištamumas atkartoja koncentracijos ir atsako priklausomybės kreivę, motininių gyvūnų gaištamumą reikėtų priskirti prie bandomosios cheminės medžiagos poveikio ir kartotiniai ėminiai neturėtų būti pašalinti iš rezultato analizės. Labai pageidautina, kad būtų atliekami augimo matavimai, nes jie suteikia duomenų apie galimą subletalų poveikį, kurie gali būti naudingi reprodukcijos rezultatams papildyti; baigiant bandymą rekomenduojama išmatuoti motininių gyvūnų ilgį (t. y. kūno ilgį, išskyrus analinį dyglį). Kiti parametrai, kuriuos galima išmatuoti ar apskaičiuoti, yra pirmosios vados (ir vėlesnių vadų) atsiradimo laikas, vieno gyvūno vadų skaičius ir dydis, neapvaisintų kiaušinių skaičius, vyriškos lyties atstovų (EBPO, 2008 m.) ar efipijų buvimas ir būdingasis populiacijos prieaugio greitis (žr. 1 priedėlį dėl apibrėžčių ir 7 priedėlį dėl naujagimių lyties nustatymo).

Analizinių nustatymų ir matavimų dažnumas

Deguonies koncentracija, temperatūra, kietumas ir pH vertės turėtų būti matuojamos bent kartą per savaitę prieš ir po terpės atnaujinimo kontroliniame (-iuose) ėminyje (-iuose) ir induose su didžiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija.

Atliekant bandymą bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertės nustatomos reguliariais laiko tarpais.

Jei atliekami pusiau statiniai bandymai, dėl kurių daroma prielaida, kad bandomosios medžiagos koncentracija yra nominalios koncentracijos ± 20 % (t. y. 80–120 % intervale, žr. 6, 7 ir 39 pastraipas), rekomenduojama nustatyti bent didžiausią ir mažiausią bandymo koncentraciją iš karto po tirpalo paruošimo ir

▼M7

prieš pat jo atnaujinimą pirmąją bandymo savaitę (t. y. turi būti atliekama to paties tirpalo ėminių analizė iš karto po tirpalo paruošimo ir jį atnaujinant). Vėliau šis nustatymas turėtų būti kartojamas bent kas savaitę.

Jei atliekant bandymus nesitikima, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentracija galėtų likti nominalios vertės ± 20 %, būtina analizuoti visų koncentracijos verčių bandymo tirpalus iš karto po jų paruošimo ir prieš pat atnaujinimą. Tačiau jei atliekant bandymus išmatuota pradinė bandomosios cheminės medžiagos koncentracija nėra nominalios vertės ± 20 %, bet galima gauti pakankamai įrodymų, kad pradinės koncentracijos vertės yra pakartojamos ir stabilios (t. y. 80–120 % pradinių koncentracijos verčių intervale), bandymo antros ir trečios savaitės cheminių analizių skaičių galima sumažinti ir apsiriboti didžiausios ir mažiausios bandymo koncentracijos nustatymu. Visais atvejais prieš atnaujinimą bandomosios cheminės medžiagos koncentracija turi būti nustatoma tik viename kiekvienos bandymo koncentracijos kartotinio ėminio inde.

Jei atliekamas dinaminis bandymas, ėminius galima imti pusiau statinių bandymų ėminių ėmimo režimu (bet „senų“ tirpalų analizė šiuo atveju netinka). Tačiau, siekiant įsitikinti, ar bandymo koncentracijos vertės yra stabilios, patartina pirmąją savaitę ėminius imti dažniau (pvz., trys matavimų serijos). Atliekant šio tipo bandymus, skiediklio srautas ir bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti tikrinami kasdien.

Jei yra įrodymų, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentracija visą bandymo trukmę gali būti nominalios koncentracijos ar išmatuotos pradinės koncentracijos vertės ± 20 %, rezultatai gali būti pagrįsti nominaliomis ar išmatuotomis pradinėmis vertėmis. Jei nuokrypis nuo nominalios ar išmatuotos pradinės koncentracijos yra didesnis kaip ± 20 %, rezultatus reikėtų išreikšti kaip laikinį svertinį vidurkį (skaičiavimo rekomendacijos pateiktos 6 priedėlyje).

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

Šio bandymo tikslas – nustatyti bandomosios cheminės medžiagos poveikį reprodukcijos našumui. Reikėtų apskaičiuoti suminį vieno motininio gyvūno palikuonių skaičių kiekvienam bandymų indui (t. y. kartotiniam ėminiui). Be to, galima apskaičiuoti reprodukciją, pagrįstą išgyvenusiam motininiam organizmui gautų gyvų palikuonių skaičiumi. Tačiau ekologiniu požiūriu tinkamiausias atsako kintamasis yra suminis gyvų palikuonių skaičius, gautas vienam motininiam gyvūnui, kuris atsitiktinai ([1]) ar netyčia ([2]) nežuvo atliekant bandymą. Jei motininis gyvūnas atsitiktinai ar netyčia žūsta bandymo metu arba jei paaiškėja, kad gyvūnas yra vyriškos lyties, kartotinis ėminys pašalinamas iš analizės. Tuomet analizė bus pagrįsta mažesniu kartotinių ėminių skaičiumi. Jei motininių gyvūnų gaištamumas pasitaiko apdorotų kartotinių ėminių induose, reikėtų ištirti, ar gaištamumas atitinka koncentracijos ir atsako priklausomybės kreivę ar jos neatitinka, pvz., ar yra reikšminga atsako regresija su teigiamu krypties koeficientu bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos atžvilgiu (čia gali būti naudingas statistinis kriterijus, pvz., Cochran-Armitage tendencijos kriterijus). Jei gaištamumas neatkartoja koncentracijos ir atsako priklausomybės kreivės, šie kartotiniai ėminiai su žuvusiais motininiai gyvūnais neturėtų būti įtraukti į rezultatų analizę. Jei gaištamumas atkartoja koncentracijos ir atsako priklausomybės kreivę, motininių gyvūnų gaištamumą reikėtų priskirti prie bandomosios cheminės medžiagos poveikio ir kartotiniai ėminiai neturėtų būti pašalinti iš rezultato analizės.

Apibendrinant, kai poveikiui išreikšti naudojamos LOEC ir NOEC ar EC_x vertės, poveikį reprodukcijai rekomenduojama skaičiuoti naudojant abu pirmiau nurodytus atsako kintamuosius, t. y.

([1]) Atsitiktinis gaištamumas – su chemine medžiaga nesusijęs gaištamumas, sukeltas atsitiktinio įvykio (t. y. žinoma priežastis).

([2]) Netyčinis gaištamumas – su chemine medžiaga nesusijęs gaištamumas dėl nežinomos priežasties.

▼M7

— suminį gyvų palikuonių skaičių, gautą vienam motininiam gyvūnui, kuris atsitiktinai ar netyčia nežūsta atliekant bandymą;

— gyvų palikuonių skaičių, gautą vienam išgyvenusiam motininiam gyvūnui;

ir tada kaip galutinį rezultatą naudoti mažiausią NOEC ir LOEC ar EC_x vertę, apskaičiuotą naudojant kurį nors vieną iš šių dviejų atsako kintamųjų.

Prieš pradedant taikyti statistinės analizės, pvz., ANOVA, procedūras, apdorotų ėminių lyginimą su kontroliniais ėminiais, taikant Stjudento *t* kriterijų, Dunnetto kriterijų, Williamso kriterijų ar Jonckheere-Terpstra kriterijų mažėjimo tvarka, rekomenduojama patikrinti, ar reikia duomenis transformuoti, kad jie atitiktų tam tikro statistinio kriterijaus reikalavimus. Kaip neparametrines alternatyvas būtų galima taikyti Dunn ar Mann-Whitney kriterijus. Atskiriems gautiems apdorojimo dozių vidurkiams apskaičiuojami 95 % pasikliovimo intervalai.

Neapdorotuose kontroliniuose ėminiuose išgyvenusių motininių gyvūnų skaičius yra tinkamumo kriterijus ir jį reikėtų dokumentuoti bei pateikti ataskaitoje. Galutinėje ataskaitoje taip pat reikėtų pateikti visus kitus kenksmingo poveikio požymius, pvz., nenormalų elgesį ir reikšmingus toksikologinius rezultatus.

ECx

ECx vertės, įskaitant su jomis susijusias apatinę ir viršutinę pasikliovimo ribas, skaičiuojamos taikant tinkamus statistinius metodus (pvz., logistinę ar Weibull funkciją, supaprastintą Spearman-Karber metodą arba paprastą interpoliaciją). Norint apskaičiuoti EC10, EC_{50} ar kitą ECx, reikėtų atlikti viso duomenų rinkinio regresinę analizę.

NOEC ir (arba) LOEC

Jei numatoma atlikti statistinę analizę NOEC ir (arba) LOEC nustatyti, reikėtų taikyti tinkamus statistinius metodus pagal EBPO 54 dokumentą *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application* (4). Apskritai, neigiami cheminės medžiagos poveikiai palyginti su kontroliniu ėminiu tiriami taikant vienpusį hipotezės tikrinimą, kai $p \leq 0,05$.

Normalusis pasiskirstymas ir dispersijos vienalytiškumas gali būti tikrinamas taikant tinkamą statistinį kriterijų, pvz., Shapiro-Wilk kriterijų ir Levene kriterijų ($p \leq 0,05$). Galima atlikti vienfaktorinę ANOVA ir vėliau taikyti daugybinio lyginimo kriterijų. Galima taikyti daugybinio lyginimo kriterijus (pvz., Dunnett kriterijų) arba tendencijos kriterijus mažėjimo tvarka (pvz., Williams kriterijų arba ar Jonckheere-Terpstra kriterijų mažėjimo tvarka), kad būtų apskaičiuota, ar yra reikšmingi skirtumai ($p \leq 0,05$) tarp kontrolinių ėminių ir įvairios koncentracijos cheminės medžiagos ėminių (rekomenduojamas kriterijus pasirenkamas pagal EBPO rekomendacinį dokumentą 54 (4)). Kitais atvejais NOEC ir LOEC galima būtų nustatyti taikant neparametrinius metodus (pvz., Bonferroni U kriterijų pagal Holm ar Jonckheere-Terpstra tendencijos kriterijų).

Ribinis bandymas

Jei buvo atliekamas ribinis bandymas (lyginamas tik kontrolinis ir tik vienos apdorojimo dozės ėminys) ir yra vykdomi parametrinių kriterijų procedūrų reikalavimai (normalumas, vienalytiškumas), metrinius atsakus galima įvertinti taikant Student kriterijų (t kriterijų). Jei šie reikalavimai nevykdomi, galima taikyti nelygių dispersijų *t* kriterijų (pvz., Welch kriterijų) arba neparametrinį kriterijų, pvz., Mann-Whitney U kriterijų.

Jei norima nustatyti reikšmingus skirtumus tarp kontrolinių ėminių (kontrolinių ir tirpiklio ar dispergento kontrolinių ėminių), kiekvieno kontrolinio ėminio kartotinius ėminius galima bandyti, kaip aprašyta atliekant ribinį bandymą. Jei šiais bandymais reikšmingų skirtumų neaptinkama, visi kontroliniai ir tirpiklio kontroliniai ėminiai gali būti sujungti. Priešingu atveju visus apdorojimo dozių ėminius reikėtų lyginti su tirpiklio kontroliniais ėminiais.

▼M7

Bandymo ataskaita

Į bandymo ataskaitą įtraukiama:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— fizikinė būsena ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės;

— cheminio identifikavimo duomenys, įskaitant grynumą.

Bandymų gyvūnų rūšys:

— klonas (jei nustatytas jo genotipas), tiekėjas ar šaltinis (jei žinomas) ir taikytos auginimo sąlygos. Jei naudojama ne *Daphnia magna* rūšis, tai turėtų būti nurodyta ataskaitoje ir pagrįsta.

Bandymo sąlygos:

— taikyta bandymų procedūra (pvz., pusiau statinis ar dinaminis bandymas, tūris, įkrova ir dafnijų skaičius litrui);

— šviesiojo laikotarpio trukmė ir šviesos stipris;

— bandymų schema (pvz., kartotinių ėminių skaičius, vieno kartotinio ėminio motininių gyvūnų skaičius);

— naudotos kultūros terpės duomenys;

— organinės medžiagos priedai, jei naudojami, įskaitant sudėtį, šaltinį, ruošimo metodą, pradinių tirpalų TOC ir (arba) COD, gautų bandymo terpės TOC ir (arba) COD verčių nustatymas;

— išsami informacija apie maitinimą, įskaitant kiekį (mg C/dafnijai/parai) ir programa (pvz., maisto rūšies (-ių) tipas, įskaitant, jei tai dumbliai, specifinį pavadinimą (rūšį) ir, jei žinomas, štamą, kultūros sąlygas);

— pradinių tirpalų paruošimo metodas ir atnaujinimo dažnumas (reikėtų nurodyti tirpiklį ar dispergentą, jei naudojami, ir jų koncentraciją).

Rezultatai:

— visų parengiamųjų bandomosios cheminės medžiagos stabilumo tyrimų rezultatai;

— bandymo koncentracijos nominalios vertės ir cheminės medžiagos kiekiui bandymų induose nustatyti analizės rezultatai (žr. 5 priedėlio duomenų lentelių pavyzdžius); ataskaitoje reikėtų pateikti metodo atgavimo laipsnį ir nustatymo ribą;

— vandens kokybė bandymų induose (t. y. pH, temperatūra, ištirpusio deguonies koncentracija, TOC ir (ar) COD bei kietumas, jei tinka) (žr. 4 priedėlio duomenų lentelės pavyzdį);

— gyvų palikuonių, bandymo metu gautų iš kiekvieno motininio gyvūno, visi duomenys (žr. 4 priedėlio duomenų lentelių pavyzdžius);

— nugaišusių motininių gyvūnų skaičius ir įvykio diena (žr. 4 priedėlio duomenų lentelės pavyzdį);

— kontrolinių ėminių reprodukcijos našumo variacijos koeficientas (pagrįstas suminiu gyvų palikuonių skaičiumi, tenkančiu vienam iki bandymo pabaigos gyvam išlikusiam motininiam gyvūnui);

— jei tinka, kiekvieno kartotinio ėminio suminio gyvų palikuonių skaičiaus vienam motininiam gyvūnui, atmetant visus motininius gyvūnus, kurie galėjo atsitiktinai ar netyčia žūti bandymo metu, priklausomybės nuo bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kreivė;

▼M7

— jei tinka, kiekvieno kartotinio ėminio suminio gyvų palikuonių skaičiaus vienam išgyvenusiam motininiam gyvūnui priklausomybės nuo bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kreivė;

— jei tinka, reprodukcijos mažiausia stebimo poveikio koncentracija (LOEC), įskaitant taikytų statistinių procedūrų aprašymą ir nurodymą, kokio dydžio poveikį būtų galima tikėtis aptikti (prieš bandymo pradžią galima atlikti galios analizę šiai informacijai gauti) ir reprodukcijos nestebimo poveikio koncentracija (NOEC); informacija apie atsako kintamąjį, kuris buvo naudotas LOEC ir NOEC vertei apskaičiuoti (suminis gyvų palikuonių skaičius, gautas motiniiniam organizmui, kuris atsitiktinai ar netyčia nežuvo bandymo metu, ar suminis gyvų palikuonių skaičius vienam išgyvenusiam motininiam organizmui); jei tinka, ataskaitoje taip pat reikėtų pateikti motininių gyvūnų gaištamumo LOEC ar NOEC;

— jei tinka, reprodukcijos EC_x ir pasikliovimo intervalai (pvz., 90 % ar 95 %), jai apskaičiuoti pritaikyto modelio grafikas, dozės ir atsako kreivės krypties koeficientas ir jos standartinė paklaida,

— kiti pastebėti ar išmatuoti biologinio poveikio rezultatai:pateikiami visi kiti pastebėti ar išmatuoti biologiniai rezultatai (pvz., motininių gyvūnų augimas), įskaitant bet kurį reikiamą pagrindimą;

— bet kokio nukrypimo nuo bandymo metodo pagrindimas.

LITERATŪRA

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

(2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Paris.

(3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.88. OECD, Paris.

(4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Paris.

(5) Baird, D.J., *et al*. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. Ecotox. and Environ. Safety, 21, 257-265.

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

(7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods

(8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, 775-782.

(9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. In: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 – 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA

(10) Baird, D.J., *et al*. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.

▼M7

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

(12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2): 185-196.

(13) 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. OECD, Paris.

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

(15) 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.

▼M7

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Šiame bandymo metode taikomos šios apibrėžtys:

Atsitiktinis gaištamumas – su chemine medžiaga nesusijęs gaištamumas, sukeltas atsitiktinio įvykio (t. y. žinoma priežastis).

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Ecx – vandenyje ištirpintos cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant dafnijų reprodukcija per nurodytą veikimo laikotarpį sumažėja x %.

Netyčinis gaištamumas – su chemine medžiaga nesusijęs gaištamumas dėl nežinomos priežasties.

Būdingasis populiacijos prieaugio greitis – populiacijos augimo matas, kuris aprėpia reprodukcijos našumą ir su amžiumi susijusį gaištamumą (1) (2) (3). Stacionarios būsenos populiacijų jis lygus nuliui. Augančių populiacijų greitis yra teigiamas, o nykstančių populiacijų – neigiamas. Aišku, kad pastarosios yra neilgaamžės ir galiausiai išnyksta.

Aptikimo riba – mažiausia koncentracija, kuriai esant medžiagą galima aptikti, bet negalima nustatyti kiekybiškai.

Nustatymo riba – mažiausia kiekybiškai nustatoma koncentracija.

Mažiausia stebimo poveikio koncentracija (LOEC) – mažiausia bandymo koncentracija, kuriai esant stebimas statistiškai reikšmingas cheminės medžiagos poveikis reprodukcijai ir motininių gyvūnų gaištamumui nurodytu veikimo laikotarpiu palyginti su kontroliniu ėminiu (kai $p < 0,05$). Tačiau esant visoms didesnėms nei LOEC bandymo koncentracijos vertėms, kenksmingas poveikis turėtų būti lygus arba didesnis nei poveikis, kuris būtų esant LOEC. Kai negalima įvykdyti šių dviejų sąlygų, turėtų būti pateiktas išsamus paaiškinimas, kaip buvo pasirinkta LOEC (taigi ir NOEC) vertė.

Gaištamumas – gyvūnas registruojamas kaip nugaišęs, kai jis nejuda, t. y. kai negali plaukti arba kai nestipriai pakračius bandymų indą per 15 s negalima pastebėti galūnių ar pilvelio judėjimo. (Jei taikoma kita apibrėžtis, ji turėtų būti pateikta kartu su jos nuoroda.).

Nestebimo poveikio koncentracija (NOEC) – vos mažesnė nei LOEC bandymo koncentracija, kuri per nurodytą veikimo laikotarpį nedaro statistiškai reikšmingo poveikio ($p < 0,05$) palyginti su kontroliniu ėminiu.

Palikuonys – jaunos dafnijos, atsiradusios atliekant bandymą.

Motininiai gyvūnai – bandymo pradžioje esančios moteriškos lyties dafnijos, kurių reprodukcijos našumas yra tyrimo objektas.

Reprodukcijos našumas – iš motininių gyvūnų bandymo metu gautų palikuonių skaičius.

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

LITERATŪRA

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

▼M7

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

(3) 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.

▼M7

2 priedėlis

VISIŠKAI APIBRĖŽTŲ ELENDT M7 IR M4 TERPIŲ RUOŠIMAS

Aklimatizavimas Elendt M7 ir M4 terpėje

Kai kurios laboratorijos turėjo sunkumų norėdamos dafnijas pernešti tiesiai į M4 (1) ir M7 terpes. Tačiau, aklimatizuojant laipsniškai, t. y. perkeliant dafnijas iš jų terpės į 30 % Elendt, paskui į 60 % Elendt ir pagaliau į 100 % Elendt, pasiekta geresnių rezultatų. Aklimatizavimas gali trukti visą mėnesį.

Pasirengimas

Mikroelementai

Atskirų mikroelementų pradiniai tirpalai (I) iš pradžių ruošiami naudojant tinkamo grynumo vandenį, pvz., dejonizuotą, distiliuotą arba grįžtamojo osmoso būdu gautą vandenį. Iš šių skirtingų pradinių tirpalų (I) ruošiamas antras atskiras pradinis tirpalas (II), turintis visus mikroelementus (sudėtinis tirpalas), t. y.:

I pradinis (-iai) tirpalas (-ai) (atskira medžiaga)	Kiekis, įdedamas į vandenį	Koncentracija (palyginti su M4 terpe)	II pradiniam sudėtiniam tirpalui paruošti į vandenį įpilamas šis I pradinio tirpalo tūris	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000 kartų	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7 210	20 000 kartų	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 kartų	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000 kartų	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3 040	20 000 kartų	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 kartų	1,0	0,25
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	1 260	20 000 kartų	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	335	20 000 kartų	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000 kartų	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	200	20 000 kartų	1,0	1,0
KI	65	20 000 kartų	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000 kartų	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000 kartų	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	5 000	2 000 kartų	—	—
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1 991	2 000 kartų	—	—
Na_2EDTA ir $FeSO_4$ tirpalai ruošiami atskirai, supilami kartu ir iškart apdorojami autoklave. Taip gaunama:				
Fe EDTA tirpalas		1 000 kartų	20,0	5,0

▼**M7**

M4 ir M7 terpės

M4 ir M7 terpės naudojant II pradinį tirpalą, makroelementus ir vitaminus yra ruošiamos taip:

	Kiekis, įdedamas į vandenį	Koncentracija (palyginti su M4 terpe)	Pradinio tirpalo tūris, įpilamas ruošiant terpę	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
II pradinis tirpalas (sudėtinis mikroelementų tirpalas)		20 kartų	50	50
Pradiniai mitybinių makroelementų tirpalai (atskira medžiaga)				
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1 000 kartų	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000 kartų	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 kartų	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000 kartų	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000 kartų	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000 kartų	0,1	0,1
KH2PO4	1 430	10 000 kartų	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000 kartų	0,1	0,1
Vitaminų mišinio pradinis tirpalas	—	10 000 kartų	0,1	0,1

Vitaminų mišinio pradinis tirpalas ruošiamas į 1 litrą vandens įdedant tokį 3 vitaminų kiekį:

	mg/l			
Tiamino hidrochloridas	750	10 000 kartų		
Ciankobalaminas (B12)	10	10 000 kartų		
Biotinas	7,5	10 000 kartų		

Vitaminų mišinio pradinis tirpalas laikomas užšaldytas mažomis alikvotinėmis dalimis. Į terpę vitaminai dedami prieš pat naudojimą.

N.B. Jei ruošiant galutinę terpę norima išvengti druskų nuosėdų susidarymo, alikvotinės pradinio tirpalo dalys įpilamos į maždaug 500–800 ml dejonizuoto vandens ir skiedžiama 1 litro.

N.N.B. Pirmąją publikaciją apie M4 terpę galima rasti: Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M7

3 priedėlis

SUMINĖS ORGANINĖS ANGLIES (TOC) ANALIZĖ IR DUMBLIŲ MAISTO TOC KIEKIO NOMOGRAMŲ GAVIMAS

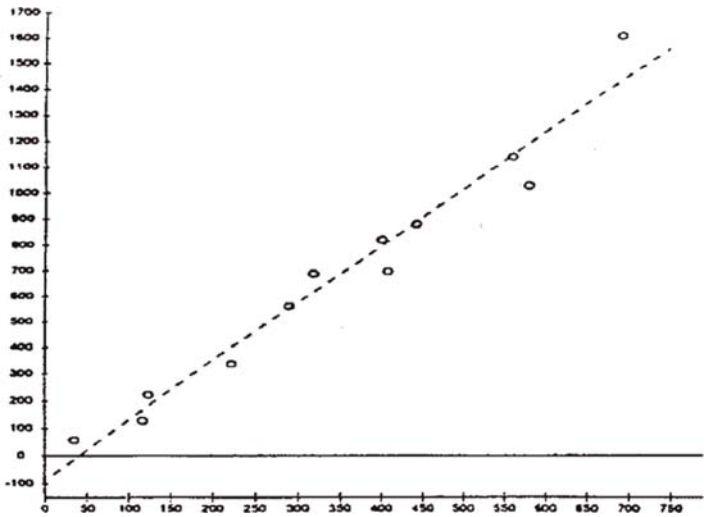
Pripažįstama, kad dumblių maisto anglies kiekis tiesioginiu metodu paprastai nematuojamas, bet taikoma jo koreliacija (t. y. nomogramos) su pakaitiniais parametrais, pvz., dumblių ląstelių skaičiumi ar šviesos absorbcija.

TOC reikėtų matuoti taikant oksidavimo aukštos temperatūros sąlygomis metodą, bet ne UV ar persulfatinį metodą. (Patarimo žr.: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Nomogramai gauti dumbliai ir auginimo terpė atskiriami centrifuguojant ir dumbliai vėl suspenduojami distiliuotame vandenyje. Kiekvieno ėminio pakaitinis parametras ir TOC koncentracija matuojami tris kartus. Analizuojami distiliuoto vandens tuštieji ėminiai ir jų TOC koncentracija atimama iš dumblių ėminio TOC koncentracijos.

Nustatyto anglies koncentracijos verčių intervalo nomograma turėtų būti tiesinė. Pavyzdžiai pateikti toliau.

N.B. Jų negalima naudoti perskaičiavimui; svarbu, kad laboratorijos parengtų savo nomogramas.



Chlorella vulgaris, var. viridis (CCAP 211/12).

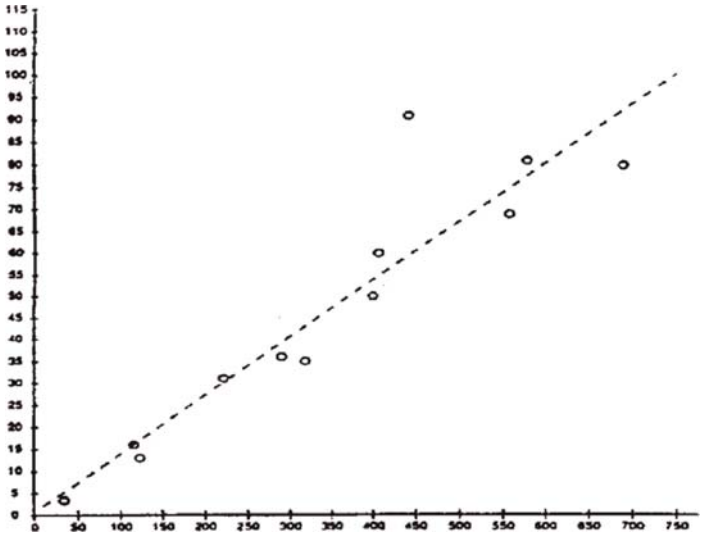
Sausosios masės mg/l ir mg C/l regresija. Koncentruotų suspensijų, gautų iš pusiau nepertraukiamu būdu auginamų ląstelių partijų ir pakartotinai suspenduotų distiliuotame vandenyje, duomenys.

x ašis: koncentruoto dumblių maisto mg C/l

y ašis: koncentruoto dumblių maisto sausosios masės mg/l

Koreliacijos koeficientas -0,980

▼**M7**



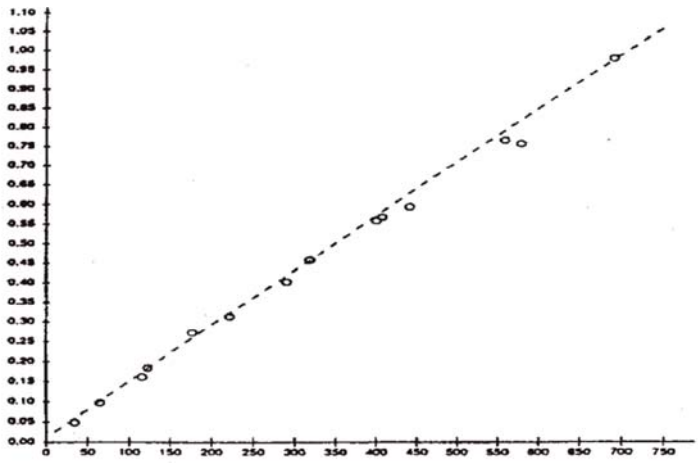
Chlorella vulgaris, var. viridis (CCAP 211/12)

Ląstelių skaičiaus ir mg C/l regresija. Koncentruotų suspensijų, gautų iš pusiau nepertraukiamu būdu auginamų ląstelių partijų ir pakartotinai suspenduotų distiliuotame vandenyje, duomenys.

x ašis: koncentruoto dumblių maisto mg C/l

y ašis: ląstelių skaičius/1 koncentruoto dumblių maisto

Koreliacijos koeficientas -0,926



Chlorella vulgaris, var. viridis (CCAP 211/12)

Optinio tankio ir mg C/l regresija (1 cm optinis kelias). Koncentruotų suspensijų, gautų iš pusiau nepertraukiamu būdu auginamų ląstelių partijų ir pakartotinai suspenduotų distiliuotame vandenyje, duomenys.

x ašis: koncentruoto dumblių maisto mg C/l

y ašis: 1/10 praskiesto koncentruoto dumblių maisto optinis tankis, esant 440 mm bangos ilgiui

Koreliacijos koeficientas -0,998

▼M7

4 priedėlis

TERPĖS ATNAUJINIMO, FIZIKINIO AR CHEMINIO MONITORINGO DUOMENŲ, MAITINIMO, DAFNIJŲ REPRODUKCIJOS IR MOTININIŲ GYVŪNŲ GAIŠTAMUMO DUOMENŲ REGISTRAVIMO LENTELĖS PAVYZDYS

Bandymo Nr.:	Pradžios data:						Klonas:			Terpė:				Maisto tipas:				Bandomoji cheminė medžiaga:					Nominali koncentracija:	
Para	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Terpės atnaujinimas (dėti varnelę)																								
pH (*)																							naujos	
																							senos	
O_2 (mg/l) (*)																							naujos	
																							senos	
Temperatūra (°C) (*)																							naujos	
																							senos	
Duota maisto (dėti varnelę)																								
Nėra gyvų palikuonių (**)																								Suminis
1 indas																								
2																								
3																								
4																								
5																								

02008R0440 — LT — 18.05.2017 — 007.001 — 1442

▼M7

Bandymo Nr.:	Pradžios data:						Klonas:			Terpė:				Maisto tipas:				Bandomoji cheminė medžiaga:					Nominali koncentracija:	
Para	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Suminis	
Suminis motininių gyvūnų gaištamumas (***)																								

(*) Nurodomas bandymui naudotas indas.
(**) Registruojami neapvaisinti kiaušinėliai, atitinkamame langelyje įrašant „AB“
(***) Registruojamas visų motininių gyvūnų giaštamumas, atitinkamame langelyje įrašant „M“

▼M7

5 priedėlis

CHEMINĖS ANALIZĖS REZULTATŲ REGISTRAVIMO LENTELĖS PAVYZDYS

a) **Išmatuotos koncentracijos vertės**

Nominali koncentracija	1 savaitės ėminys		2 savaitės ėminys		3 savaitės ėminys	
	Naujas	Senas	Naujas	Senas	Naujas	Senas

b) **Išmatuotos koncentracijos vertės, išreikštos kaip nominalios koncentracijos procentinė dalis**

Nominali koncentracija	1 savaitės ėminys		2 savaitės ėminys		3 savaitės ėminys	
	Naujas	Senas	Naujas	Senas	Naujas	Senas

▼M7

6 priedėlis

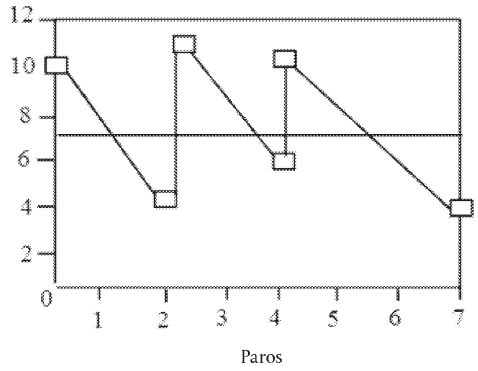
LAIKINIO SVERTINIO VIDURKIO APSKAIČIAVIMAS

Laikinis svertinis vidurkis

Darant prielaidą, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentracija laikotarpiu tarp terpės atnaujinimų gali mažėti, būtina nuspręsti, kurią koncentracijos vertę reikėtų pasirinkti kaip motinines dafnijas veikiančios medžiagos koncentracijos verčių intervalo reprezentatyviąją vertę. Pasirinkimas turėtų būti pagrįstas biologiniais ir statistiniais aspektais. Pvz., jei manoma, kad reprodukciją labiausiai veikia didžiausia koncentracija, reikia naudoti maksimalios koncentracijos vertę. Tačiau jei svarbesniu laikomas kaupiamasis ar ilgalaikis toksiškos cheminės medžiagos poveikis, labiau tinka vidutinė koncentracija. Šiuo atveju tinkamas naudoti vidurkis yra laikinė svertinė vidutinė koncentracija, nes ją nustatant atsižvelgiama į momentinį koncentracijos kitimą laike.

1 paveikslas.

Laikinio svertinio vidurkio pavyzdys



1 paveiksle pateiktas septynių parų trukmės (supaprastinto) bandymo pavyzdys, terpę atnaujinant 0, 2 ir 4 parą.

— Zigzagas rodo koncentracijos vertę bet kuriuo matavimo momentu. Daroma prielaida, kad koncentracija mažėja vykstant eksponentiniam irimo procesui.

— Šeši pažymėti taškai rodo stebimas koncentracijų vertes, išmatuotas kiekvieno atnaujinimo laikotarpio pradžioje ir pabaigoje.

— Stora linija rodo laikinio svertinio vidurkio padėtį.

Laikinis svertinis vidurkis apskaičiuojamas taip, kad plotas po laikinio svertinio vidurkio kreive yra lygus plotui po koncentracijos kreive. Pirmiau pateikto pavyzdžio apskaičiavimas pateiktas 1 lentelėje.

1 lentelė

Laikinio svertinio vidurkio apskaičiavimas

Atnaujinimų skaičius	Paros	Konc. 0	Konc. 1	ln(konc. 0)	ln(konc. 1)	Plotas
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

▼M7

Atnaujinimų skaičius	Paros	Konc. 0	Konc. 1	ln(konc. 0)	ln(konc. 1)	Plotas
Suminis parų skaičius:	7				Suminis plotas:	50,092
					LS vidurkis:	7,156

Paros – atnaujinimo laikotarpio parų skaičius;

Konc. 0 – kiekvieno atnaujinimo laikotarpio pradžioje išmatuota koncentracija;

Konc. 1 – kiekvieno atnaujinimo laikotarpio pabaigoje išmatuota koncentracija;

ln(konc. 0) – konc. 0 natūralusis logaritmas;

ln(konc. 1) – konc. 1 natūralusis logaritmas.

Plotas – kiekvieno atnaujinimo laikotarpio plotas po eksponentine kreive. Jis apskaičiuojamas:

$$Plotas = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times parų\ skaičiaus$$

Laikinis svertinis vidurkis (*LS vidurkis*) yra *suminio ploto* ir *suminio parų skaičiaus* dalmuo.

Savaime aišku, kad atliekant dafnijų reprodukcijos bandymą, lentelė turėtų būti pratęsta iki 21 paros.

Aišku, kad matuojant tik kiekvieno atnaujinimo laikotarpio pradžioje ir pabaigoje, neįmanoma patvirtinti, kad irimo procesas iš tikrųjų vyksta eksponentiškai. Kitokiai kreivei būtų gautas kitas *ploto* apskaičiavimo rezultatas. Tačiau irimo pagal eksponentinę kreivę procesas nėra neįmanomas ir, kai nėra kitos informacijos, tai turbūt labiausiai naudoti tinkama kreivė.

Tačiau reikia būti atsargiems, jei atliekant cheminę analizę atnaujinimo laikotarpio pabaigoje nerandama jokios cheminės medžiagos. Jei negalima įvertinti, kaip greitai cheminė medžiaga išnyko iš tirpalo, neįmanoma gauti tikrojo ploto po kreive, taigi neįmanoma gauti pagrįsto laikinio svertinio vidurkio.

▼M7

7 priedėlis

NAUJAGIMIŲ LYTIES NUSTATYMO REKOMENDACIJOS

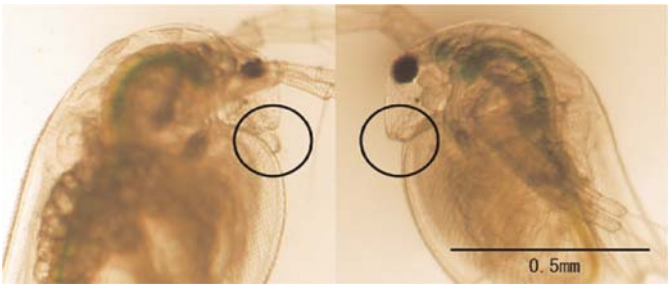
Vyriškos lyties naujagimiai gali atsirasti kintamomis aplinkos sąlygomis, pvz., mažėjanti šviesiojo laikotarpio trukmė, temperatūra, mažėjanti maisto koncentracija ir didėjantis populiacijos tankis (Hobaek and Larson, 1990; Kleiven *et al*., 1992). Yra žinoma, kad patinėlių atsiradimui įtakos turi tam tikros kovos su vabzdžiais priemonės (Oda *et al*., 2005). Tomis sąlygomis, kai dėl cheminių streso veiksnių sumažėja partenogeninių patelių naujagimių, reikėtų laukti patinėlių padaugėjimo (EBPO, 2008). Atsižvelgiant į turimą informaciją, neįmanoma nuspėti, ar jautresnis būtų lyčių santykis, ar reprodukcija kaip vertinamoji baigtis, tačiau yra požymių (nuoroda *Tinkamumo patvirtinimo ataskaita*, 1 dalis), kad šis patinėlių skaičiaus padidėjimas galėtų būti ne toks jautrus palyginti su naujagimių skaičiaus sumažėjimu. Kadangi pagrindinis bandymų metodo tikslas – įvertinti gautų palikuonių skaičių, atsiradusių patinėlių kiekis yra neprivalomas stebėjimas. Jei atliekant tyrimą įvertinama ši neprivaloma vertinamoji baigtis, tada, kaip papildomą bandymo tinkamumo kriterijų, reikėtų naudoti ne didesnį kaip 5 % patinėlių kiekį kontroliniuose ėminiuose.

Praktiškiausias ir patogiausias būdas nustatyti dafnijų lytį – naudoti jų fenotipines charakteristikas, nes patinai ir patelės yra genetiškai identiški ir jų lytis nustatoma pagal išorę. Skiriasi patinėlių ir patelių pirmojo čiuptuvėlio ilgis ir morfologija, patinėlių čiuptuvėlis yra ilgesnis (1 paveikslas). Šį skirtumą galima atpažinti iš karto po gimimo, nors jiems augant vystosi kiti antriniai lytiniai požymiai (pvz., žr. 2 paveikslą, pateiktą *Olmstead and LeBlanc*, 2000).

Norint stebėti morfologinę lytį, kiekvieno bandymo gyvūno naujagimius reikėtų paimti pipete ir pernešti į petri lėkštelę su bandymo terpe. Terpės reikia imti kuo mažiau, kad gyvūnų judesiai būtų suvaržyti. Pirmąjį čiuptuvėlį galima stebėti per stereomikroskopą (× 10–60).

1 paveikslas

***D. magna* 24 h amžiaus patinai (kairėje) ir patelės (dešinėje). Patinėlius nuo patelių galima atskirti pagal pirmojo čiuptuvėlio ilgį ir morfologiją, kaip pavaizduota apskritimuose (Tatarazako *et al*., 2004).**



NUORODOS

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168-1174.

▼**M7**

OECD, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna r*eproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Number 88. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 19:2107-2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Environmental Science 17, 439-449.

▼C1

C.21. DIRVOŽEMIO MIKROORGANIZMAI. AZOTO TRANSFORMAVIMO BANDYMAS

1. METODAS

Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 216 (2000).

1.1. ĮVADAS

Šiame bandymo metode aprašytas laboratorinis metodas, skirtas ilgalaikiam poveikiui azoto virsme dalyvaujančių dirvožemio mikroorganizmų aktyvumui tirti, kai chemine medžiaga paveikiama vieną kartą. Bandymas iš esmės pagrįstas Europos ir Vidužemio jūros augalų apsaugos organizacijos (*European and Mediterranean Plant Protection Organization*) rekomendacijomis (1). Tačiau buvo atsižvelgta ir į kitus nurodymus, įskaitant Vokietijos *Biologische Bundesanstalt* (2), JAV aplinkos apsaugos agentūros (3) SETAC (4) ir Tarptautinės standartizacijos organizacijos (5) rekomendacijas. Belgirate, Italijoje, 1995 m. vykusiame OECD seminare dėl dirvožemių ir nuosėdinių uolienų atrankos (6) buvo susitarta dėl šiame bandyme naudojamų dirvožemių skaičiaus ir tipo. Dirvožemio ėminių ėmimo, tvarkymo ir laikymo rekomendacijos pagrįstos ISO rekomendaciniu dokumentu (7) ir Belgirato seminaro rekomendacijomis. Įvertinant bandomųjų medžiagų toksiškumo charakteristikas, gali tekti nustatyti jų poveikį dirvožemio mikrobiniam aktyvumui, pvz., kai reikia turėti duomenų apie galimą šalutinį augalų apsaugos produktų poveikį dirvožemio mikroflorai arba kai tikimasi kitų nei augalų apsaugos produktai cheminių medžiagų poveikio dirvožemio mikroorganizmams. Azoto transformavimo bandymas atliekamas siekiant nustatyti tokių cheminių medžiagų poveikį dirvožemio mikroflorai. Jei bandomos agrocheminės medžiagos (pvz., augalų apsaugos produktai, trąšos, miškininkystėje naudojamos cheminės medžiagos), atliekami azoto transformavimo ir anglies transformavimo bandymai. Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, pakanka azoto transformavimo bandymo. Tačiau jei atliekant tokių cheminių medžiagų azoto transformavimo bandymą jų EC_{50} vertės patenka į intervalą, nustatytą prekyboje esantiems nitrifikacijos inhibitoriams (pvz., nitrapirinui), papildomai informacijai gauti gali būti atliekamas anglies transformavimo bandymas.

Dirvožemį sudaro gyvieji ir negyvieji komponentai, esantys sudėtinuose ir heterogeniniuose mišiniuose. Mikroorganizmai vaidina svarbų vaidmenį vykstant derlingų dirvožemių organinių medžiagų skaidymui ir transformavimui, kai didelis rūšių skaičius prisideda prie įvairių dirvožemio derlingumo aspektų. Visi ilgalaikiai tokių biocheminių procesų trukdžiai gali pažeisti mitybinių elementų ciklą, o tai gali pakeisti dirvožemio derlingumą. Anglies ir azoto transformavimas vyksta visuose derlinguose dirvožemiuose. Nors už šiuos procesus atsakingos mikrobiologinės kolonijos įvairiuose dirvožemiuose yra skirtingos, transformavimo keliai iš esmės yra tokie patys.

Aprašytas bandymo metodas skirtas ilgalaikiam neigiamam medžiagos poveikiui azoto transformavimui aerobiniuose paviršiniuose dirvožemiuose nustatyti. Be to, taikant šį bandymo metodą galima įvertinti medžiagų poveikį dirvožemio mikroflora sukeliamam anglies transformavimui. Nutrūkus anglies ir azoto jungtims, vyksta nitratų susidarymas. Taigi jei nustatoma, kad apdorotame ir kontroliniame dirvožemyje nitratų susidarymo greitis yra vienodas, yra didelė tikimybė, kad pagrindiniai anglies skaidymo keliai yra nepaliesti ir funkcionuoja. Bandymui pasirinktas substratas (liucernos milteliai) turi palankų anglies ir azoto santykį (paprastai nuo 12/1 iki 16/1). Dėl šios priežasties anglies trūkumas atliekant bandymą sumažėja ir jei cheminė medžiaga pažeistų mikrobiologines kolonijas, jos galėtų atsistatyti per 100 parų.

▼C1

Bandymai, pagal kuriuos parengtas šis bandymo metodas, iš pradžių buvo skirti medžiagoms, kurių kiekį, pasiekiantį dirvožemį, buvo galima numatyti. Tai pasitaiko, pvz., naudojant augalų apsaugos produktus, kurių laukuose barstomos medžiagos norma yra žinoma. Bandant agrochemines medžiagas, pakanka dviejų dozių, atitinkančių numatomą arba prognozuojamą naudojimo normą. Agrochemines medžiagas galima bandyti kaip veikliuosius ingredientus (v. i.) arba kaip preparatus. Tačiau bandymas neapsiriboja agrocheminėmis medžiagomis. Keičiant į dirvožemį dedamos bandomosios medžiagos kiekį ir duomenų įvertinimo būdą, bandymą dar galima naudoti cheminėms medžiagoms, kurių kiekis, tikėtinai patenkantis į dirvožemį, yra nežinomas. Taigi, jei tai ne agrocheminės medžiagos, nustatomas medžiagos kelių koncentracijos verčių poveikis azoto transformavimui. Šių bandymų duomenys yra naudojami dozės ir reakcijos santykio kreivei gauti ir EC_x vertėms apskaičiuoti, kai x yra apibrėžiamas kaip poveikio %.

1.2. APIBRĖŽTYS

Azoto transformavimas – azoto turinčios organinės medžiagos skaidymas mikroorganizmais iki atitinkamo galutinio produkto, neorganinio nitrato, vykstant amonifikacijos ir nitrifikacijos procesams.

EC_x (efektyvioji koncentracija) – bandomosios medžiagos koncentracija dirvožemyje, kai azoto transformavimas į nitratą inhibuojamas x procentų.

EC_{50} (vidutinė efektyvioji koncentracija) – bandomosios medžiagos koncentracija dirvožemyje, kai azoto transformavimas į nitratą inhibuojamas 50 procentų (50 %).

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Sijotas dirvožemis apdorojamas bandomąja medžiaga arba paliekamas neapdorotas (kontrolinis). Jei bandomos agrocheminės medžiagos, rekomenduojama naudoti mažiausiai dvi bandymo koncentracijas, kurios pasirenkamos pagal didžiausią lauke numatomą koncentraciją. Po 0, 7, 14 ir 28 inkubavimo parų apdoroti ir kontroliniai dirvožemio ėminiai ekstrahuojami atitinkamu tirpikliu ir ekstraktuose nustatomas nitrato kiekis. Lyginamas nitrato susidarymo greitis apdorotuose ir kontroliniuose ėminiuose ir apskaičiuojamas apdorotojo ėminio procentinis nuokrypis nuo kontrolinio ėminio. Visi bandymai atliekami mažiausiai 28 paras. Jei 28 parą apdoroto ir neapdoroto dirvožemio skirtumas yra lygus arba didesnis kaip 25 %, matavimai tęsiami ne ilgiau kaip iki 100 parų. Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, į dirvožemio ėminius dedama kelių koncentracijos verčių bandomoji medžiaga, o susidariusio nitrato kiekis apdorotuose ir kontroliniuose ėminiuose matuojamas po 28 inkubavimo parų. Dauginių koncentracijos verčių bandymų rezultatai analizuojami taikant regresijos modelį ir apskaičiuojamos EC_x vertės (t. y. EC_{50}, EC_{25} ir (arba) EC_{10}). Žr. apibrėžtis.

1.5. BANDYMO TINKAMUMAS

Bandymų su agrocheminėmis medžiagomis rezultatai pagrįsti palyginti mažu (t. y. vidutinė vertė ± 25 %) nitrato koncentracijos kontroliniame ir apdorotame dirvožemio ėminyje skirtumu, taigi didelė kontrolinių ėminių duomenų sklaida gali būti klaidingų rezultatų priežastimi. Todėl kartotinių kontrolinių ėminių rezultatai neturi skirtis daugiau kaip ± 15 %.

▼C1

1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Aparatūra**

Naudojami bandymo indai, pagaminti iš chemiškai inertiškos medžiagos. Jie turi būti reikiamos talpos atsižvelgiant į dirvožemio inkubavimui taikomą metodiką, t. y. viso vieno ėminio arba kelių atskirų dirvožemio dalinių ėminių inkubavimą (žr. 1.7.1.2 skirsnį). Reikia stengtis kiek įmanoma sumažinti vandens nuostolius, bet tuo pačiu užtikrinti dujų mainus atliekant bandymą (pvz., indai gali būti uždengiami polietileno plėvele su skylutėmis). Bandant lakiąsias medžiagas, reikia naudoti uždaromus ir sandarius dujoms indus. Jų dydis pasirenkamas taip, kad dirvožemio ėminys sudarytų maždaug vieną ketvirtąją indo tūrio.

Naudojama tipinė laboratorinė įranga, įskaitant šią:

— maišymo įtaisas: mechaninė purtyklė arba lygiavertė įranga,

— centrifuga (3 000 g) arba filtravimo įtaisas (filtravimo popierius be nitratų),

— atitinkamo jautrumo ir atkuriamumo nitratų analizės prietaisas.

1.6.2. **Dirvožemių pasirinkimas ir skaičius**

Naudojamas vienos rūšies dirvožemis. Rekomenduojamas dirvožemis, kurio charakteristikos:

— smėlio kiekis: ne mažesnis kaip 50 % ir ne didesnis kaip 75 %;

— pH: 5,5– 7,5;

— organinės anglies kiekis: 0,5–1,5 %;

— turėtų būti matuojama mikrobinė biomasė (8)(9), ir jos anglies kiekis turi sudaryti ne mažiau kaip 1 % bendrosios dirvožemio organinės anglies.

Dirvožemis, kurio tokios charakteristikos, dažniausiai atitinka blogiausią atvejį, kadangi cheminės medžiagos absorbcija yra mažiausia, o mikrofloros galimybė jos gauti yra didžiausia. Taigi bandymų su kitais dirvožemiais paprastai nereikia atlikti. Tačiau tam tikromis aplinkybėmis, pvz., jei medžiagą iš esmės numatoma naudoti konkrečiame dirvožemyje, pvz., rūgščiajame miško dirvožemyje, arba jei naudojamos elektrostatinį krūvį turinčios cheminės medžiagos, gali tekti naudoti papildomą dirvožemį.

▼C1

1.6.3. **Dirvožemio ėminių rinkimas ir laikymas**

1.6.3.1. *Rinkimas*

Reikia turėti išsamios informacijos apie lauko vietą, iš kurios imamas bandymo dirvožemis. Nurodoma tiksli padėtis, augalų danga, apdorojimo augalų apsaugos produktais datos, apdorojimas organinėmis ir neorganinėmis trąšomis, biologinių priedų dėjimas arba atsitiktiniai teršalai. Dirvožemio ėmimui pasirinkta vieta turėtų užtikrinti ilgalaikį naudojimą. Tinka nuolatinės ganyklos, laukai su kasmetiniais grūdiniais augalais (išskyrus kukurūzus) arba tankiai pasėtų žaliųjų trąšų laukai. Pasirinkta ėminio ėmimo vieta neturi būti apdorota augalų apsaugos produktais mažiausiai vienerius metus prieš ėminių ėmimą. Be to, mažiausiai šešis mėnesius neturi būti dedama organinių trąšų. Mineralines trąšas galima naudoti tik tuo atveju, jei to reikia pasėliams, o dirvožemio ėminiai imami ne anksčiau kaip trys mėnesiai po tręšimo. Reikia vengti naudoti dirvožemį, apdorotą trąšomis, turinčiomis žinomų biocidinių savybių (pvz., kalcio cianamidu).

Reikia vengti imti ėminius esant ilgalaikiam (ilgesniam kaip 30 parų) sausros arba potvynio laikotarpiui arba iš karto jam pasibaigus. Ariamų dirvožemių ėminiai imami iš 0–20 cm gylio. Pievose (ganyklose) arba kitame ilgą laiką (bent vieną auginimo sezoną) neariamuose dirvožemiuose didžiausias ėminio ėmimo gylis gali būti šiek tiek didesnis kaip 20 cm (pvz., iki 25 cm).

Dirvožemio ėminiai vežami tokiuose induose ir esant tokioms temperatūros sąlygoms, kurios neleistų reikšmingai pakisti pradinėms dirvožemio savybėms.

1.6.3.2. *Laikymas*

Pageidautina naudoti neseniai lauke paimtus dirvožemius. Jei laikymo laboratorijoje neįmanoma išvengti, dirvožemis gali būti ne ilgiau kaip tris mėnesius laikomas tamsoje, esant 4 ± 2 °C. Lakant dirvožemius, turi būti užtikrintos aerobinės sąlygos. Jei dirvožemis imamas iš vietovių, kuriose jis būna įšalęs mažiausiai tris mėnesius per metus, jį galima laikyti šešis mėnesius, esant nuo –18 °C iki –22 °C. Laikomo dirvožemio mikrobinė biomasė matuojama prieš kiekvieną bandymą ir biomasės anglis turi sudaryti mažiausiai 1 % viso dirvožemio organinės anglies kiekio (žr. 1.6.2 skirsnį).

1.6.4. **Dirvožemio tvarkymas ir ruošimas bandymui**

1.6.4.1. *Pradinis inkubavimas*

Jei dirvožemis buvo laikomas saugykloje (žr. 1.6.3.2 skirsnį), rekomenduojamas pradinis inkubavimas, kurio trukmė būtų nuo 2 iki 28 parų. Temperatūra ir dirvožemio drėgmės kiekis pradinio inkubavimo laikotarpiu turi atitikti bandymo sąlygas (žr. 1.6.4.2 ir 1.7.1.3 skirsnius)..

▼C1

1.6.4.2. *Fizikinės ir cheminės savybės*

Iš dirvožemio rankiniu būdu pašalinami dideli daiktai (pvz., akmenys, augalų dalys ir t. t.), tuomet drėgnas dirvožemis sijojamas iki 2 mm arba mažesnių dalelių, neleidžiant jam perdaug išdžiūti. Drėgmės kiekis dirvožemio ėminyje reguliuojamas distiliuotu arba dejonizuotu vandeniu iki vertės, sudarančios 40–60 % didžiausios vandens sulaikymo gebos.

1.6.4.3. *Gerinimas pridedant organinio substrato*

Dirvožemį reikėtų pagerinti atitinkamu organiniu substratu, pvz., žaliosios liucernos masės milteliais (pagrindinis komponentas: *Medicago sativa*), kurių C/N santykis yra nuo 12/1 iki 16/1. Rekomenduojamas liucernos ir dirvožemio santykis yra 5 g liucernos vienam kilogramui dirvožemio (sausos medžiagos masės).

1.6.5. **Bandomosios medžiagos ruošimas įterpti į dirvožemį**

Bandomoji medžiaga paprastai įterpiama naudojant nešiklį. Nešikliu gali būti vanduo (vandenyje tirpių medžiagų) arba inertinė kietoji medžiaga, pvz., smulkus kvarcinis smėlis (dalelių dydis: 0,1–0,5 mm). Kitų nei vanduo skystųjų nešiklių (pvz., organinių tirpiklių, pvz., acetono, chloroformo) reikėtų vengti, kadangi jie gali pakenkti mikroflorai. Jei kaip nešiklis naudojamas smėlis, jo daleles galima padengti bandomąja medžiaga, ištirpinta arba suspenduota atitinkamame tirpiklyje. Tokiais atvejais prieš maišant su dirvožemiu tirpiklis išgarinamas. Siekiant optimaliai paskirstyti bandomąją medžiagą dirvožemyje, rekomenduojama naudoti 10 g smėlio vienam kilogramui dirvožemio (sausos medžiagos masės). Kontroliniai ėminiai apdorojami tik lygiaverčiu vandens ir (arba) kvarcinio smėlio kiekiu.

Jei bandomos lakiosios chemines medžiagos, apdorojant reikia kiek įmanoma vengti nuostolių ir stengtis užtikrinti tolygų pasiskirstymą dirvožemyje (pvz., bandomąją medžiagą reikėtų įšvirkšti keliose dirvožemio vietose).

1.6.6. **Bandymo koncentracijos vertės**

Jei bandomos agrocheminės medžiagos, naudojamos mažiausiai dvejopa koncentracija. Mažesnė koncentracija turėtų rodyti bent didžiausią kiekį, kuris tikėtinai pasiektų dirvožemį praktinėmis sąlygomis, tuo tarpu didesnė koncentracija turėtų būti mažesnės koncentracijos kartotinis dydis. Į dirvožemį įterpiamos bandomosios medžiagos koncentracijos vertės apskaičiuojamos darant prielaidą apie tolygų įterpimą į 5 cm gylį ir dirvožemio santykinį tankį 1,5. Agrocheminių medžiagų, tiesiogiai įterpiamų į dirvožemį, arba cheminių medžiagų, kurių dirvožemį pasiekiantis kiekis gali būti numatytas, rekomenduojamos bandymo koncentracijos vertės yra didžiausia numatoma aplinkos koncentracija (*Predicted Environmental Concentration* - PEC) ir penkis kartus didesnė koncentracija. Medžiagos, kurias numatoma įterpti į dirvožemį kelis kartus per vieną sezoną, bandomos esant koncentracijos vertėms, gautoms PEC vertę padauginus iš didžiausio numatomo įterpimų skaičiaus. Tačiau viršutinė bandymo koncentracijos vertė neturi būti daugiau kaip dešimt kartų didesnė už didžiausią vienkartinio įterpimo normą. Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, naudojama mažiausiai penkių koncentracijos verčių eilė pagal geometrinę progresiją. Bandymo koncentracijos vertės turi atitikti intervalą, reikalingą EC_x vertėms nustatyti.

▼C1

1.7. BANDYMO PROCEDŪRA

1.7.1. **Veikimo sąlygos**

1.7.1.1. *Apdorojami ir kontroliniai ėminiai*

Jei bandomos agrocheminės medžiagos, dirvožemis dalijamas į tris vienodos masės dalis. Dvi dalys maišomos su produkto turinčiu nešikliu, o trečioji maišoma su nešikliu be produkto (kontrolinis bandymas). Rekomenduojama paruošti mažiausiai tris kartotinius apdorotų dalių ir neapdorotos dalies dirvožemio ėminius. Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, dirvožemis dalijamas į šešias vienodos masės dalis. Penki ėminiai maišomi su bandomosios medžiagos turinčiu nešikliu, o šeštasis ėminys sumaišomas su nešikliu be cheminės medžiagos. Rekomenduojama paruošti bent tris apdorotų dirvožemio dalių ir neapdorotos dirvožemio dalies kartotinius ėminius. Reikia stengtis užtikrinti tolygų bandomosios medžiagos pasiskirstymą apdorotuose dirvožemio ėminiuose. Maišant reikėtų vengti dirvožemio sutankinimo ir grumstų susidarymo.

1.7.1.2. *Dirvožemio ėminių inkubavimas*

Dirvožemio ėminius galima inkubuoti dviem būdais: kaip vientisus kiekvieno apdoroto ir neapdoroto dirvožemio ėminius arba kaip seriją atskirų ir vienodo dydžio kiekvieno apdoroto ir neapdoroto dirvožemio mėginių. Tačiau bandant lakiąsias medžiagas bandymas atliekamas tik vienu būdu, naudojant atskirų mėginių seriją. Kai dirvožemis inkubuojamas kaip vientisas ėminys, ruošiamas didelis kiekvieno apdoroto ir neapdoroto dirvožemio kiekis ir prireikus imami jo mėginiai analizei atliekant bandymą. Kiekvienam apdorotam ir kontroliniam ėminiui iš pradžių paruoštas kiekis priklauso nuo mėginių dydžio, analizei naudojamų kartotinių mėginių skaičiaus ir nuo numatomo didžiausio mėginių ėmimo kartų skaičiaus. Dirvožemiai, inkubuojami kaip vientisas ėminys, prieš imant mėginius turi būti gerai sumaišomi. Kai dirvožemiai inkubuojami kaip serija atskirų dirvožemio mėginių, kiekvienas apdorotas ir neapdorotas vientisas dirvožemio ėminys dalijamas į reikiamą mėginių skaičių, kurie prireikus yra naudojami. Atliekant bandymus, kuriuose gali būti numatyta mėginius imti daugiau kaip du kartus, reikia paruošti pakankamą skaičių mėginių, kad būtų galima atsižvelgti į visus kartotinius mėginius ir mėginių ėmimo kartų skaičių. Mažiausiai trys bandymo dirvožemio kartotiniai ėminiai inkubuojami aerobinėmis sąlygomis (žr. 1.7.1.1 skirsnį). Atliekant visus bandymus turi būti naudojami atitinkami indai su pakankamo tūrio laisvąja erdve, kad būtų išvengta anaerobinių sąlygų. Kai bandomos lakiosios medžiagos, bandymas turi būti atliekamas naudojant seriją atskirų mėginių.

1.7.1.3. *Bandymo sąlygos ir trukmė*

Bandymas atliekamas tamsoje, esant 20 ± 2 °C temperatūrai. Drėgmės kiekis dirvožemio ėminiuose visą bandymo laiką turi būti palaikomas ± 5 % tikslumu ir turi sudaryti nuo 40 % iki 60 % dirvožemio didžiausios vandens sulaikymo gebos (žr. 1.6.4.2 skirsnį). Prireikus galima įpilti distiliuoto arba dejonizuoto vandens.

Mažiausia bandymų trukmė – 28 dienos. Jei bandomos agrocheminės medžiagos, lyginamas nitratų susidarymo greitis apdorotuose ir kontroliniuose ėminiuose. Jei 28 parą jis skiriasi daugiau kaip 25 %, bandymas tęsiamas tol, kol gaunamas 25 % arba mažesnis skirtumas, bet ne ilgiau kaip 100 parų. Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, bandymas baigiamas po 28 parų. 28 parą nustatomas nitratų kiekis apdorotuose ir kontroliniuose dirvožemio ėminiuose ir apskaičiuojamos EC_x vertės.

▼C1

1.7.2. **Dirvožemių ėminių ėmimas ir analizė**

1.7.2.1. *Dirvožemio ėminių ėmimo grafikas*

Jei bandomos agrocheminės medžiagos, dirvožemio ėminiai nitratui nustatyti analizuojami 0, 7, 14 ir 28 parą. Jei bandymą reikia tęsti, papildomi matavimai po 28 dienos daromi kas 14 parų.

Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, naudojamos mažiausiai penkios bandymo koncentracijos vertės ir dirvožemio ėminiai nitratui nustatyti analizuojami prieš bandymo pradžią (0 parų) ir veikimo laikotarpiui pasibaigus (28 parą). Jei manoma, kad būtinas tarpinis matavimas, jį galima daryti, pvz., 7 parą. Duomenys, gauti 28 parą, naudojami cheminės medžiagos EC_x vertei nustatyti. Jei pageidaujama, 0 dienos kontrolinių ėminių duomenys gali būti naudojami pradinei nitrato koncentracijai dirvožemyje pateikti.

1.7.2.2. *Dirvožemio ėminių analizė*

Kiekvieną kartą paėmus ėminius, nustatomas nitrato kiekis, kuris susidaro kiekviename apdorotame ir kontroliniame kartotiniame ėminyje. Nitratas ekstrahuojamas iš dirvožemio ėminius purtant atitinkamame ekstrahavimo tirpiklyje, pvz., 0,1 mol/l kalio chlorido tirpale. Rekomenduojamas santykis 5 ml KC1 tirpalo vienam gramui dirvožemio, skaičiuojant sauso dirvožemio masei. Ekstrahavimui optimizuoti, dirvožemio ir ekstrahavimo tirpalo tūris neturi būti didesnis kaip pusė indo tūrio. Mišiniai purtomi 60 min. esant 150 min^{-1} apsisukimų dažniui. Mišiniai centrifuguojami arba filtruojami ir skystoji fazė analizuojama nitratui nustatyti. Dalelių neturinčius skystuosius ekstraktus galima laikyti prieš analizę ne ilgiau kaip šešis mėnesius, esant -20 ± 5 °C.

2. **DUOMENYS**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Jei bandomos agrocheminės medžiagos, užrašomas kiekviename kartotiniame dirvožemio ėminyje susidariusio nitrato kiekis ir visų kartotinių ėminių vidutinės vertės pateikiamos lentelėse. Azoto transformavimo greitis įvertinamas taikant atitinkamus visuotinai priimtus statistinius metodus (pvz., F bandymą, 5 % reikšmingumo lygmuo). Susidariusio nitrato kiekis išreiškiamas mg nitrato/kg sauso dirvožemio/parai. Nitrato susidarymo kiekviename apdorotame ėminyje greitis lyginamas su greičiu, gautu kontroliniam ėminiui, ir apskaičiuojama procentais išreikšta nuokrypio nuo kontrolinio ėminio vertė.

Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, nustatomas kiekviename kartotiniame ėminyje susidariusio nitrato kiekis, ir EC_x vertėms įvertinti braižoma dozės ir reakcijos santykio kreivė. Nitrato kiekis (t. y. mg nitrato/kg sauso dirvožemio), nustatytas apdorotuose ėminiuose po 28 parų, lyginamas su kontroliniuose ėminiuose nustatytu kiekiu. Pagal šiuos duomenis kiekvienai bandymo koncentracijai apskaičiuojamos inhibavimo % vertės. Šios procentinės vertės pateikiamos grafike kaip koncentracijos funkcija, ir EC_x vertėms apskaičiuoti taikomos statistinės metodikos. Be to, taikant tipines metodikas (10) (11) (12), nustatomos apskaičiuotos EC_x vertės pasikliovimo ribos ($p = 0,95$).

Didelį azoto kiekį turinčios bandomosios medžiagos gali prisidėti prie susidariusio nitrato kiekio padidėjimo atliekant bandymą. Jei šios medžiagos bandomos esant jų didelei koncentracijai (pvz., cheminės medžiagos, kurias numatoma naudoti dedant kelis kartus), į bandymo schemą turi būti įtraukti atitinkami kontroliniai ėminiai (t. y. dirvožemis su bandomąja medžiaga, bet be augalinių miltų). Į šių kontrolinių ėminių duomenis turi būti atsižvelgta apskaičiuojant EC_x vertes.

▼C1

2.2. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Jei vertinant agrocheminių medžiagų bandymų rezultatus, ėminyje, turinčiame mažesnę koncentraciją (t. y. didžiausią numatomą koncentraciją), ir kontroliniame ėminyje nitrato susidarymo greičio skirtumas yra lygus 25 % arba mažesnis bet kuriuo mėginio ėmimo metu po 28 paros, produktą galima įvertinti kaip nedarantį ilgalaikio poveikio azoto transformavimui dirvožemiuose. Kai įvertinami kitų nei agrocheminės medžiagos cheminių medžiagų bandymo rezultatai, naudojamos EC_{50}, EC_{25} ir (arba) EC_{10} vertės.

3. **ATASKAITA**

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

Išsamus naudojamo dirvožemio identifikavimas, įskaitant:

— geografinę vietos nuorodą (platuma, ilguma),

— informacija apie vietos istoriją (t. y. augalinė danga, apdorojimas augalų apsaugos produktais, apdorojimas trąšomis, atsitiktiniai teršalai ir t. t.),

— naudojimo paskirtis (pvz., žemės ūkio paskirties žemė, miškas ir t. t.),

— ėminio ėmimo gylis (cm),

— smėlio/dumblo/molio kiekis (% sausos medžiagos masės),

— pH vertė (vandenyje),

— organinės anglies kiekis (% sausos medžiagos masės),

— azoto kiekis (% sausos medžiagos masės),

— pradinė nitrato koncentracija (mg nitrato/kg sausos medžiagos masės),

— jonų mainų geba (mmol/kg),

— mikrobinė biomasė, išreikšta bendrosios organinės anglies procentine dalimi,

— metodų, taikytų kiekvienam parametrui nustatyti, nuorodos,

— visa informacija apie dirvožemio ėminių ėmimą ir laikymą,

— išsami informacija apie pradinį dirvožemio inkubavimą, jei daromas.

Bandomoji medžiaga:

— fizikinė būsena ir, jei tinka, fizikinės ir cheminės savybės,

— cheminio identifikavimo duomenys, jei tinka, įskaitant struktūrinę formulę, grynumą (t. y. augalų apsaugos produktų atveju veikliojo ingrediento procentinę dalį), azoto kiekį.

Substratas:

— substrato šaltinis,

— sudėtis (t. y. liucernos miltai, žaliosios liucernos masės miltai),

— anglies, azoto kiekis (% sausos medžiagos masės),

▼C1

— sieto akučių dydis (mm).

Bandymo sąlygos:

— išsami informacija apie dirvožemio gerinimą organiniu substratu,

— naudotų bandomosios medžiagos koncentracijos verčių skaičius ir, jei tinka, pasirinktų koncentracijos verčių pagrindimas,

— išsami informacija apie bandomosios medžiagos įterpimą į dirvožemį,

— inkubavimo temperatūra,

— drėgmės kiekis dirvožemyje pradedant bandymą ir jį atliekant,

— taikytas dirvožemio inkubavimo metodas (t. y. kaip vientisas ėminys arba kaip keli mėginiai),

— kartotinių ėminių skaičius,

— ėminių ėmimo skaičius,

— metodas, taikomas nitratui iš dirvožemio ekstrahuoti.

Rezultatai:

— analizės metodika ir įranga, naudota nitratui analizuoti,

— lentelių duomenys, įskaitant atskiras ir vidutines nitrato analizės vertes,

— apdorotų ir kontrolinių kartotinių ėminių rezultatų nuokrypis,

— apskaičiavimams daromų pataisų aiškinimai, jei tinka,

— procentais išreikštas nitrato susidarymo greičio nuokrypis kiekvieną kartą imant mėginį, arba, jei tinka, EC_{50} vertė esant 95 procentų pasikliovimo ribai, kitos EC_x vertės (t. y. EC_{25} arba EC_{10}) ir pasikliovimo ribos, dozės ir reakcijos santykio kreivės grafikas,

— statistinis rezultatų apdorojimas,

— visa informacija ir pastebėjimai, kurie padėtų aiškinti rezultatus.

4. **NUORODOS**

1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1–16, 1994.

2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1–1 (2nd eds., 1990).

3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

4) SET AC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality – Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality – BiologicalMethods*.

▼C1

6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.

7) ISO 10381–6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

8) ISO 14240–1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.

9) ISO 14240–2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99–113.

11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼C1

C.22. DIRVOŽEMIO MIKROORGANIZMAI. ANGLIES TRANSFORMAVIMO BANDYMAS

1. METODAS

Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 217 (2000).

1.1. ĮVADAS

Šiame bandymo metode aprašytas laboratorinis metodas, skirtas ilgalaikiam poveikiui azoto transformavime dalyvaujančių dirvožemio mikroorganizmų aktyvumui tirti, kai chemine medžiaga paveikiama vieną kartą. Bandymas iš esmės pagrįstas Europos ir Vidužemio jūros augalų apsaugos organizacijos rekomendacijomis (1). Tačiau buvo atsižvelgta į kitus nurodymus, įskaitant Vokietijos *Biologische Bundesanstalt* (2), JAV aplinkos apsaugos agentūros (3) SET AC (4) rekomendacijas. Belgirate, Italijoje, 1995 m. vykusiame OECD seminare dėl dirvožemių ir nuosėdinių uolienų atrankos (5) buvo susitarta dėl šiame bandyme naudojamų dirvožemių skaičiaus ir tipo. Dirvožemio ėminių ėmimo, tvarkymo ir laikymo rekomendacijos pagrįstos ISO rekomendaciniu dokumentu (6) ir Belgirato seminaro rekomendacijomis.

Vertinant bandomųjų medžiagų toksiškumo charakteristikas, gali tekti nustatyti jų poveikį dirvožemio mikrobiniam aktyvumui, pvz., kai reikia turėti duomenų apie galimą šalutinį augalų apsaugos produktų poveikį dirvožemio mikroflorai arba kai tikimasi kitų nei augalų apsaugos produktai cheminių medžiagų poveikio dirvožemio mikroorganizmams. Anglies transformavimo bandymas atliekamas siekiant nustatyti tokių cheminių medžiagų poveikį dirvožemio mikroflorai. Jei bandomos agrocheminės medžiagos (pvz., augalų apsaugos produktai, trąšos, miškininkystėje naudojamos cheminės medžiagos), atliekami anglies ir azoto transformavimo bandymai. Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, pakanka azoto transformavimo bandymo. Tačiau jei atliekant tokių cheminių medžiagų azoto transformavimo bandymą, jų EC_{50} vertės patenka į intervalą, nustatytą prekyboje esantiems nitrifikacijos inhibitoriams (pvz., nitrapirinui), papildomai informacijai gauti gali būti atliekamas anglies transformavimo bandymas.

Dirvožemį sudaro gyvieji ir negyvieji komponentai, esantys sudėtinuose ir heterogeniniuose mišiniuose. Mikroorganizmai vaidina svarbų vaidmenį vykstant derlingų dirvožemių organinių medžiagų skaidymui ir transformavimui, kai didelis rūšių skaičius prisideda prie įvairių dirvožemio derlingumo aspektų. Visi ilgalaikiai tokių biocheminių procesų trukdžiai gali pažeisti mitybinių elementų ciklą, o tai gali pakeisti dirvožemio derlingumą. Anglies ir azoto transformavimas vyksta visuose derlinguose dirvožemiuose. Nors už šiuos procesus atsakingos mikrobiologinės kolonijos įvairiuose dirvožemiuose yra skirtingos, transformavimo keliai iš esmės yra tokie patys.

▼C1

Šis bandymo metodas skirtas nustatyti ilgalaikį neigiamą medžiagos poveikį anglies transformavimui aerobiniuose paviršiniuose dirvožemiuose. Šis bandymas yra jautrus už anglies transformavimą atsakingų mikrobinių kolonijų dydžio ir aktyvumo pokyčiams, kadangi atliekant šį bandymą, kolonijos patiria cheminio poveikio įtampą ir anglies badą. Naudojamas smėlėtas dirvožemis, turintis mažai organinių medžiagų. Šis dirvožemis apdorojamas bandomąja medžiaga ir inkubuojamas sąlygomis, kurios užtikrina greitą mikrobinę medžiagų apykaitą. Šiomis sąlygomis greitai išsenka lengvai iš dirvožemio įsisavinamos anglies šaltiniai. Tai sukelia anglies trūkumą, dėl kurio žūsta mikrobų ląstelės ir atsiranda neveiklumo būsena ir (arba) sporuliacija. Jei bandymas trunka ilgiau kaip 28 paras, galima išmatuoti šių reakcijų sumą (neapdoroto dirvožemio) kontroliniuose ėminiuose, kaip laipsnišką veikliosios mikrobinės biomasės, dalyvaujančios medžiagų apykaitoje, mažėjimą (7). Jei dirvožemyje su anglies trūkumu biomasė bandymo sąlygomis yra veikiama dirvožemyje esančios cheminės medžiagos, biomasės kiekis gali neatsistatyti iki kontroliniame ėminyje esančio kiekio. Todėl bet kuriuo bandymo metu bandomosios medžiagos sukelti trukdžiai dažnai tęsiasi iki bandymo pabaigos.

Bandymai, naudoti šiam bandymo metodui parengti, iš pradžių buvo skirti medžiagoms, kurių kiekį, pasiekiantį dirvožemį, buvo galima numatyti. Taip pasitaiko, pvz., naudojant augalų apsaugos produktus, kurių laukuose barstomos medžiagos norma yra žinoma. Bandant agrochemines medžiagas, pakanka dviejų dozių, atitinkančių numatomą arba prognozuojamą naudojimo normą. Agrochemines medžiagas galima bandyti kaip veikliuosius ingredientus (v.i.) arba kaip preparatus. Tačiau bandymas neapsiriboja cheminėmis medžiagomis, turinčiomis prognozuojamas aplinkos koncentracijos vertes. Keičiant į dirvožemį dedamos bandomosios medžiagos kiekį ir duomenų įvertinimo būdą, bandymą dar galima naudoti cheminėms medžiagoms, kurių kiekis, tikėtinai patenkantis į dirvožemį, yra nežinomas. Taigi jei tai ne agrocheminės medžiagos, nustatomas medžiagos kelių koncentracijos verčių poveikis anglies transformavimui. Šių bandymų duomenys yra naudojami dozės ir reakcijos santykio kreivei gauti ir EC_x vertėms apskaičiuoti, kai x yra apibrėžiamas kaip poveikio %.

1.2. APIBRĖŽTYS

Anglies transformavimas – organinės medžiagos skaidymas mikroorganizmais iki atitinkamo neorganinio galutinio produkto – anglies dioksido.

EC_x (efektyvioji koncentracija) – bandomosios medžiagos koncentracija dirvožemyje, kai anglies transformavimas į anglies dioksidą inhibuojamas x procentų.

EC_{50} (vidutinė efektyvioji koncentracija) – bandomosios medžiagos koncentracija dirvožemyje, kai anglies transformavimas į anglies dioksidą inhibuojamas 50 procentų.

1.3 ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

▼C1

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Sijotas dirvožemis apdorojamas bandomąja medžiaga arba paliekamas neapdorotas (kontrolinis). Jei bandomos agrocheminės medžiagos, rekomenduojama naudoti mažiausiai dvejopą bandymo koncentraciją, kuri pasirenkama pagal didžiausią lauke numatomą koncentraciją. Po 0, 7, 14 ir 28 inkubavimo parų apdoroti ir kontroliniai dirvožemio ėminiai maišomi su gliukoze ir 12 h nepertraukiamai matuojamas gliukozės sukeliamo kvėpavimo greitis. Kvėpavimo greitis yra išreiškiamas kaip išsiskyrusio anglies dioksido (mg anglies dioksido/kg sauso dirvožemio/h) arba suvartoto deguonies (mg deguonies/kg dirvožemio/h) kiekis. Vidutinis kvėpavimo greitis apdorotame dirvožemyje lyginamas su kvėpavimo greičiu kontroliniame ėminyje ir apskaičiuojamas apdorotojo ėminio procentinis nuokrypis nuo kontrolinio ėminio. Visi bandymai atliekami mažiausiai 28 paras. Jei 28 parą apdoroto ir neapdoroto dirvožemio skirtumas yra lygus arba didesnis kaip 25 %, matavimai tęsiami kas 14 parų ne daugiau kaip iki 100 parų. Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, į dirvožemio ėminius dedama kelių koncentracijos verčių bandomoji medžiaga, ir po 28 parų matuojamas gliukozės sukeliamo kvėpavimo greitis (t. y. susidariusio anglies dioksido arba suvartoto deguonies vidutinis kiekis). Koncentracijos verčių serijos bandymų rezultatai analizuojami taikant regresijos modelį ir apskaičiuojamos EC_x vertės (t. y. EC_{50}, EC_{25} ir (arba) EC_{10}). Žr. apibrėžtis.

1.5. BANDYMO TINKAMUMAS

Bandymų su agrocheminėmis medžiagomis rezultatai pagrįsti palyginti mažu (t. y. vidutinė vertė ± 25 %) išsiskyrusio anglies dioksido arba suvartoto deguonies kiekio kontroliniame ir apdorotame dirvožemio ėminyje skirtumu, taigi didelė kontrolinių ėminių duomenų sklaida gali būti klaidingų rezultatų priežastimi. Todėl kartotinių kontrolinių ėminių rezultatų skirtumas turi būti mažesnis kaip ± 15 %.

1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Aparatūra**

Naudojami bandymo indai, pagaminti iš chemiškai inertiškos medžiagos. Jie turi būti reikiamos talpos atsižvelgiant į dirvožemių inkubavimui taikomą metodiką, t. y. viso vieno ėminio arba kelių atskirų dirvožemio dalinių ėminių inkubavimą (žr. 1.7.1.2 skirsnį). Reikia stengtis kiek įmanoma sumažinti vandens nuostolius, bet tuo pačiu užtikrinti dujų mainus atliekant bandymą (pvz., indai gali būti uždengiami polietileno plėvele su skylutėmis). Bandant lakiąsias medžiagas, reikia naudoti uždaromus ir sandarius dujoms indus. Jų dydis pasirenkamas taip, kad dirvožemio ėminys sudarytų maždaug vieną ketvirtąją indo tūrio.

Gliukozės sukeliamam kvėpavimui nustatyti reikia turėti inkubavimo sistemas ir prietaisus anglies dioksido susidarymui arba deguonies suvartojimui matuoti. Tokių sistemų pavyzdžiai ir prietaisai aprašyti literatūroje (8) (9) (10) (11).

1.6.2. **Dirvožemių pasirinkimas ir skaičius**

Naudojamas vienos rūšies dirvožemis. Rekomenduojamas dirvožemis, kurio charakteristikos:

— smėlio kiekis: ne mažesnis kaip 50 % ir ne didesnis kaip 75 %,

▼C1

— pH: 5,5– 7,5,

— organinės anglies kiekis: 0,5– 1,5 %,

— matuojama mikrobinė biomasė (12)(13) ir jos anglies kiekis turi sudaryti ne mažiau kaip 1 % bendrosios dirvožemio organinės anglies.

Dirvožemis, kurio tokios charakteristikos, dažniausiai atitinka blogiausią atvejį, kadangi cheminės medžiagos absorbcija yra mažiausia, o mikrofloros galimybė jos gauti yra didžiausia. Taigi bandymų su kitais dirvožemiais paprastai nereikia atlikti. Tačiau tam tikromis aplinkybėmis, pvz., jei medžiagą iš esmės numatoma naudoti konkrečiame dirvožemyje, pvz., rūgščiajame miško dirvožemyje, arba naudojamos elektrostatinį krūvį turinčios cheminės medžiagos, gali tekti naudoti papildomą dirvožemį.

1.6.3. **Dirvožemio ėminių rinkimas ir laikymas**

1.6.3.1. *Rinkimas*

Reikia turėti išsamios informacijos apie lauko vietą, iš kurios imamas bandymo dirvožemis. Nurodoma tiksli padėtis, augalų danga, apdorojimo augalų apsaugos produktais datos, apdorojimas organinėmis ir neorganinėmis trąšomis, biologinių priedų dėjimas arba atsitiktiniai teršalai. Dirvožemio ėmimui pasirinkta vieta turėtų užtikrinti ilgalaikį naudojimą. Tinka nuolatinės ganyklos, laukai su kasmetiniais grūdiniais augalais (išskyrus kukurūzus) arba tankiai pasėtų žaliųjų trąšų laukai. Pasirinkta ėminio ėmimo vieta neturi būti apdorojama augalų apsaugos produktais mažiausiai vienerius metus iki ėminių ėmimo. Be to, mažiausiai šešis mėnesius neturėjo būti dedama organinių trąšų. Mineralines trąšas galima naudoti tik tuo atveju, jei to reikia pasėliams, o dirvožemio ėminiai imami ne anksčiau kaip trys mėnesiai po tręšimo. Reikia vengti naudoti dirvožemį, apdorotą trąšomis, turinčiomis žinomų biocidinių savybių (pvz., kalcio cianamidas).

Reikia vengti imti ėminius esant ilgalaikiam (ilgesniam kaip 30 parų) sausros arba potvynio laikotarpiui arba iš karto jam pasibaigus. Ariamų dirvožemių ėminiai imami iš 0–20 cm gylio. Pievose (ganyklose) arba kituose ilgą laiką (bent vieną auginimo sezoną) neariamuose dirvožemiuose didžiausias ėminio ėmimo gylis gali būti šiek tiek didesnis kaip 20 cm (pvz., iki 25 cm). Dirvožemio ėminiai vežami tokiuose induose ir esant tokioms temperatūros sąlygoms, kurios neleistų reikšmingai pakisti pradinėms dirvožemio savybėms.

1.6.3.2. *Laikymas*

Pageidautina naudoti neseniai lauke paimtus dirvožemius. Jei laikymo laboratorijoje neįmanoma išvengti, dirvožemiai gali būti ne ilgiau kaip tris mėnesius laikomi tamsoje, esant 4 ± 2 °C. Laikant dirvožemį, turi būti užtikrintos aerobinės sąlygos. Jei dirvožemis imamas iš vietovių, kuriose jis būna įšalęs mažiausiai tris mėnesius per metus, jį galima laikyti šešis mėnesius, esant –18 °C. Laikomo dirvožemio mikrobinė biomasė matuojama prieš kiekvieną bandymą ir biomasės anglis turi sudaryti mažiausiai 1 % viso dirvožemio organinės anglies kiekio (žr. 1.6.2 skirsnį).

▼C1

1.6.4. **Dirvožemio tvarkymas ir ruošimas bandymui**

1.6.4.1. *Pradinis inkubavimas*

Jei dirvožemis buvo laikomas saugykloje (žr. 1.6.4.2 ir 1.7.1.3 skirsnius), rekomenduojama daryti pradinį inkubavimą, kurio trukmė būtų nuo 2 iki 28 parų. Temperatūra ir dirvožemio drėgmės kiekis pradinio inkubavimo laikotarpiu turi atitikti bandymo sąlygas (žr. 1.6.4.2 ir 1.7.1.3 skirsnius).

1.6.4.2. *Fizikinės ir cheminės savybės*

Iš dirvožemio rankiniu būdu pašalinami dideli daiktai (pvz., akmenys, augalų dalys ir t. t.), tuomet drėgnas dirvožemis sijojamas iki 2 mm arba mažesnių dalelių. Drėgmės kiekis dirvožemio ėminyje reguliuojamas distiliuotu arba dejonizuotu vandeniu iki vertės, sudarančios 40–60 % didžiausios vandens sulaikymo gebos.

1.6.5. **Bandomosios medžiagos ruošimas įterpti į dirvožemį**

Bandomoji medžiaga paprastai įterpiama naudojant nešiklį. Kaip nešiklis gali būti naudojamas vanduo (vandenyje tirpių medžiagų) arba inertinė kietoji medžiaga, pvz., smulkus kvarcinis smėlis (dalelių dydis: 0,1– 0,5 mm). Kitų nei vanduo skystųjų nešiklių (pvz., organinių tirpiklių, pvz., acetono, chloroformo) reikėtų vengti, kadangi jie gali kenkti mikroflorai. Jei kaip nešiklis naudojamas smėlis, jo daleles galima padengti bandomąja medžiaga, ištirpinta arba suspenduota atitinkamame tirpiklyje. Tokiais atvejais prieš maišant su dirvožemiu tirpiklis išgarinamas. Siekiant optimaliai paskirstyti bandomąją medžiagą dirvožemyje, rekomenduojama naudoti 10 g smėlio vienam kilogramui dirvožemio (sausos medžiagos masės). Kontroliniai ėminiai apdorojami tik lygiaverčiu vandens ir (arba) kvarcinio smėlio kiekiu.

Jei bandomos lakiosios cheminės medžiagos, apdorojant reikia kiek įmanoma vengti nuostolių ir stengtis užtikrinti tolygų pasiskirstymą dirvožemyje (pvz., bandomąją medžiagą reikėtų įšvirkšti keliose dirvožemio vietose).

1.6.6. **Bandymo koncentracijos vertės**

Jei bandomi augalų apsaugos produktai arba kitos numatomos aplinkos koncentracijos medžiagos, turi būti bandoma mažiausiai dvejopa koncentracija. Mažesnė koncentracija turėtų rodyti bent didžiausią kiekį, kuris tikėtinai pasiektų dirvožemį praktinėmis sąlygomis, tuo tarpu didesnė koncentracija turėtų būti mažesnės koncentracijos kartotinis dydis. Į dirvožemį įterpiamos bandomosios medžiagos koncentracijos vertės apskaičiuojamos darant prielaidą apie tolygų įterpimą į 5 cm gylį ir dirvožemio santykinį tankį 1,5. Agrocheminių medžiagų, tiesiogiai įterpiamų į dirvožemį, arba cheminių medžiagų, kurių dirvožemį pasiekiantis kiekis gali būti numatytas, rekomenduojamos bandymo koncentracijos vertės yra didžiausia numatoma aplinkos koncentracija (*Predicted Environmental Concentration – PEC*) ir penkis kartus didesnė koncentracija. Medžiagos, kurias numatoma įterpti į dirvožemį kelis kartus per vieną sezoną, bandomos esant koncentracijos vertėms, gautoms *PEC* vertę padauginus iš didžiausio numatomo įterpimų skaičiaus. Tačiau viršutinė bandymo koncentracijos vertė neturi būti daugiau kaip dešimt kartų didesnė už didžiausią vienkartinio įterpimo normą.

Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, naudojama mažiausiai penkių koncentracijos verčių eilė pagal geometrinę progresiją. Bandymo koncentracijos vertės turi atitikti intervalą, reikalingą EC_x vertėms nustatyti.

▼C1

1.7. BANDYMO PROCEDŪRA

1.7.1. **Veikimo sąlygos**

1.7.1.1. *Apdorojami ir kontroliniai ėminiai*

Jei bandomos agrocheminės medžiagos, dirvožemis dalijamas į tris vienodos masės dalis. Dvi dalys maišomos su produkto turinčiu nešikliu, o trečioji maišoma su nešikliu be produkto (kontrolinis bandymas). Rekomenduojama paruošti mažiausiai tris kartotinius apdorotų dalių ir neapdorotos dalies dirvožemio ėminius. Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, dirvožemis dalijamas į šešias vienodos masės dalis. Penki ėminiai maišomi su bandomosios medžiagos turinčiu nešikliu, o šeštasis ėminys sumaišomas su nešikliu be cheminės medžiagos. Rekomenduojama paruošti mažiausiai tris apdorotų dirvožemio dalių ir neapdorotos dirvožemio dalies kartotinius ėminius. Reikia stengtis užtikrinti tolygų bandomosios medžiagos pasiskirstymą apdorotuose dirvožemio ėminiuose. Maišant reikėtų vengti dirvožemio sutankinimo ir grumstų susidarymo.

1.7.1.2. *Dirvožemio ėminių inkubavimas*

Dirvožemio ėminius galima inkubuoti dviem būdais: kaip vientisus kiekvieno apdoroto ir neapdoroto dirvožemio ėminius arba kaip seriją atskirų ir vienodo dydžio kiekvieno apdoroto ir neapdoroto dirvožemio mėginių. Tačiau bandant lakiąsias medžiagas, bandymas atliekamas tik vienu būdu, naudojant atskirų mėginių seriją. Kai dirvožemis inkubuojamas kaip vientisas ėminys, ruošiamas didelis kiekvieno apdoroto ir neapdoroto dirvožemio ėminio kiekis ir prireikus imami jo mėginiai analizei atliekant bandymą. Kiekvienam apdorojimui ir kontroliniams ėminiams iš pradžių paruoštas kiekis priklauso nuo mėginių dydžio, analizei naudojamų kartotinių mėginių skaičiaus ir nuo numatomo didžiausio mėginių ėmimo kartų skaičiaus. Dirvožemis, inkubuojamas kaip vientisas ėminys, prieš imant mėginius turi būti gerai sumaišomas. Kai dirvožemis inkubuojamas kaip serija atskirų dirvožemio mėginių, kiekvienas apdorotas ir neapdorotas vientisas dirvožemio ėminys dalijamas į reikiamą mėginių skaičių, kurie prireikus yra naudojami. Atliekant bandymus, kuriuose gali būti numatyta mėginius imti daugiau kaip du kartus, reikia paruošti pakankamą skaičių mėginių, kad būtų galima atsižvelgti į visus kartotinius mėginius ir mėginių ėmimo kartų skaičių. Mažiausiai trys bandymo dirvožemio kartotiniai ėminiai inkubuojami aerobinėmis sąlygomis (žr. 1.7.1.1 skirsnį). Atliekant visus bandymus turi būti naudojami atitinkami indai su pakankamo tūrio laisvąja erdve, kad būtų išvengta anaerobinių sąlygų. Kai bandomos lakiosios medžiagos, bandymas turi būti atliekamas naudojant seriją atskirų mėginių.

1.7.1.3. *Bandymo sąlygos ir trukmė*

Bandymas atliekamas tamsoje, esant 20 ± 2 °C temperatūrai. Drėgmės kiekis dirvožemio ėminiuose visą bandymo laiką turi būti palaikomas ± 5 % tikslumu ir turi sudaryti nuo 40 % iki 60 % dirvožemio didžiausios vandens sulaikymo gebos (žr. 1.6.4.2 skirsnį). Prireikus galima įpilti distiliuoto arba dejonizuoto vandens.

Mažiausia bandymų trukmė – 28 dienos. Jei bandomos agrocheminės medžiagos, lyginami išsiskyrusio anglies dioksido arba suvartoto deguonies kiekiai apdorotuose ir kontroliniuose ėminiuose. Jei 28 parą jie skiriasi daugiau kaip 25 %, bandymas tęsiamas tol, kol gaunamas 25 % arba mažesnis skirtumas, bet ne ilgiau kaip 100 parų. Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, bandymas baigiamas po 28 parų. 28 parą nustatomas išsiskyrusio anglies dioksido arba suvartoto deguonies kiekis apdorotuose ir kontroliniuose dirvožemio ėminiuose ir apskaičiuojamos EC_x vertės.

▼C1

1.7.2. **Dirvožemių ėminių ėmimas ir analizė**

1.7.2.1. *Dirvožemio ėminių ėmimo grafikas*

Jei bandomos agrocheminės medžiagos, dirvožemio ėminiai gliukozės sukeliamo kvėpavimo greičiui nustatyti analizuojami 0, 7, 14 ir 28 parą. Jei bandymą reikia tęsti, papildomi matavimai po 28 paros daromi kas 14 parų.

Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, naudojamos mažiausiai penkios bandymo koncentracijos vertės ir dirvožemio ėminiai gliukozės sukeliamo kvėpavimo greičiui nustatyti analizuojami prieš bandymo pradžią (0 parų) ir veikimo laikotarpiui pasibaigus (28 parą). Jei manoma, kad būtinas tarpinis matavimas, jį galima daryti, pvz., 7 parą. Duomenys, gauti 28 parą, naudojami cheminės medžiagos EC_x vertei nustatyti. Jei pageidaujama, 0 dienos kontrolinių ėminių duomenys gali būti naudojami pradiniam veikliosios mikrobinės biomasės, dalyvaujančios medžiagų apykaitoje, kiekiui dirvožemyje įvertinti (12).

1.7.2.2. *Gliukozės sukeliamo kvėpavimo greičio matavimas*

Gliukozės sukeliamo kvėpavimo greitis kiekviename apdorotame ir kontroliniame kartotiniame ėminyje nustatomas kiekvieną kartą paėmus mėginius. Dirvožemio mėginiai maišomi su pakankamu gliukozės kiekiu didžiausiai betarpiškai kvėpavimo reakcijai nustatyti. Gliukozės kiekis, reikalingas konkretaus dirvožemio didžiausiai kvėpavimo reakcijai nustatyti, gali būti įvertintas, atliekant pradinį bandymą su keliomis gliukozės koncentracijos vertėmis (14). Tačiau smėlio dirvožemiui, turinčiam 0,5–1,5 % organinės anglies, paprastai pakanka 2 000–4 000 mg gliukozės vienam kg sauso dirvožemio. Gliukozę galima sumalti į miltelius su švariu kvarciniu smėliu (10 g smėlio/kg sauso dirvožemio) ir paruošti vienalytį mišinį su dirvožemiu.

Gliukoze pagerinto dirvožemio ėminiai inkubuojami tinkamame aparate kvėpavimo greičiui matuoti nepertraukiamai, kas valandą arba kas dvi valandas (žr. 1.6.1 skirsnį), esant 20 ± 2 °C. Išsiskyrusio anglies dioksido arba suvartoto deguonies kiekis matuojamas 12 h iš eilės, matavimus pradedant kiek įmanoma anksčiau, t. y. 1–2 h po gliukozės pridėjimo. Išmatuojamas bendras per 12 h išsiskyrusio anglies dioksido arba suvartoto deguonies kiekis ir nustatomas vidutinis kvėpavimo greitis.

2. **DUOMENYS**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Jei bandomos agrocheminės medžiagos, užrašomas kiekviename kartotiniame dirvožemio ėminyje susidariusio anglies dioksido arba suvartoto deguonies kiekis ir visų kartotinių ėminių vidutinės vertės pateikiamos lentelėse. Rezultatai įvertinami taikant atitinkamus visuotinai priimtus statistinius metodus (pvz., F bandymą, 5 % reikšmingumo lygmuo). Gliukozės sukeliamo kvėpavimo greitis išreiškiamas mg anglies dioksido/kg sauso dirvožemio/h. Vidutinis anglies dioksido išsiskyrimo arba deguonies suvartojimo greitis kiekviename apdorotame ėminyje lyginamas su greičiu, gautu kontroliniam ėminiui, ir apskaičiuojama procentais išreikšta nuokrypio nuo kontrolinio ėminio vertė.

▼C1

Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, nustatomas kiekviename kartotiniame ėminyje išsiskyrusio anglies dioksido arba suvartoto deguonies kiekis, ir EC_x vertėms įvertinti braižoma dozės ir reakcijos santykio kreivė. Gliukozės sukeliamas kvėpavimo greitis (t. y. mg anglies dioksido arba mg deguonies/kg sauso dirvožemio/h), nustatytas apdorotuose ėminiuose po 28 parų, lyginamas su kontroliniams ėminiams nustatytu greičiu. Pagal šiuos duomenis kiekvienai bandymo koncentracijai apskaičiuojamos inhibavimo % vertės. Šios procentinės vertės pateikiamos grafike kaip koncentracijos funkcija, o EC_x vertėms apskaičiuoti taikomos statistinės metodikos. Be to, taikant tipines metodikas (15) (16) (17), nustatomos apskaičiuotos EC_x vertės pasikliovimo ribos (p = 0,95).

2.2. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Jei vertinant agrocheminių medžiagų bandymų rezultatus, ėminyje, turinčiame mažesnę koncentraciją (t. y. didžiausią numatomą koncentraciją), bei kontroliniame ėminyje kvėpavimo greičio skirtumas bet kuriuo mėginio ėmimo metu po 28 paros yra lygus 25 % arba mažesnis, produktą galima įvertinti kaip nedarantį ilgalaikio poveikio anglies transformavimui dirvožemiuose. Kai įvertinami kitų nei agrocheminės medžiagos cheminių medžiagų bandymo rezultatai, naudojamos EC_{50}, EC_{25} ir (arba) EC_{10} vertės.

3. **ATASKAITA**

BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

Išsamus naudojamo dirvožemio identifikavimas, įskaitant:

— geografinę vietos nuorodą (platuma, ilguma),

— informaciją apie vietos istoriją (t. y. augalinė danga, apdorojimas augalų apsaugos produktais, apdorojimas trąšomis, atsitiktiniai teršalai ir t. t.),

— naudojimo tipą (pvz., žemės ūkio paskirties žemė, miškas ir t. t.),

— ėminio ėmimo gylį (cm),

— smėlio/dumblo/molio kiekį (% sausos medžiagos masės),

— pH vertę (vandenyje),

— organinės anglies kiekį (% sausos medžiagos masės),

— azoto kiekį (% sausos medžiagos masės),

— jonų mainų gebą (mmol/kg),

— pradinę mikrobinę biomasę, išreikštą bendrosios organinės anglies procentine dalimi,

— metodų, taikytų kiekvienam parametrui nustatyti, nuorodas,

— visą informaciją apie dirvožemio ėminių ėmimą ir laikymą,

— visą informaciją apie pradinio dirvožemio inkubavimą, jei daromas.

▼C1

Bandomoji medžiaga:

— fizikinė būsena ir, jei tinka, fizikinės ir cheminės savybės,

— cheminio identifikavimo duomenys, jei tinka, įskaitant struktūrinę formulę, grynumą (t. y. augalų apsaugos produktų atveju veikliojo ingrediento procentinę dalį), azoto kiekį.

Bandymo sąlygos:

— išsami informacija apie dirvožemio gerinimą organiniu substratu,

— naudotų bandomosios medžiagos koncentracijos verčių skaičius ir, jei tinka, pasirinktų koncentracijos verčių pagrindimas,

— išsami informacija apie bandomosios medžiagos įterpimą į dirvožemį,

— inkubavimo temperatūra,

— drėgmės kiekis dirvožemyje pradedant bandymą ir jį atliekant,

— taikytas dirvožemio inkubavimo metodas (t. y. kaip vientisas ėminys arba kaip eilė atskirų mėginių),

— kartotinių ėminių skaičius,

— ėmimo skaičius.

Rezultatai:

— metodas ir įranga kvėpavimo greičiui matuoti,

— lentelių duomenys, įskaitant atskiras ir vidutines anglies dioksido arba deguonies vertes,

— apdorotų ir kontrolinių kartotinių ėminių rezultatų nuokrypis,

— apskaičiavimams daromų pataisų aiškinimai, jei tinka,

— procentais išreikštas gliukozės sukeliamo kvėpavimo greičio nuokrypis kiekvieną kartą imant mėginį, arba, jei tinka, EC_{50} vertė esant 95 procentų pasikliovimo ribai, kitos EC_x vertės (t. y. EC_{25} arba EC_{10}) ir pasikliovimo ribos, dozės ir reakcijos santykio kreivės grafikas,

— statistinis rezultatų apdorojimas, jei tinka,

— visa informacija ir pastebėjimai, kurie padėtų aiškinti rezultatus.

4. **NUORODOS**

1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1–16, 1994.

2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Pl ant Protection Products, VI, 1–1 (2nd eds., 1990).

3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼C1

4) SET AC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.

6) ISO 10381–6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in „Pesticide Effects on Soil Microflora". Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45–60.

8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in „Methods of Soil Analysis – Part 2: Chemical and Microbiological Properties". Agronomy Monograph N° 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831–871.

9) ISO 11266–1. (1993). Soil Quality – Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

11) Heinemeye, r O., Insam, H., Kaiser, E. A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77–81.

12) ISO 14240–1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.

13) ISO 14240–2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluβ von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113–120.

15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Then, 96, 99–113.

16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼C1

C.23. AEROBINIS IR ANAEROBINIS TRANSFORMAVIMAS DIRVOŽEMYJE

1. METODAS

Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 307 (2002)

1.1. ĮVADAS

Šis bandymo metodas pagrįstas esamomis rekomendacijomis (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Šiame bandymo metode aprašytas metodas skirtas cheminių medžiagų aerobiniam ir anaerobiniam transformavimui dirvožemyje įvertinti. Bandymai yra atliekami siekiant nustatyti: i) bandomosios medžiagos virsmo greitį ir ii) transformavimo produktų, kurie gali veikti augalus bei dirvožemio organizmus, tipą ir susidarymo bei išnykimo greitį. Taip turi būti tiriamos cheminės medžiagos, kurios tiesiogiai įterpiamos į dirvožemį arba kurios gali pasiekti dirvožemio aplinką. Be to, tokių laboratorinių tyrimų rezultatai gali būti naudojami atitinkamų lauko tyrimų ėminių ėmimo ir analizės protokolams kurti.

Aerobinių ir anaerobinių tyrimų vieno tipo dirvožemiui paprastai pakanka virsmo keliams vertinti (8) (10) (11). Transformavimo greitis turėtų būti įvertinamas bent trims papildomiems dirvožemio tipams (8) (10).

Belgirate, Italijoje, 1995 m. vykusiame OECD seminare dėl dirvožemių ir nuosėdinių uolienų atrankos (10) buvo konkrečiai sutarta dėl šiame bandyme naudojamų dirvožemių skaičiaus ir tipo. Bandomų dirvožemių tipas turėtų atitikti aplinkos sąlygas, kuriose medžiaga bus naudojama arba išmetama. Pvz., cheminės medžiagos, kurios gali būti išmetamos subtropinio arba tropinio klimato sąlygomis, turėtų būti bandomos *Ferrasol* arba *Nitosol* tipo dirvožemiuose (Maisto ir žemės ūkio organizacijos (FAO) sistema). Be to, seminare buvo pateiktos dirvožemio ėminių ėmimo, tvarkymo ir laikymo rekomendacijos, pagrįstos ISO rekomendaciniu dokumentu (15). Be to, šiame metode nagrinėjami ryžių laukų dirvožemiai.

1.2. APIBRĖŽTYS

Bandomoji medžiaga – bet kuri medžiaga (tai gali būti pradinis junginys arba medžiagos virsmo produktai).

Transformavimo produktai – visos medžiagos, susidarančios vykstant bandomosios medžiagos biotinio arba abiotinio virsmo reakcijoms, įskaitant CO_2 ir surištuosius likučius.

Surištieji likučiai – dirvožemyje, augale arba gyvūne esantys junginiai, kurie po ekstrahavimo lieka matricoje pradinės medžiagos arba jos metabolito (-ų) ar transformavimo produktų pavidalu. Ekstrahavimo metodas iš esmės turi nekeisti pačių junginių arba matricos struktūros. Ryšio prigimtį galima iš dalies išaiškinti, taikant matricą keičiančius ekstrahavimo metodus ir sudėtingus analizės metodus. Pvz., tokiu būdu iki šiol yra identifikuotos kovalentinės, joninės ir sorbcinio tipo jungtys, be to, pagautieji junginiai. Apskritai, surištųjų likučių susidarymas labai mažina biologinį įsisavinamumą ir biologinį kaupimąsi (12) (modifikuota IUPAC 1984 (13) apibrėžtis).

Aerobinis transformavimas – reakcijos, vykstančios esant molekuliniam deguoniui (14).

▼C1

Anaerobinis transformavimas – reakcijos, vykstančios nesant molekulinio deguonies (14).

Dirvožemis – mineralinių ir organinių cheminių sudedamųjų dalių mišinys, kuriame organinius komponentus sudaro didelį anglies ir azoto kiekį turintys ir didelės molekulinės masės junginiai ir kurio gyvieji organizmai yra maži (daugiausia mikro-) organizmai. Galima apdoroti dviejų būsenų dirvožemį:

a) nepaliestą, koks susidaro per laiką, esantį tipiškuose įvairių dirvožemio tipų sluoksniuose;

b) paliestą, koks jis paprastai yra ariamuose laukuose arba koks jis imamas kasant ir panaudojamas šiame bandymo metode (14).

Mineralizacija – yra visiškas organinio junginio skilimas į CO_2 ir H_2O aerobinėmis sąlygomis, ir į CH_4, CO_2 bei H_2O anaerobinėmis sąlygomis. Šiame bandymo metode, kai naudojamas ^{14}C žymėtas junginys, mineralizacija yra didelio laipsnio skilimas, kai žymėtasis anglies atomas oksiduojamas, susidarant atitinkamam $^{14}CO_2$ kiekiui (14).

Pusėjimo trukmė – $t_{0,5}$, laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 50 %, kai transformavimui aprašyti tinka pirmojo laipsnio kinetika; ji nepriklauso nuo koncentracijos.

DT_{50} (išnykimo trukmė 50) – laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 50 %; ši trukmė ir pusėjimo trukmė $t_{0,5}$ skiriasi, kai transformavimas neatitinka pirmojo laipsnio kinetikos.

DT_{75} (išnykimo trukmė 75) – laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 75 %.

DT_{90} (išnykimo trukmė 90) – laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 90 %.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Etaloninės medžiagos naudojamos, jei transformavimo produktams apibūdinti ir (arba) identifikuoti taikomi spektroskopiniai ir chromatografijos metodai.

1.4. BANDYMO TINKAMUMAS

Metodas tinka visoms cheminėms medžiagoms (nežymėtoms arba žymėtoms), kurioms nustatyti yra sukurtas pakankamo tikslumo ir jautrio analizės metodas. Jis tinka mažai lakiems, nelakiems, vandenyje tirpiems arba netirpiems junginiams. Bandymas neturi būti taikomas cheminėms medžiagoms, kurios labai greit išgaruoja iš dirvožemio (pvz., fumigantai, organiniai tirpikliai), todėl negali būti laikomos dirvožemyje šio bandymo sąlygomis.

▼C1

1.5. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

Transformavimo greičiui matuoti gali būti naudojama pažymėtoji arba žymėtoji bandomoji medžiaga. Žymėtoji medžiaga reikalinga transformavimo keliui tirti ir masių balansui nustatyti. Rekomenduojama žymėti ^{14}C, bet gali būti naudingi kiti izotopai, pvz., ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Kiek tai įmanoma, žymėtasis atomas turi būti patvariausioje (-iose) molekulės dalyje (-yse) ([1]). Bandomosios medžiagos grynumas turi būti mažiausiai 95 %.

Prieš pradedant atlikti aerobinio ir anaerobinio transformavimo dirvožemyje bandymą, turi būti gauta ši informacija apie bandomąją medžiagą:

a) tirpumas vandenyje (A.6 metodas);

b) tirpumas organiniuose tirpikliuose;

c) garų slėgis (A.4 metodas) ir Henrio dėsnio konstanta;

d) pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolis/vanduo) (A.8 metodas);

e) cheminis patvarumas tamsoje (hidrolizė) (C.7 metodas);

f) pK_a jei molekulė gali atiduoti arba prisijungti protonus (OECD TG 112) (16).

Kitą naudingą informaciją gali sudaryti duomenys apie bandomosios medžiagos toksišką poveikį dirvožemio mikroorganizmams [bandymo metodai C.21 ir C.22] (16).

Reikia turėti analizės metodus (įskaitant ekstrahavimo ir gryninimo metodus) bandomajai medžiagai ir jos transformavimo produktams identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti.

1.6. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Dirvožemio ėminiai apdorojami bandomąja medžiaga ir inkubuojami tamsoje, naudojant biometrines kolbas arba pratekėjimo sistemas kontroliuojamomis laboratorinėmis sąlygomis (esant pastoviai temperatūrai ir dirvožemio drėgmei). Po tam tikro intervalo dirvožemio ėminiai ekstrahuojami ir analizuojami pradinei medžiagai ir jos transformavimo produktams nustatyti. Be to, naudojant atitinkamus absorbcijos įtaisus, renkami ir analizuojami lakieji produktai. Naudojant ^{14}C žymėtą medžiagą ir surenkant išsiskyrusį $^{14}CO_2$, galima išmatuoti įvairias bandomosios medžiagos mineralizacijos greičio vertes ir nustatyti masių balansą, įskaitant dirvožemiu surištus likučius.

1.7. KOKYBĖS KRITERIJAI

1.7.1. **Regeneravimas**

Mažiausiai dviejų kartotinių dirvožemio ėminių ekstrahavimas ir analizė iškart po bandomosios medžiagos pridėjimo yra pirmasis analizės metodo pakartojamumo ir bandomosios medžiagos įterpimo metodikos tolygumo rodiklis. Vėlesnių bandymo stadijų regeneravimo laipsnis gaunamas matuojant atitinkamų masės verčių balansą. Žymėtųjų cheminių medžiagų regeneravimo laipsnis turi būti nuo 90 % iki 110 % (8), nežymėtųjų cheminių medžiagų – nuo 70 % iki 110 % (3).

([1]) Pvz., jei bandomoji medžiaga turi vieną žiedą, žymėtasis atomas turi būti šiame žiede; jei bandomoji medžiaga turi du žiedus arba daugiau, gali tekti daryti atskirus tyrimus kiekvieno žiedo su žymėtuoju atomu likimui įvertinti ir atitinkamai informacijai apie virsmo produktų susidarymą gauti.

▼C1

1.7.2. **Analizės metodo pakartojamumas ir jautrumas**

Bandomosios medžiagos ir transformavimo produktų kiekybinės analizės metodo pakartojamumas (išskyrus pradinį ekstrahavimo efektyvumą) gali būti patikrintas atliekant kartotinę to paties dirvožemio, inkubuoto pakankamai ilgai, kad galėtų susidaryti transformavimo produktai, ekstrakto analizę.

Bandomosios medžiagos ir transformavimo produktų analizės metodo aptikimo riba (LOD) turi būti mažiausiai 0,01 mg× kg^{-1} dirvožemio (kaip bandomosios medžiagos) arba 1 % įterpiamos dozės, imant mažesniąją vertę. Turi būti apibrėžta kiekybinio nustatymo riba (LOQ).

1.7.3. **Transformavimo duomenų tikslumas**

Atliekant bandomosios medžiagos koncentracijos verčių kaip laiko funkcijos regresinę analizę gaunama atitinkama informacija apie transformavimo kreivės patikimumą ir leidžia apskaičiuoti pusėjimo trukmės verčių pasikliovimo ribas (jei reakcija atitinka pseudopirmojo laipsnio kinetiką) arba DT_{50} vertes ir, jei tinka, DT_{75} ir DT_{90} vertes.

1.8. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.8.1. **Įranga ir cheminiai reagentai**

Inkubavimo sistemas sudaro statinės uždaros sistemos arba tinkamos pratekėjimo sistemos (7) (17). Tinkami pratekėjimo ir biometrinio tipo dirvožemio inkubavimo aparatai pavaizduoti 1 ir 2 paveiksluose. Kiekviena iš inkubavimo sistemų turi savo pranašumų ir trūkumų (7) (17).

Reikalinga tipinė laboratorinė įranga, visų pirma ši:

— analizės prietaisai, pvz., dujų ir skysčių chromatografijos (GLC), efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC), plonasluoksnės chromatografijos (TLC) įranga, įskaitant atitinkamas aptikimo sistemas pažymėtosioms arba nepažymėtosioms medžiagoms analizuoti, arba atvirkštinio izotopų skiedimo metodas,

— identifikavimui skirti prietaisai (pvz., MS, GC-MS, HPLC-MS, MBR ir t. t.),

— skysčių scintiliacinis skaitiklis,

— aparatūra radioaktyviosioms medžiagoms oksiduoti,

— centrifuga,

— ekstrahavimo aparatūra (pvz., centrifugos mėgintuvėliai žematemperatūriam ekstrahavimui ir Soksleto aparatas nepertraukiamam ekstrahavimui su grįžtamuoju šaldytuvu),

— įranga tirpalams ir ekstraktams koncentruoti (pvz., sukamasis garintuvas),

— vandens vonia,

— mechaninio maišymo įtaisas (pvz., tešlos maišytuvas, sukamasis maišytuvas).

▼C1

Naudojami cheminiai reagentai, pvz.:

— NaOH, analiziškai grynas, 2 mol dm^{-3}, arba kitas tinkamas šarmas (pvz., KOH, etanolaminas),

— H_2SO_4, analiziškai gryna, 0,05 mol dm^{-3},

— etilenglikolis, analiziškai grynas,

— kietosios sugeriančios medžiagos, pvz., natrio kalkės ir poliuretano kamščiai,

— organiniai tirpikliai, analiziškai gryni, pvz., acetonas, metanolis ir t. t.,

— scintiliacinis skystis.

1.8.2. **Bandomosios medžiagos įterpimas**

Norint bandomosios medžiagos įterpti į dirvožemį ir paskirstyti jame, ji gali būti ištirpinta vandenyje (dejonizuotame arba distiliuotame) arba prireikus kiek įmanoma mažesniame kiekyje acetono arba kitų organinių tirpiklių (6), kuriuose bandomoji medžiaga būtų pakankamai tirpi ir patvari. Tačiau pasirinkto tirpiklio kiekis neturi daryti reikšmingos įtakos dirvožemio mikrobiniam aktyvumui (žr. 1.5 ir 1.9.2–1.9.3 skirsnius). Reikia vengti naudoti tirpiklius, kurie inhibuoja mikrobinį aktyvumą, pvz., chloroformą, dichlormetaną ir kitus halogenintus tirpiklius.

Be to, bandomoji medžiaga gali būti įterpiama kaip kietoji medžiaga, pvz., sumaišyta su kvarciniu smėliu (6) arba su mažu bandymo dirvožemio mėginiu, kuris išdžiovinamas ore ir sterilizuojamas. Jei bandomoji medžiaga pridedama naudojant tirpiklį, tirpikliui leidžiama išgaruoti prieš tai kaip sodrintas mėginys yra įterpiamas į pradinį nesterilų dirvožemio ėminį.

Įprastoms cheminėms medžiagoms, kurios į dirvožemį iš esmės patenka su nuotekų dumblu arba dirbant žemės ūkio darbus, bandomoji medžiaga iš pradžių turi būti dedama į dumblą, kuris vėliau įterpiamas į dirvožemio ėminį (žr. 1.9.2 ir 1.9.3 skirsnius).

Nerekomenduojama sistemingai naudoti preparatus. Tačiau, pvz., jei bandomoji medžiaga mažai tirpi, preparatų naudojimas gali būti tinkamas pakaitinis būdas.

1.8.3. **Dirvožemiai**

1.8.3.1. *Dirvožemio atranka*

Transformavimo keliui nustatyti galima naudoti tipinį dirvožemį; rekomenduojama naudoti smėlingą priemolį, dulkišką priemolį, priemolį arba priesmėlį (pagal FAO ir USDA klasifikaciją (18)), kurio pH vertė 5,5– 8,0, organinės anglies kiekis 0,5– 2,5 % ir mikrobinė biomasė sudaro bent 1 % bendrosios organinės anglies (10).

Transformavimo greičiui tirti turi būti naudojami mažiausiai trys papildomi dirvožemiai, sudarantys atitinkamų dirvožemių intervalą. Dirvožemiai turi skirtis organinės anglies kiekiu, pH, molio ir mikrobinės biomasės kiekiu (10).

▼C1

Visi dirvožemiai apibūdinami, nurodant bent tekstūrą (% smėlio, % dumblo, % molio) (pagal FAO ir USDA klasifikaciją (18)), pH, katijonų mainų gebą, organinės anglies kiekį, tūrinį tankį, vandens sulaikymo charakteristikas ([1]) ir mikrobinę biomasę (tik aerobiniams tyrimams). Rezultatams aiškinti gali būti naudinga papildoma informacija apie dirvožemio savybes. Dirvožemio charakteristikoms nustatyti gali būti taikomi metodai, rekomenduojami nuorodose (19)(20)(21)(22)(23). Mikrobinė biomasė turi būti nustatoma taikant substrato sukeliamo kvėpavimo (SIR) metodą (25)(26) arba pakaitinius metodus (20).

1.8.3.2. *Dirvožemių ėminių ėmimas, tvarkymas ir laikymas*

Reikia turėti detalios informacijos apie lauko vietą, iš kurios imamas bandymo dirvožemis. Nurodoma tiksli padėtis, augalų danga, apdorojimas cheminėmis medžiagomis, apdorojimas organinėmis ir neorganinėmis trąšomis, biologinių priedų dėjimas arba kiti teršalai. Jei per paskutinius ketverius metus dirvožemiai buvo apdorojami bandomąja medžiaga arba jos struktūriniais analogais, tokie dirvožemiai neturi būti naudojami transformavimo tyrimams (10) (15).

Dirvožemis turi būti tik ką paimtas iš lauko (iš A horizonto arba viršutinio 20 cm sluoksnio), dirvožemiui turint tokį vandens kiekį, kuris lengvintų sijojimą. Reikia vengti imti dirvožemių, išskyrus ryžių laukų dirvožemių, ėminius esant ilgalaikiam (ilgesniam kaip 30 parų) sausros, šalčių arba patvinimo laikotarpiui arba iš karto jam pasibaigus (14). Ėminiai turi būti transportuojami tokiu būdu, kad kiek įmanoma mažiau pasikeistų vandens kiekis dirvožemyje, ėminiai turi būti laikomi tamsoje, esant kiek įmanoma didesniam gryno oro kiekiui. Paprastai šiam tikslui tinka nesandariai užrištas polietileninis maišas.

Dirvožemis, paėmus jo ėminius, turi būti apdorotas kiek įmanoma greičiau. Augmenija, didesnė dirvožemio fauna ir akmenys turi būti pašalinti prieš sijojant dirvožemį per 2 mm sietą, ant kurio lieka maži akmenys, fauna ir augalų likučiai. Prieš sijojant reikia vengti per didelio dirvožemio džiūvimo ir smulkinimo (15).

Kai žiemą imti ėminius lauke sunku (dirvožemis įšąla arba yra padengtas sniego sluoksniu), jį galima imti iš dirvožemio krūvos, laikomos šiltnamyje po augaline danga (pvz., žolės arba žolės ir dobilų mišinio danga). Labiau pageidautina tirti dirvožemius, tik ką paimtus iš lauko, tačiau jei surinktą ir apdorotą dirvožemį tenka laikyti prieš tyrimo pradžią, turi būti tinkamos laikymo sąlygos mikrobiniam aktyvumui užtikrinti ir laikyti galima tik ribotą laiką (ne ilgiau kaip tris mėnesius, esant 4 ± 2 °C) ([2]). Išsamūs nurodymai, kaip imti, tvarkyti ir laikyti biologinio transformavimo bandymams skirtus dirvožemių ėminius, pateikti (8) (10) (15) (26) (27).

([1]) Vandens sulaikymo charakteristikos gali būti matuojamos, kaip lauko drėgmės imlumas, kaip vandens sulaikymo geba arba kaip vandens siurbimo įtemptis (hidraulinis potencialas) (pF). Aiškinimai pateikti 1 priedėlyje. Bandymo ataskaitoje turi būti nurodyta, ar dirvožemių vandens sulaikymo charakteristikos ir tūriniai tankiai buvo matuojami nepaliestuose lauko ėminiuose, ar paliestuose (apdorotuose) ėminiuose.

([2]) Naujų tyrimų rezultatai rodo, kad vidutinio klimato zonų dirvožemiai irgi gali būti laikomi esant –20 C ilgiau kaip tris mėnesius (28)(29) ir perdaug neprarasti mikrobinio aktyvumo.

▼C1

Prieš apdorotą dirvožemį naudojant šiam bandymui, jam taikomas pradinis inkubavimas, kad galėtų sudygti ir būtų pašalintos sėklos ir būtų atkurta mikrobinės medžiagų apykaitos pusiausvyra, kai ėminių ėmimo arba laikymo sąlygas pakeičia inkubavimo sąlygos. Paprastai pakanka 2–28 parų trukmės pradinio inkubavimo laikotarpio, siekiant temperatūros ir drėgmės sąlygas priartinti prie tikrojo bandymo sąlygų (15). Laikymo ir pradinio inkubavimo trukmė kartu neturi būti ilgesnė kaip trys mėnesiai.

1.9. BANDYMO PROCEDŪRA

1.9.1. **Bandymo sąlygos**

1.9.1.1. *Bandymo temperatūra*

Visą bandymo laikotarpį dirvožemiai inkubuojami tamsoje esant pastoviai temperatūrai, kuri atitiktų klimatines naudojimo arba išmetimo sąlygas. Rekomenduojama 20 ± 2 °C temperatūra visoms bandomosioms medžiagoms, kurios gali pasiekti dirvožemį vidutinio klimato sąlygomis. Temperatūra turi būti kontroliuojama.

Jei cheminės medžiagos naudojamos arba išmetamos šaltesnio klimato sąlygomis (pvz., šiaurės šalyse, rudens ir žiemos laikotarpiu), papildomi dirvožemio ėminiai inkubuojami esant žemesnei temperatūrai (pvz., 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. *Drėgmės kiekis*

Atliekant transformavimo bandymus aerobinėmis sąlygomis, turi būti nustatomas ir palaikomas dirvožemio drėgmės kiekis ([1]), atitinkantis pF nuo 2,0 iki 2,5 (3). Dirvožemio drėgmės kiekis išreiškiamas vandens mase sauso dirvožemio masės vienetui, ir turi būti reguliariai tikrinamas (pvz., kas 2 savaites) pasveriant inkubavimo kolbas, o vandens nuostoliai kompensuojami įpilant vandens (pageidautina filtravimu sterilizuoto vandentiekio vandens). Reikia imtis atsargumo priemonių, kad pilant vandenį būtų išvengta bandomosios medžiagos ir (arba) transformavimo produktų nuostolių dėl garavimo ir (arba) fotodestrukcijos (jei vyksta) arba jie būtų kiek įmanoma sumažinti.

Atliekant transformavimo bandymus anaerobinėmis ir ryžių lauko sąlygomis, dirvožemis yra prisotinamas vandeniu užtvindant.

1.9.1.3. *Aerobinės inkubavimo sąlygos*

Pratekėjimo sistemose aerobinės sąlygos užtikrinamos tarpais pučiant arba ištisai per sistemą ventiliuojant sudrėkintą orą. Biometrinėse kolbose oro mainai užtikrinami difuzijos būdu.

1.9.1.4. *Sterilios aerobinės sąlygos*

Informacijai apie abiotinio bandomosios medžiagos transformavimo svarbą gauti, dirvožemio ėminiai gali būti sterilizuojami (sterilizavimo metodai pateikti 16 ir 29 nuorodose), apdorojami sterilia bandomąja medžiaga (pvz., tirpalas pilamas per sterilų filtrą) ir aeruojami sudrėkintu steriliu oru, kaip aprašyta 1.9.1.3 skirsnyje. Jei tiriamas ryžių laukų dirvožemis, dirvožemis ir vanduo sterilizuojami ir inkubavimas vykdomas kaip aprašyta 1.9.1.6 skirsnyje.

([1]) Dirvožemis neturi būti per drėgnas arba per sausas, kad būtų galima užtikrinti tinkamą dirvožemio mikrofloros aeravimą ir mitybą. Optimaliam mikrobų augimui rekomenduojamas drėgmės kiekis sudaro 40–60 % vandens sulaikymo gebos (WHC) ir 0,1– 0,33 bar (6). Pastarasis intervalas atitinka pF intervalą 2,0– 2,5. Tipinis įvairių tipų dirvožemių drėgmės kiekis pateiktas 2 priedėlyje.

▼C1

1.9.1.5. *Anaerobinės inkubavimo sąlygos*

Anaerobinėms sąlygoms sudaryti ir palaikyti, dirvožemis apdorojamas bandomąja medžiaga ir aerobinėmis sąlygomis 30 parų arba pusėjimo trukmės ar DT_{50} laikotarpį (atsižvelgiant į tai, kuris trumpesnis), inkubuotas dirvožemis užpilamas vandeniu (1–3 cm vandens sluoksniu), o per inkubavimo sistemą prapučiamos inertinės dujos (pvz., azotas arba argonas) ([1]) Bandymo sistema turi užtikrinti sąlygas matuoti pvz., pH vertę, deguonies koncentraciją ir oksidacijos-redukcijos potencialą, ir turėti lakiųjų produktų gaudykles. Sistema turi būti uždara, kad būtų išvengta oro patekimo difuzijos būdu.

1.9.1.6. *Ryžių laukų dirvožemio inkubavimo sąlygos*

Transformavimui ryžių laukų dirvožemiuose tirti dirvožemis užpilamas maždaug 1–5 cm vandens sluoksniu ir bandomoji medžiaga dedama į vandeninę fazę (9). Rekomenduojama naudoti mažiausiai 5 cm gylio dirvožemio sluoksnį. Sistema vėdinama oru, kaip aerobinėmis sąlygomis. Turi būti kontroliuojama ir pateikiama ataskaitoje vandeninio sluoksnio pH vertė, deguonies koncentracija ir oksidacijos-redukcijos potencialas. Prieš pradedant transformavimo tyrimus būtinas mažiausiai dviejų savaičių pradinio inkubavimo laikotarpis (žr. 1.8.3.2 skirsnį).

1.9.1.7. *Bandymo trukmė*

Transformavimo greičio ir kelio tyrimai paprastai neturėtų trukti ilgiau kaip 120 parų ([2]) (3) (6) (8), kadangi po šio termino tikėtinas dirvožemio mikrobinio aktyvumo mažėjimas dirbtinėje, nuo natūralaus papildymo atskirtoje laboratorinėje sistemoje. Jei būtina apibūdinti bandomosios medžiagos išnykimą ir pagrindinių transformavimo produktų susidarymą ir išnykimą, tyrimai gali būti tęsiami ilgesnį laiką (pvz., 6 arba 12 mėnesių) (8). Ilgesni inkubavimo laikotarpiai turi būti pagrįsti bandymo ataskaitoje, be to, papildyti biomasės matavimais šiais laikotarpiais ir jiems pasibaigus.

1.9.2. **Bandymo procedūra**

Maždaug 50–200 g dirvožemio (kaip sauso dirvožemio) dedama į kiekvieną inkubavimo kolbą (žr. 3 priedėlio 1 ir 2 paveikslus) ir dirvožemis apdorojamas bandomąja medžiaga vienu iš metodų, aprašytų 1.8.2 skirsnyje. Jei bandomajai medžiagai įterpti naudojami organiniai tirpikliai, jie turi būti išgarinti iš dirvožemio. Tuomet dirvožemis gerai sumaišomas mentele ir (arba) purtant kolbą. Jei tyrimas daromas ryžių lauko sąlygomis, dirvožemis ir vanduo turi būti gerai sumaišyti po bandomosios medžiagos įterpimo. Daroma mažų alikvotinių apdoroto dirvožemio dalių (pvz., 1 g) analizė bandomajai medžiagai nustatyti ir taip patikrinti pasiskirstymo tolygumą. Pakaitiniai metodai pateikti toliau.

([1]) Aerobinės sąlygos vyrauja paviršiniame dirvožemiuose ir net popaviršiniuose dirvožemiuose, kaip buvo parodyta ES organizuotame tyrimų projekte (K. Takagi *et al*. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internal Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270–277, 17–21 August 1992, Sigtuna, Sweden). Anaerobinės sąlygos gali pasitaikyti tik atsitiktinai, kai dirvožemiai užliejami po didelių liūčių arba kai sudaromos ryžių laukų sąlygos.

([2]) Aerobinius tyrimus galima būtų baigti daug anksčiau nei po 120 parų, jei tuo metu jau būtų žinomas galutinis virsmo kelias ir aiškiai pasiekta galutinė mineralizacija. Bandymas gali būti baigtas po 120 parų arba kai produktais virsta mažiausiai 90 % bandomosios medžiagos, tačiau turi susidaryti mažiausiai 5 % $C0_2$.

▼C1

Apdorojimo norma turi atitikti didžiausią augalų apsaugos produkto normą, rekomenduojamą naudojimo instrukcijose, ir atitinkamą tolygaus įterpimo lauke gylį (pvz., į viršutinį 10 cm dirvožemio sluoksnį ([1])). Pvz., jei cheminės medžiagos skirtos lapams arba dirvožemiui be įterpimo, atitinkamas gylis, pagal kurį apskaičiuojamas į kiekvieną kolbą dedamos cheminės medžiagos kiekis, lygus 2,5 cm. Jei cheminės medžiagos įterpiamos į dirvožemį, taikomas gylis yra naudojimo instrukcijose apibrėžtas įterpimo gylis. Jei tai bendrosios paskirties cheminės medžiagos, įterpimo norma turi būti įvertinta atsižvelgiant į patį tipiškiausią patekimo būdą; pvz., kai pagrindinis patekimo į dirvožemį būdas yra nuotekų dumblas, cheminė medžiaga turi būti dozuojama su dumblu, esant koncentracijai, kuri rodytų tikėtiną medžiagos koncentraciją dumble, o į dirvožemį dedamo dumblo kiekis turi atitikti įprastą dumblo įkrovą į žemės ūkio paskirties dirvožemius. Jei šios koncentracijos nepakanka pagrindiniams transformavimo produktams identifikuoti, gali būti naudingas atskirų dirvožemio ėminių, turinčių didesnes medžiagos normas, inkubavimas, tačiau reikėtų vengti per didelių normų, darančių įtaką dirvožemio mikrobinėms funkcijoms (žr. 1.5 ir 1.8.2 skirsnius).

Taikant kitą būdą, bandomąja medžiaga galima apdoroti didesnę dirvožemio įkrovą (t. y. 1–2 kg), kruopščiai sumaišyti, naudojant atitinkamą maišymo įtaisą, ir mažomis 50–200 g dalimis padalyti į inkubavimo kolbas (pvz., naudojant ėminio dalytuvus). Mažos apdoroto dirvožemio įkrovos alikvotinės dalys (pvz., 1 g) analizuojamos bandomosios medžiagos tolygiam pasiskirstymui patikrinti. Tokia metodika yra geresnė, kadangi bandomąją medžiagą galima tolygiau paskirstyti dirvožemyje.

Be to, tomis pačiomis sąlygomis (aerobinėmis), kaip ir bandomąja medžiaga apdoroti ėminiai, inkubuojami neapdoroto dirvožemio ėminiai. Šie ėminiai yra naudojami biomasei matuoti vykstant bandymui ir jam pasibaigus.

Kai į dirvožemį įterpiama organiniame (-iuose) tirpiklyje (-iuose) ištirpinta bandomoji medžiaga, dirvožemio ėminiai, apdoroti tokiu pačiu tirpiklio (-ų) kiekiu, inkubuojami tokiomis pačiomis sąlygomis (aerobinėmis), kaip ir bandomąja medžiaga apdoroti ėminiai. Šie ėminiai naudojami biomasei nustatyti tyrimo pradžioje, tyrimų metu ir juos užbaigus, kad būtų galima patikrinti tirpiklio (-ų) poveikį mikrobinei biomasei.

Kolbos su apdorotu dirvožemiu prijungiamos prie matavimo pratekėjimo sąlygomis sistemos, aprašytos 1 paveiksle, arba uždaromos, naudojant 2 paveiksle pavaizduotą sugėrimo kolonėlę (žr. 3 priedėlį).

([1]) Pradinė koncentracija pagal plotą apskaičiuojama taikant šią lygtį:

$$C_{dirvožemio}[mg/kg_{dirvožemio}] = \left(\frac{(A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg])}{(l[m] \cdot (10^4[m^2/ha]) \cdot (d[kg_{dirvožemio}/m^3]))}\right)$$

$C_{dirvože}$ = pradinė koncentracija dirvožemyje [mg kg-1]

A = įterpimo norma [kg ha-1]; l = lauko dirvožemio sluoksnio storis [m]; d = sauso dirvožemio tūrinis tankis [kg m^{-3}].

Paprastai, esant 1 kg ha^{-1} įterpimo normai, koncentracija 10 cm dirvožemio sluoksnyje maždaug lygi 1 mg kg^{-1} (darant prielaidą, kad tūrinis tankis yra lygus 1 g cm^{-3}).

▼C1

1.9.3. **Mėginių ėmimas ir matavimas**

Praėjus tam tikram laiko tarpui, paimamos dvi inkubavimo kolbos, dirvožemio mėginiai ekstrahuojami skirtingo poliškumo tirpikliais ir analizuojami bandomajai medžiagai ir (arba) transformavimo produktams nustatyti. Darant gerai suplanuotą tyrimą, naudojamas pakankamas kolbų skaičius, kad kiekvienam mėginio ėmimui būtų galima paaukoti dvi kolbas. Be to, visą kiekvieno dirvožemio inkubavimo laikotarpį ir jam pasibaigus įvairiais laiko intervalais imami sugėrimui naudotų tirpalų arba kietųjų medžiagų mėginiai (pirmąjį mėnesį 7 parų intervalai ir vėliau 17 parų intervalai) ir atliekama jų analizė lakiesiems produktams nustatyti. Be dirvožemio mėginio, imamo iš karto po medžiagos įterpimo (0 paros mėginio), būtina papildomai imti mėginį mažiausiai 5 kartus. Laiko intervalai turi būti pasirinkti taip, kad būtų galima gauti bandomosios medžiagos išnykimo ir transformavimo produktų susidarymo bei išnykimo kreives (pvz., 0, 1, 3, 7 paros; 2, 3 savaitės; 1, 2, 3 mėnesiai ir t. t.).

Kai naudojama ^{14}C žymėta bandomoji medžiaga, neekstrahuojamos medžiagos radioaktyvumas kiekybiškai nustatomas sudeginant, ir kiekvienam mėginio ėmimo intervalui apskaičiuojamas masių balansas.

Jei inkubuojama anaerobinėmis ir ryžių lauko sąlygomis, dirvožemis ir vandeninės fazės analizuojamos kartu bandomajai medžiagai ir transformavimo produktams nustatyti arba prieš ekstrahavimą ir analizę atskiriamos filtravimu ar centrifugavimu.

1.9.4. **Neprivalomi bandymai**

Norint įvertinti temperatūros ir dirvožemio drėgmės įtaką bandomosios medžiagos ir (arba) jos transformavimo produktų transformavimo dirvožemyje greičiams, gali būti naudingi aerobiniai tyrimai nesteriliomis sąlygomis, esant papildomoms temperatūros ir dirvožemio drėgmės vertėms.

Galima papildomai pamėginti apibūdinti neekstrahuojamų medžiagų radioaktyvumą, pvz., ekstrahavimui naudojant virškritinę takiąją terpę.

2. **DUOMENYS**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Bandomosios medžiagos, transformavimo produktų, lakiųjų medžiagų (tik %) ir neekstrahuojamų medžiagų kiekiai pateikiami kaip pradinės koncentracijos procentinė dalis ir, jei tinka, mg kg^{-1} dirvožemio (sausojo dirvožemio masei) kiekvienam mėginio ėmimo intervalui. Masių balansas kiekvienam mėginio ėmimo intervalui turi būti pateiktas kaip naudotos pradinės koncentracijos procentinė dalis. Grafiškai pavaizdavus bandomosios medžiagos koncentracijos verčių ir laiko santykį, bus galima įvertinti jos transformavimo pusėjimo trukmę arba DT_{50}. Turi būti identifikuoti pagrindiniai transformavimo produktai ir brėžiamas jų koncentracijos verčių kitimo laike grafikas susidarymo ir išnykimo greičiams parodyti. Pagrindiniu transformavimo produktu laikomas kiekvienas produktas, kuris bet kuriuo tyrimo metu sudaro $\geq$ 10 % naudotos dozės.

Absorbuoti lakieji produktai tam tikru laipsniu rodo dirvožemyje esančios bandomosios medžiagos ir jos transformavimo produktų lakumą.

▼C1

Tiksliau pusėjimo trukmės arba DT_{50} vertės ir, jei tinka, DT_{75} ir DT_{90} vertės nustatomos taikant atitinkamus kinetinių modelių apskaičiavimus. Pusėjimo trukmės ir DT_{50} vertės pateikiamos ataskaitoje kartu su taikyto modelio aprašymu, kinetikos laipsniu ir nustatymo koeficientu (r^2). Geriau taikyti pirmojo laipsnio kinetiką, išskyrus kai $r^2 < 0,7$. Be to, jei reikia, atliekami pagrindinių transformavimo produktų apskaičiavimai. Atitinkami modelių pavyzdžiai aprašyti 31–35 nuorodose.

Darant transformavimo greičio tyrimus, esant įvairioms temperatūros vertėms, transformavimo greičiai turi būti aprašyti kaip temperatūros funkcija bandymo temperatūros verčių intervale, taikant tokią Arenijaus lygtį:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ arba } lnk = 1nA - \left(\frac{(B)}{(T)}\right)$$

kurioje ln A ir B yra regresijos tiesės, gautos naudojant tiesinę lnk kaip l/T funkcijos regresiją, atkarpa ir krypties koeficientas, k yra greičio konstanta, esant temperatūrai T, ir T yra temperatūra Kelvino laipsniais. Reikia atkreipti dėmesį į ribotą temperatūros intervalą, kuriame Arenijaus lygtis galioja, kai transformavimą valdo mikrobų veikimas.

2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Nors tyrimas atliekamas dirbtinėje laboratorinėje sistemoje, rezultatai leis įvertinti bandomosios medžiagos transformavimo greitį ir transformavimo produktų susidarymo bei išnykimo greitį lauko sąlygomis (36)(37).

Bandomosios medžiagos transformavimo kelio tyrimas suteikia informacijos apie tai, kaip dirvožemyje pasikeičia įterptosios medžiagos struktūra, vykstant cheminėms ir mikrobinėms reakcijoms.

3. **ATASKAITA**

BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

— bendrinis pavadinimas, cheminis pavadinimas, CAS numeris, struktūrinė formulė (rodanti žymėtojo (-ųjų) atomo (-ų) padėtį, jei naudojama žymėtoji medžiaga) ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės (žr. 1.5 skirsnį),

— bandomosios medžiagos grynumas (priemaišos),

— radiocheminis žymėtosios cheminės medžiagos grynumas ir savitasis aktyvumas (jei tinka).

Etaloninės medžiagos:

— etaloninių medžiagų, naudojamų transformavimo produktui apibūdinti ir (arba) identifikuoti, cheminis pavadinimas ir struktūra.

Bandomieji dirvožemiai:

— ėmimo vietos detalės,

— dirvožemių ėmimo data ir metodika,

▼C1

— dirvožemių savybės, pvz., pH vertė, organinės anglies kiekis, tekstūra (% smėlio, % dulkių, % molio), katijonų mainų geba, tūrinis tankis, vandens sulaikymo charakteristika ir mikrobinė biomasė,

— dirvožemio laikymo trukmė ir sąlygos (jei laikomas).

Bandymo sąlygos:

— tyrimų datos,

— įterptos bandomosios medžiagos kiekis,

— naudoti tirpikliai ir bandomosios medžiagos įterpimo būdas,

— iš pradžių apdoroto dirvožemio ir kiekvienai analizei imamo dirvožemio masė,

— naudotos inkubavimo sistemos aprašymas,

— oro srauto vertės (tik pratekėjimo sistemoms),

— temperatūra bandymo pradžioje,

— dirvožemio drėgmės kiekis inkubavimo metu,

— mikrobinė masė aerobinių tyrimų pradžioje, jų eigoje ir pabaigoje,

— pH vertė, deguonies koncentracija ir oksidacijos-redukcijos potencialas anaerobinių ir ryžių laukų tyrimų pradžioje, jų eigoje ir pabaigoje,

— ekstrahavimo metodas (-ai),

— bandomosios medžiagos, pagrindinių jos transformavimo dirvožemyje produktų bei sugertų medžiagų kiekybinio nustatymo ir identifikavimo metodai,

— kartotinių ir kontrolinių ėminių skaičius.

Rezultatai:

— mikrobinio aktyvumo nustatymo rezultatai,

— taikytų analizės metodų pakartojamumas ir jautrumas,

— regeneravimo laipsnio vertės (tinkamu patvirtinto tyrimo % vertės yra pateiktos 1.7.1 skirsnyje),

— rezultatų, išreiškiamų kaip įterptos pradinės dozės procentinė dalis ir, jei tinka, kaip mg kg^{-1} dirvožemio (sauso dirvožemio), lentelės,

— masių balansas tyrimų eigoje ir juos užbaigus,

— dirvožemio neekstrahuojamo (surištojo) radioaktyvumo arba likučių apibūdinimas,

— išsiskyrusio CO_2 ir kitų lakiųjų medžiagų kiekybinis apskaičiavimas,

— bandomosios medžiagos ir, jei tinka, pagrindinių transformavimo produktų koncentracijos dirvožemyje kaip laiko funkcijos kreivės,

— bandomosios medžiagos ir, jei tinka, pagrindinių transformavimo produktų pusėjimo arba DT_{50}, DT_{75} ir DT_{90} vertės, įskaitant pasikliovimo ribas,

▼C1

— abiotinio skilimo steriliomis sąlygomis greičio įvertis,

— bandomosios medžiagos ir, jei tinka, pagrindinių transformavimo produktų transformavimo kinetikos įvertinimas,

— pasiūlyti transformavimo keliai, jei tinka,

— rezultatų aptarimas ir aiškinimas,

— neapdoroti duomenys (t. y. ėminių chromatogramos, transformavimo greičio apskaičiavimų pavyzdžiai ir transformavimo produktams identifikuoti naudotos priemonės).

4. **NUORODOS**

1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

3) European Union (ES) (1995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II, Part A and Annex III, Part A: Fate and Behaviour in the Environment.

4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

5) BBA (1986). Richtlinie fur die amtliche Prufung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4–1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

6) ISO/DIS 11266–1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil – Part 1: Aerobic conditions.

7) ISO 14239 (1997). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

8) SET AC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

9) MAFF – Japan 2000 – Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil -Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.

11) Guth, J. A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123–157.

12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).

13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945–956 (IUPAC 1984)

14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981)

▼C1

15) ISO 10381–6 (1993). Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

16) Annex V to Dir. 67/548/EEC

17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85–114.

18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215–221.

25) ISO 14240–1 and 2 (1997). Soil Quality – Determination of soil microbial biomass -Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45–60.

27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105–120.

28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59–63 (SETAC-Europe).

29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjodahl-Svensson K., Stenstrom J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68–69 (SETAC-Europe).

30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197–200.

31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141–146.

▼C1

32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181–199.

33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In „Environmental Dynamics of Pesticides“. R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135–172.

34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz -Nachrichten Bayer 39, 188–204.

35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 33, 47–60.

36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032–1041.

37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83–122.

▼C1

1 priedėlis

VANDENS ĮTEMPTIS (HIDRAULINIS POTENCIALAS), LAUKO DRĖGMĖS IMLUMAS (FC) IR VANDENS SULAIKYMO GEBA (WHC) [1]

Vandens stulpelio aukštis (cm)	pF [a]	bar [b]	Pastabos
10^7	7	10^4	Sausas dirvožemis
$1,6 \times 10^4$	4,2	16	Augalų vytimo taškas
10^4	4	10	
10^3	3	1	
6×10^2	2,8	0,6	
$3,3 \times 10^2$	2,5	0,33 [c]	Lauko drėgmės imlumo intervalas [d]
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (apytikrė vertė)
1	0	0,001	Vandeniu prisotintas dirvožemis

[a] pF = vandens stulpelio aukščio, išreikšto cm, logaritmas.
[b] 1 bar = 10^5 Pa.
[c] Atitinka apytikrį vandens kiekį 10 % smėlyje, 35 % priemolyje ir 45 % molyje.
[d] Lauko drėgmės imlumas nėra pastovus dydis, bet atsižvelgiant į dirvožemio tipą kinta nuo F 1,5 iki 2,5.

Vandens įtemptis matuojama vandens stulpelio aukščio cm arba bar. Dėl didelio siurbimo įtempties intervalo ji išreiškiama tiesiog kaip pF vertė, kuri atitinka vandens stulpelio aukščio, išreikšto cm, logaritmą.

Lauko drėgmės imlumas apibrėžiamas kaip vandens kiekis, kurį veikiant sunkio jėgai gali sulaikyti natūralus dirvožemis 2 paras po ilgesnio lietaus laikotarpio arba po pakankamo drėkinimo. Jis nustatomas nepaliestam dirvožemiui *in situ* lauke. Taigi matavimas netaikomas paliesto dirvožemio laboratoriniams ėminiams. FC vertės, nustatytos paliestam dirvožemiui, gali turėti didelių sistemingų nuokrypių.

Vandens sulaikymo geba (WHC) nustatoma laboratorijoje nepaliestam ir paliestam dirvožemiui, dirvožemį kolonėlėje sotinant kapiliarais kylančiu vandeniu. Ji yra ypač naudinga apibrėžiant paliestą dirvožemį ir gali būti iki 30 % didesnė už lauko drėgmės imlumą (1). Be to, ją bandymo keliu lengviau nustatyti nei patikimas FC vertes.

Pastabos

[1] Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼C1

2 priedėlis

DRĖGMĖS KIEKIS (g vandens 100 g sauso dirvožemio) ĮVAIRIŲ ŠALIŲ ĮVAIRAUS TIPO DIRVOŽEMYJE

Dirvožemio tipas	Šalis	Drėgmės kiekis, kai		
		WHC ([1])	pF = 1,8	pF = 2,5
Smėlis	Vokietija	28,7	8,8	3,9
Rišlus smėlis	Vokietija	50,4	17,9	12,1
Rišlus smėlis	Šveicarija	44,0	35,3	9,2
Dulkiškas priemolis	Šveicarija	72,8	56,6	28,4
Sunkus priemolis	Brazilija	69,7	38,4	27,3
Sunkus priemolis	Japonija	74,4	57,8	31,4
Priesmėlis	Japonija	82,4	59,2	36,0
Dulkiškas priemolis	JAV	47,2	33,2	18,8
Priesmėlis	JAV	40,4	25,2	13,3

([1]) Vandens sulaikymo geba (WHC – Water Holding Capacity).

▼C1

3 priedėlis

1 paveikslas

Pratekėjimo aparato cheminių medžiagų virsmui dirvožemyje tirti pavyzdys ([1]), ([2])

1: adatinis vožtuvas

2: barboteris su vandeniu

3: ultrafiltravimo membrana (tik taikant sterilias sąlygas), akučių dydis 0,2 μm

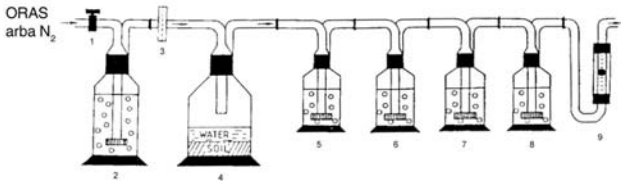
4: medžiagų apykaitos dirvožemyje kolba (vandens įpilama tik anaerobinių ir ryžių laukų dirvožemio sąlygomis)

5: lakiųjų organinių junginių gaudyklė, užpildyta etilenglikoliu

6: lakiųjų šarminių junginių gaudyklė, užpildyta sieros rūgštimi

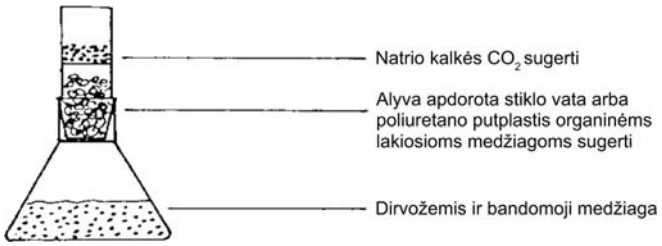
7, 8: CO_2 ir kitų rūgštinių medžiagų gaudyklė, užpildyta natrio šarmu

9: srautmatis.



2 paveikslas

Biometrinio tipo kolbos cheminių medžiagų virsmui dirvožemyje tirti pavyzdys ([3])



([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123–157.

([2]) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85–114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141–146.

▼C1

C.24. AEROBINIS IR ANAEROBINIS TRANSFORMAVIMAS VANDENS TELKINIŲ DUGNO NUOSĖDŲ SISTEMOSE

1. METODAS

Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 308 (2002).

1.1. ĮVADAS

Cheminės medžiagos gali patekti į negilius arba gilius paviršinius vandenis pvz., šiais būdais: tiesioginio pridėjimo, purškiamų medžiagų sklaidos, nuotėkio, drenažo, atliekų šalinimo, pramoninių, buitinių arba žemės ūkio nuotekų ir nusėdimo iš atmosferos. Šiame bandymo metode aprašytas laboratorinis metodas skirtas įvertinti organinių cheminių medžiagų aerobinį ir anaerobinį transformavimą vandens telkinių dugno nuosėdų sistemose. Jis yra pagrįstas turimomis rekomendacijomis (1) (2) (3) (4) (5) (6). Belgirate, Italijoje, 1995 m. vykusiame OECD seminare dėl dirvožemių ir nuosėdinių uolienų atrankos (7) buvo konkrečiai sutarta dėl šiame bandyme naudojamų dirvožemių skaičiaus ir tipo. Be to, seminare buvo pateiktos dirvožemio ėminių ėmimo, tvarkymo ir laikymo rekomendacijos, pagrįstos ISO rekomendaciniu dokumentu (8). Tokie tyrimai skirti cheminėms medžiagoms, kurios tiesiogiai dedamos į vandenį arba kurios gali pasiekti vandeninę aplinką pirmiau aprašytais būdais.

Gamtinių vandens telkinių dugno nuosėdų sistemų sąlygos dažnai yra aerobinės viršutinėje vandeninėje fazėje. Nuosėdų paviršiniame sluoksnyje sąlygos gali būti aerobinės arba anaerobinės, o giliau esančiose nuosėdose jos paprastai yra anaerobinės. Siekiant aprėpti visas šias galimybes, šiame dokumente aprašyti aerobiniai ir anaerobiniai bandymai. Atliekant aerobinį bandymą, modeliuojamas aerobinio vandens stulpas virš aerobinių nuosėdų, po kuriomis yra sluoksnis su anaerobinių sąlygų gradientu. Atliekant anaerobinį bandymą modeliuojama visiškai anaerobinė vandens ir nuosėdų sistema. Jei aplinkybės rodo, kad būtina labai nukrypti nuo šių rekomendacijų, pvz., naudojant nepaliestų nuosėdų kernus arba nuosėdas, kurios galėjo būti veikiamos bandomąja medžiaga, šiam tikslui yra kiti skirti metodai (9).

1.2. APIBRĖŽTYS

Visai atvejais turi būti naudojami tarptautinės vienetų sistemos (SI) vienetai.

Bandomoji medžiaga – bet kuri medžiaga (tai gali būti pradinis junginys ar medžiagos transformavimo produktai)

Transformavimo produktai – visos medžiagos, susidarančios vykstant bandomosios medžiagos biotinio arba abiotinio transformavimo reakcijoms, įskaitant CO_2 ir surištuosiuos likučius.

Surištieji likučiai – dirvožemyje, augale arba gyvūne esantys junginiai, kurie po ekstrahavimo lieka matricoje pradinės medžiagos arba jos metabolito (-ų) pavidalu. Ekstrahavimo metodas iš esmės turi nekeisti pačių junginių arba matricos struktūros. Ryšio prigimtį galima iš dalies išaiškinti, taikant matricą keičiančius ekstrahavimo metodus ir sudėtingus analizės metodus. Pvz., tokiu būdu šiandien yra identifikuotos kovalentinės, joninės ir sorbcinio tipo jungtys, be to, pagautieji junginiai. Apskritai, surištųjų likučių susidarymas labai mažina biologinį įsisavinamumą ir biologinį kaupimąsi (10) (modifikuota IUPAC 1984 (11) apibrėžtis).

▼C1

Aerobinis transformavimas (oksidavimas) – reakcijos, vykstančios esant molekuliniam deguoniui (12).

Anaerobinis transformavimas (dezoksidavimas) – reakcijos, vykstančios nesant molekulinio deguonies (12).

Gamtiniai vandenys – paviršiniai vandenys, paimti iš tvenkinių, upių, upelių ir t. t.

Nuosėdos: – mineralinių ir organinių komponentų mišinys, kurio organinius komponentus sudaro didelės molekulinės masės junginiai, turintys didelį anglies ir azoto kiekį. Jas nusodina gamtinis vanduo, su kuriuo nuosėdos sudaro sąlyčio paviršių.

Mineralizacija: – visiškas organinio junginio skilimas į CO_2 ir H_2O aerobinėmis sąlygomis, ir į CH_4, CO_2 ir H_2O anaerobinėmis sąlygomis. Šiame bandymo metode, kai naudojamas žymėtasis junginys, mineralizacija yra didelio laipsnio molekulės skilimas, kai žymėtasis anglies atomas kiekybiškai oksiduojamas arba redukuojamas, susidarant atitinkamam $^{14}CO_2$ arba $^{14}CH_4$ kiekiui.

Pusėjimo trukmė – $t_{0,5}$, laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 50 %, kai transformavimui aprašyti tinka pirmojo laipsnio kinetika; ji nepriklauso nuo pradinės koncentracijos.

DT_{50} (išnykimo trukmė 50) – laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 50 %.

DT_{75} (išnykimo trukmė 75) – laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 75 %.

DT_{90} (išnykimo trukmė 90) – laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 90 %.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Etaloninės medžiagos naudojamos, jei transformavimo produktams identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti taikomi spektroskopiniai ir chromatografijos metodai.

1.4. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

Transformavimo greičiui matuoti gali būti naudojama nežymėtoji arba žymėtųjų atomų turinti bandomoji medžiaga, bet geriau naudoti žymėtąją medžiagą. Žymėtoji medžiaga reikalinga transformavimo keliui tirti ir masių balansui nustatyti. Rekomenduojama žymėti ^{14}C, bet gali būti naudingi kiti izotopai, pvz., ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Kiek tai įmanoma, žymėtasis atomas turi būti patvariausioje (-iose) molekulės dalyje (-yse) ([1]). Bandomosios medžiagos cheminis ir (arba) radiocheminis grynumas turi būti mažiausiai 95 %.

Prieš pradedant bandymą, turi būti gauta ši informacija apie bandomąją medžiagą:

a) tirpumas vandenyje (A.6 metodas);

b) tirpumas organiniuose tirpikliuose;

c) garų slėgis (A.4 metodas) ir Henrio dėsnio konstanta;

([1]) Pvz., jei bandomoji medžiaga turi vieną žiedą, žymėtasis atomas turi būti šiame žiede; jei bandomoji medžiaga turi du žiedus arba daugiau, gali tekti daryti atskirus tyrimus kiekvieno žiedo su žymėtuoju atomu likimui įvertinti ir atitinkamai informacijai apie virsmo produktų susidarymą gauti.

▼C1

d) pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolis/vanduo) (A.8 metodas);

e) adsorbcijos koeficientas (K_d, K_f, K_{oc}, jei tinka) (C. 18 metodas);

f) hidrolizė (C.7 metodas);

g) disociacijos konstanta (pK_a), (OECD TG 112) (13);

h) bandomosios medžiagos cheminė struktūra ir žymėtųjų izotopų padėtis, jei taikomi.

Pastaba. Ataskaitoje turi būti nurodyta matavimų temperatūra.

Kitą naudingą informaciją gali sudaryti duomenys apie bandomosios medžiagos toksinį poveikį mikroorganizmams, duomenys apie lengvą ir (arba) būdingąjį biologinį skaidumą, duomenys apie aerobinį arba anaerobinį transformavimą dirvožemyje.

Reikia turėti analizės metodus (įskaitant ekstrahavimo ir gryninimo metodus) bandomajai medžiagai ir jos transformavimo vandenyje bei nuosėdose produktams identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti (žr. 1.7.2 skirsnį).

1.5. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Pagal šiame bandyme aprašytą metodą naudojamos aerobinė ir anaerobinė vandeninių nuosėdų (žr. 1 priedėlį) sistema, kurioje galima:

i) matuoti bandomosios medžiagos transformavimo vandens ir nuosėdų sistemoje greitį;

ii) matuoti bandomosios medžiagos transformavimo nuosėdose greitį;

iii) matuoti bandomosios medžiagos ir (arba) transformavimo produktų mineralizacijos greitį (kai naudojama ^{14}C žymėtoji bandomoji medžiaga);

iv) identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti transformavimo vandeninėje ir nuosėdų fazėse produktus, įskaitant masių balansą (kai naudojama žymėtoji bandomoji medžiaga);

v) matuoti bandomosios medžiagos ir jos transformavimo produktų pasiskirstymą tarp dviejų fazių inkubavimo tamsoje laikotarpiu (siekiant išvengti, pvz., dumblių žydėjimo), esant pastoviai temperatūrai. Nustatomos pusėjimo trukmės, DT_{50}, DT_{75} ir DT_{90} vertės, kai tai leidžia daryti turimi duomenys, bet jų nereikėtų ekstrapoliuoti gerokai ilgesnei nei bandymo laikotarpis trukmei (žr. 1.2 skirsnį).

Aerobiniams ir anaerobiniams tyrimams reikia turėtų mažiausiai dviejų tipų nuosėdas ir jas atitinkančias vandenines fazes (7). Tačiau gali pasitaikyti atvejų, kai reikia naudoti daugiau kaip dviejų tipų vandenines nuosėdas, pvz., norint tirti cheminę medžiagą, kuri gali būti gėlame ir (arba) jūros vandenyje.

▼C1

1.6. BANDYMO TINKAMUMAS

Metodas iš esmės tinka visoms cheminėms medžiagoms (nežymėtosioms arba žymėtosioms), kurioms nustatyti yra sukurtas pakankamo tikslumo ir jautrio analizės metodas. Jis tinka mažai lakiems, nelakiems, vandenyje tirpiems arba netirpiems junginiams. Bandymas neturi būti taikomas cheminėms medžiagoms, kurios labai greit išgaruoja iš vandens (pvz., fumigantai, organiniai tirpikliai), todėl negali būti laikomos vandenyje ir (arba) nuosėdose šio bandymo sąlygomis.

Iki šiol metodas buvo taikomas cheminių medžiagų transformavimui gėlame vandenyje ir nuosėdose tirti, bet iš esmės jį dar galima taikyti upių žiočių ar jūros sistemoms. Jis netinka tekančio vandens (pvz., upių) arba atvirosios jūros sąlygoms modeliuoti.

1.7. KOKYBĖS KRITERIJAI

1.7.1. **Regeneravimas**

Mažiausiai dviejų kartotinių vandens ir nuosėdų ėminių ekstrahavimas ir analizė iškart po bandomosios medžiagos pridėjimo yra pirmasis analizės metodo pakartojamumo ir bandomosios medžiagos įterpimo metodikos tolygumo rodiklis. Vėlesnių bandymo stadijų regeneravimo laipsnis gaunamas matuojant atitinkamų masės verčių balansą (kai naudojama žymėtoji medžiaga). Žymėtųjų cheminių medžiagų regeneravimo laipsnis turi būti nuo 90 % iki 110 % (6), nežymėtųjų cheminių medžiagų – nuo 70 % iki 110 %.

1.7.2. **Analizės metodo pakartojamumas ir jautris**

Bandomosios medžiagos ir transformavimo produktų kiekybinės analizės metodo pakartojamumas (išskyrus pradinį ekstrahavimo efektyvumą) gali būti patikrintas atliekant kartotinę to paties vandens arba nuosėdų ėminių, inkubuotų pakankamai ilgai, kad galėtų susidaryti transformavimo produktai, ekstrakto analizę.

Bandomosios medžiagos ir transformavimo produktų analizės metodo aptikimo riba (LOD) turi būti mažiausiai 0,01 mg × kg^{-1} vandens arba nuosėdų (kaip bandomosios medžiagos) arba 1 % į bandymo sistemą dedamos pradinės dozės, imant mažesniąją vertę. Turi būti apibrėžta kiekybinio nustatymo riba (LOQ).

1.7.3. **Transformavimo duomenų tikslumas**

Atliekant bandomosios medžiagos koncentracijos verčių kaip laiko funkcijos regresinę analizę gaunama atitinkama informacija apie transformavimo kreivės tikslumą ir leidžia apskaičiuoti pusėjimo trukmės verčių pasikliovimo ribas (jei reakcija atitinka pseudopirmojo laipsnio kinetiką) arba DT_{50} vertes ir, jei tinka, DT_{75} ir DT_{90} vertes.

1.8. METODO APRAŠYMAS

1.8.1. **Bandymo sistema ir aparatūra**

Tyrimas turi būti daromas naudojant stiklinius indus (pvz., butelius, centrifugavimo mėgintuvėlius), išskyrus kai išankstinė informacija (pvz., pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolis/vanduo), sorbcijos duomenys ir t. t.) rodo, kad bandomoji medžiaga gali sukibti su stiklu; šiam atvejui reikėtų numatyti pakaitinę medžiagą (pvz., tefloną). Jei žinoma, kad bandomoji medžiaga gali sukibti su stiklu, šią problemą būtų galima iš dalies sumažinti, taikant vieną iš šių metodų:

▼C1

— nustatyti stiklu sorbuotos bandomosios medžiagos ir transformavimo produktų masę,

— užtikrinti, kad baigus bandymą visi stikliniai indai būtų plaunami tirpikliu,

— naudoti produktų preparatus (žr. dar 1.9.2 skirsnį),

— naudoti padidintą antrojo tirpiklio kiekį bandomajai medžiagai į sistemą įvesti; jei naudojamas antrasis tirpiklis, jame neturi tirpti bandomoji medžiaga.

Tipinės bandymo aparatūros pavyzdžiai, t. y. dujų pratekėjimo ir biometrinio tipo sistemos, pavaizduoti atitinkamai 2 ir 3 priedėliuose (14). Kitos tinkamos inkubavimo sistemos aprašytos 15 nuorodoje. Bandymo aparatūros konstrukcija turi užtikrinti oro ir azoto mainų ir lakiųjų produktų sugavimo sąlygas. Aparatūros matmenys turi atitikti bandymo reikalavimus (žr. 1.9.1 skirsnį). Ventiliaciją galima užtikrinti nestipriai barbotuojant orą arba azotą arba juos leidžiant virš vandens paviršiaus. Pataruoju atveju galima patarti nestipriai maišyti viršutinį vandens sluoksnį, kad deguonis ir azotas geriau pasklistų vandenyje. Neturi būti naudojamas CO_2 neturintis oras, kadangi dėl to gali padidėti vandens pH vertė. Bet kuriuo atveju drumsti nuosėdas nepageidautina ir to turi būti kiek įmanoma vengiama. Mažai lakios cheminės medžiagos turi būti bandomos biometrinio tipo sistemoje, nestipriai maišant vandens paviršinį sluoksnį. Be to, galima naudoti uždarus indus su atmosferiniu oru arba azotu užpildyta laisvąja erdve ir buteliukus viduje lakiesiems produktams sugauti (16). Atliekant aerobinį bandymą reikia reguliariai keisti laisvojoje erdvėje esančias dujas biomasės suvartotam deguoniui kompensuoti.

Tinkamos priemonės lakiems transformavimo produktams sugerti, kurių gali būti ir daugiau, yra 1 mol dm^{-3} kalio arba natrio hidroksido tirpalas anglies dioksidui sugerti ([1]) ir etilenglikolis, etanolaminas arba 2 % parafino tirpalas ksilene organiniams junginiams sugerti. Anaerobinėmis sąlygomis susidariusius lakiuosius produktus, pvz., metaną, galima rinkti, pvz., molekuliniais sietais. Tokie lakieji produktai gali būti sudeginti, pvz., iki CO_2, leidžiant dujas CuO užpildytu kvarciniu vamzdeliu, kaitinamu iki 900 °C temperatūros, o susidariusį CO_2 sugerti absorberyje šarmo tirpalu (17).

Reikia turėti laboratorinius bandomosios medžiagos ir transformavimo produktų analizės prietaisus (pvz., dujų ir skysčių chromatografijos (GLC), efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC), plonasluoksnės chromatografijos (TLC), masių spektroskopijos (MS), dujų chromatografijos-masių spektroskopijos (GC-MS), skysčių chromatografijos-masių spektroskopijos (LC-MS), magnetinio branduolių rezonanso (MBR) ir t. t. įrangą), atitinkamas aptikimo sistemas žymėtosioms arba nežymėtosioms medžiagoms analizuoti. Be to, reikia turėti skysčių scintiliacinį skaitiklį ir oksidacinio sudeginimo aparatūrą (nuosėdų ėminiams sudeginti prieš radioaktyvumo analizę) žymėtosioms medžiagoms analizuoti.

Būtina turėti kita tipinę laboratorinę įrangą fizikocheminei ir biologinei analizei atlikti (žr. 1.8.2.2 skirsnio lentelę), stiklinius indus, atitinkamas chemines medžiagas ir reagentus.

([1]) Kadangi šie šarminiai sugėrimo tirpalai sugeria anglies dioksidą, esantį ventiliuojamame ore ir susidariusį dėl kvėpavimo darant aerobinius bandymus, jie reguliariai turi būti keičiami, kad būtą išvengta soties, taigi absorbcijos gebos praradimo.

▼C1

1.8.2. **Vandens telkinių dugno nuosėdų atranka ir skaičius**

Kiekvienu atveju ėminių ėmimo vietos pasirenkamos atsižvelgiant į bandymo tikslą. Pasirenkant ėminių ėmimo vietas, turi būti atsižvelgta į galimo žemės ūkio, pramonės arba buitinių nuotekų patekimo į vandens baseiną ir į prieš srovę esančius vandens šaltinius istoriją. Nuosėdos neturi būti naudojamos, jei per ankstesnius 4 metus jos buvo teršiamos bandomąja medžiaga arba jos struktūriniais analogais.

1.8.2.1. *Nuosėdų atranka*

Aerobiniams tyrimams paprastai naudojamos dviejų rūšių nuosėdos (7). Pasirinktos dviejų rūšių nuosėdos turi skirtis organinės anglies kiekiu ir tekstūra. Vienos rūšies nuosėdos turi turėti didelį organinės anglies kiekį (2,5– 7,5 %) ir būti smulkios tekstūros, kitos rūšies nuosėdos turi turėti mažą organinės anglies kiekį (0,5– 2,5 %) ir būti stambios tekstūros. Organinės anglies kiekio skirtumas paprastai turi būti ne mažesnis kaip 2 %. „Smulki tekstūra“ apibrėžiama kaip turinti (molio + dumblo) ([1]) kiekį > 50 %, o „stambi tekstūra“ apibrėžiama kaip turinti (molio + dumblo) kiekį < 50 %. Dviejų rūšių nuosėdų (molio + dumblo) kiekio skirtumas paprastai turi būti ne mažesnis kaip 20 %. Tais atvejais, kai cheminė medžiaga gali pasiekti jūros vandenį, mažiausiai viena iš vandens ir dumblo sistemų turi būti jūrinės kilmės.

Norint atlikti griežtai anaerobinį tyrimą, dviejų rūšių nuosėdos (įskaitant virš jų esantį vandenį) turi būti imamos iš anaerobinių paviršinio vandens tūrio zonų (7). Nuosėdos ir virš jų esančios vandeninės fazės turi būti tvarkomos ir vežamos atsargiai, apsaugant nuo deguonies patekimo.

Pasirenkant nuosėdas gali būti svarbūs kiti parametrai, į kuriuos turi būti atsižvelgta kiekvienu konkrečiu atveju. Pvz., nuosėdų pH verčių intervalas turėtų būti svarbus bandant chemines medžiagas, kurių transformavimas ir (arba) sorbcija gali priklausyti nuo pH vertės. Sorbcijos priklausomybę nuo pH vertės gali rodyti bandomosios medžiagos pK_a vertė.

1.8.2.2. *Vandens ir nuosėdų ėminių apibūdinimas*

Pagrindiniai vandens ir nuosėdų parametrai, kurie turi būti išmatuoti ir pateikti ataskaitoje (su taikyto metodo nuoroda), ir bandymo stadija, kurioje tie parametrai turi būti nustatyti, yra apibendrinti toliau pateiktoje lentelėje. Informacija apie tų parametrų nustatymo metodus pateikta nuorodose (18)(19)(20)(21).

Be to, kiekvienu konkrečiu atveju gali tekti matuoti ir pateikti ataskaitoje kitus parametrus (pvz., gėlo vandens: daleles, šarmingumą, kietumą, laidį, NO_3/PO_4 (santykį ir atskiras vertes); nuosėdų: katijonų mainų gebą, vandens sulaikymo gebą, karbonatų kiekį, bendrą azoto ir fosforo kiekį; jūros sistemoms: druskingumą). Be to, gali būti naudinga nuosėdų ir vandens analizė nitratams, sulfatams, biologiškai kaupiamos geležies ir kitiems galimiems elektronų akceptoriams nustatyti įvertinant oksidacijos-redukcijos sąlygas, ypač anaerobinio transformavimo atveju.

([1]) (Molis + dumblas) yra mineralinė dalis nuosėdų, kurių dalelių dydis < 50 μm.

▼C1

Vandenį ir nuosėdas apibūdinančių parametrų matavimas (7)(22)(23)

Parametras	Bandymo stadija					
	Ėminio ėmimas-lauke	Vėlesnis tvarkymas	Aklimatizacijos pradžia	Bandymo pradžia	Bandymo eiga	Bandymo pabaiga
Vanduo						
Kilmė/Šaltinis	x					
Temperatūra	x					
pH	x		x	x	x	x
Bendroji organinė anglis (TOC)			x	x		x
O_2 koncentracija (*)	x		x	x	x	x
Oksidacijos redukcijos potencialas (*)			x	x	x	x
Nuosėdos						
Kilmė/Šaltinis	x					
Sluoksnio gylis	x					
pH		x	x	x	x	x
Dalelių dydžio skirstinys		x				
TOC		x	x	x		x
Mikrobinė biomasė (**)		x		x		x
Oksidacijos redukcijos potencialas (*)	Stebėjimas (spalva/ kvapas)		x	x	x	x

(*) Mikrobinio kvėpavimo greičio nustatymo metodas (26), fumigacijos metodas (27) arba mikroorganizmų skaičiavimo metodai (pvz., bakterijų, aktinomicečių, grybelių ir bendro kolonijų skaičiaus), darant aerobinius tyrimus; metano susidarymo greitis, darant anaerobinius tyrimus.

(**) Naujų tyrimų rezultatai parodė, kad vandens deguonies ir oksidacijos-redukcijos potencialo matavimai neturi mechanizmo nustatymo ir prognozavimo vertės, kai kalbama apie mikrobų populiacijos paviršiniuose vandenyse augimą ir vystymąsi (24)(25). Biocheminio deguonies poreikio (BOD, imant ėminį lauke, bandymo pradžioje ir pabaigoje) ir mitybinių mikroelementų/makroelementų Ca, Mg ir Mn vandenyje nustatymas (bandymo pradžioje ir pabaigoje) ir bendro N bei bendro P kiekio nuosėdose matavimas (imant ėminį lauke ir bandymo pabaigoje) gali būti geresnė priemonė aerobinio biologinio virsmo greičiams ir keliams interpretuoti bei įvertinti.

1.8.3. **Ėminių ėmimas, tvarkymas ir laikymas**

1.8.3.1. *Ėminių ėmimas*

Imant nuosėdas būtina vadovautis ISO rekomendacinio dokumento projektu dėl dugno nuosėdų ėminių ėmimo (8). Nuosėdų ėminiai turi būti imami iš viso viršutinio 5–10 cm storio nuosėdų sluoksnio. Nuosėdas atitinkantis vanduo turi būti imamas iš tos pačios vietos arba vietovės ir tuo pačiu metu, kaip ir nuosėdos. Atliekant anaerobinį tyrimą, nuosėdos ir jas atitinkantis vanduo turi būti imami, apsaugant nuo deguonies patekimo (28) (žr. 1.8.2.1 skirsnį). Kai kurie ėminių ėmimo įtaisai aprašyti literatūroje (8) (23).

▼C1

1.8.3.2. *Tvarkymas*

Nuosėdos atskiriamos nuo vandens filtravimu ir šlapios sijojamos per 2 mm sietą, naudojant toje pat vietoje buvusio vandens perteklių, kuris vėliau išpilamas. Tuomet žinomas nuosėdų ir vandens kiekis sumaišomas norimu santykiu (žr. 1.9.1 skirsnį) inkubavimo kolbose ir ruošiamas aklimatizacijai (žr. 1.8.4 skirsnį). Darant anaerobinį tyrimą, visos ruošimo operacijos turi būti vykdomos neleidžiant patekti deguoniui (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3. *Laikymas*

Rekomenduojama naudoti ką tik paruoštas nuosėdas ir vandenį, tačiau jei būtina ėminius laikyti, nuosėdos su vandeniu sijojamos, kaip pirmiau aprašyta, užpilamos vandeniu (6–10 cm vandens sluoksniu) ir laikomos kartu su juo tamsoje ne ilgiau kaip 4 savaites, esant 4 ± 2 °C[4] [13] (7) (8) (23). Ėminiai, skirti aerobiniams tyrimams, turi būti laikomi leidžiant laisvai patekti orui (pvz., atviruose induose), ėminiai, skiri anaerobiniams tyrimams, laikomi neleidžiant patekti deguoniui. Nuosėdos su vandeniu neturi užšalti arba nuosėdos neturi išdžiūti.

1.8.4. **Nuosėdų ar vandens ėminių ruošimas bandymui**

Prieš pridedant bandomosios medžiagos reikia aklimatizacijos laikotarpio, kai kiekvienas nuosėdų ar vandens ėminys supilamas į pagrindiniame bandyme naudojamą inkubavimo indą ir aklimatizuojamas esant tiksliai tokioms pačioms kaip ir bandymo inkubavimo sąlygoms (žr. 1.9.1 skirsnį). Aklimatizacijos laikotarpis reikalingas reikiamam sistemos stabilumui pasiekti, kurį rodo pH vertė, deguonies koncentracija vandenyje, nuosėdų ir vandens oksidacijos-redukcijos potencialas ir makroskopinis fazių atsiskyrimas. Paprastai aklimatizacijos laikotarpis turi trukti nuo vienos iki dviejų savaičių, bet neturi būti ilgesnis kaip keturios savaitės. Ataskaitoje turi būti pateikti šiuo laikotarpiu daromų matavimų rezultatai.

1.9. BANDYMO PROCEDŪRA

1.9.1. **Bandymo sąlygos**

Bandymas turi būti atliekamas inkubavimo aparate (žr. 1.8.1 skirsnį), esant vandens ir nuosėdų tūrio santykiui nuo 3: 1 iki 4: 1, ir 2,5 cm (± 0,5 cm) nuosėdų sluoksnio storiui. ([1]) Rekomenduojama naudoti ne mažiau kaip 50 g nuosėdų (skaičiuojant sausai medžiagai) vienam inkubavimo indui.

Bandymas turi būti atliekamas tamsoje esant pastoviai 10–30 °C temperatūrai. Tikslinga naudoti (20 ± 2) °C temperatūrą. Prireikus kiekvienam konkrečiam atvejui galima numatyti papildomą mažesnę temperatūrą (pvz., 10 °C), atsižvelgiant į informaciją, kurios turi suteikti bandymas. Inkubavimo temperatūra turi būti kontroliuojama ir nurodoma ataskaitoje.

([1]) Naujausi tyrimai parodė, kad, jei laikoma esant 4 °C, gali sumažėti nuosėdų organinės anglies kiekis, dėl ko gali sumažėti mikrobinis aktyvumas.

▼C1

1.9.2. **Bandomosios medžiagos apdorojimas ir įdėjimas**

Naudojama viena cheminės medžiagos bandymo koncentracija ([1]). Augalų apsaugai skirtoms cheminėms medžiagoms, kurios tiesiogiai pilamos į vandens telkinius, didžiausia etiketėje nurodyta dozavimo koncentracija turi būti laikoma didžiausia taikoma norma, apskaičiuojama pagal bandymo indo vandens paviršiaus plotą. Visais kitais atvejais naudojama koncentracija turi būti pagrįsta į aplinką išmetamo kiekio įverčiais. Būtina užtikrinti, kad būtų naudojama atitinkama bandomosios medžiagos koncentracija, siekiant apibūdinti transformavimo kelią ir transformavimo produktų susidarymą ir išnykimą. Gali tekti naudoti didesnes dozes (pvz., 10 kartų) tais atvejais, kai bandomosios medžiagos koncentracijos vertės bandymo pradžioje yra arti aptikimo ribos ir (arba) jei pagrindiniai transformavimo produktai negali būti lengvai rasti, kai jie sudaro 10 % bandomosios medžiagos įdėjimo normos. Tačiau, jei naudojamos didesnės bandymo koncentracijos vertės, medžiaga neturi daryti reikšmingo neigiamo poveikio vandens ir nuosėdų sistemos mikrobiniam aktyvumui. Siekiant gauti pastovią bandomosios medžiagos koncentraciją skirtingų matmenų induose, gali būti naudinga reguliuoti įdedamos medžiagos kiekį pagal vandens sluoksnio gylį inde ir jo gylį lauko sąlygomis (laikant, kad jis yra lygus 100 cm, bet galima naudoti ir kitas gylio vertes). Apskaičiavimo pavyzdys pateiktas 4 priedėlyje.

Būtų geriausia bandomąją medžiagą pilti į bandymo sistemos vandeninę fazę kaip vandeninį tirpalą. Jei kitaip neįmanoma, bandomajai medžiagai įpilti ir paskirstyti leidžiama naudoti nedidelius kiekius su vandeniu maišių tirpiklių (pvz., acetono, etanolio), tačiau jie neturi sudaryti daugiau kaip 1 % v/v ir neturi neigiamai veikti bandymo sistemos mikrobinio aktyvumo. Bandomosios medžiagos vandeninius tirpalus reikia ruošti kruopščiai, visiškam vienalytiškumui užtikrinti gali būti naudinga naudoti generavimo kolonėles ir išankstinį maišymą. Po vandeninio tirpalo įpylimo į bandymo sistemą vandeninę fazę rekomenduojama nestipriai maišyti, stengiantis kiek įmanoma mažiau liesti nuosėdas.

Preparatų paprastai nerekomenduojama naudoti, nes preparato ingredientai gali veikti bandomosios medžiagos ir (arba) transformavimo produktų pasiskirstymą tarp vandens ir nuosėdų fazių. Tačiau jei bandomoji medžiaga yra mažai tirpi vandenyje, preparatas gali būti tinkamas pasirinkimas.

Inkubavimo indų skaičius priklauso nuo mėginių ėmimo kartų skaičiaus (žr. 1.9.3 skirsnį). Turi būti naudojamas pakankamas bandymo sistemų skaičius, kad kiekvieną kartą imant mėginį būtų galima paaukoti dvi sistemas. Jei naudojami kiekvienos vandens ir nuosėdų sistemos kontroliniai ėminiai, jie neturi būti apdorojami bandomąja medžiaga. Kontroliniai įrenginiai gali būti naudojami nuosėdų mikrobinei biomasei ir vandens bei nuosėdų bendrajai organinei angliai nustatyti tyrimo pabaigoje. Du iš kontrolinių įrenginių (t. y. po vieną kontrolinį įrenginį kiekvienoms vandeninėms nuosėdoms) gali būti naudojami reikiamiems nuosėdų ir vandens parametrams kontroliuoti aklimatizacijos laikotarpiu (žr. 1.8.2.2 skirsnio lentelę). Du papildomi kontroliniai įrenginiai turi būti įtraukti tuo atveju, kai bandomoji medžiaga įpilama naudojant tirpiklį, kad būtų galima matuoti jo neigiamą poveikį bandymo sistemos mikrobiniam aktyvumui.

([1]) Toms cheminėms medžiagoms, kurios į paviršinius vandenis patenka skirtingais būdais, kai dėl to gaunamos labai skirtingos koncentracijos vertės, gali būti naudingas bandymas naudojant antrą koncentraciją, jei mažesniąją koncentraciją galima nustatyti pakankamai tiksliai.

▼C1

1.9.3. **Bandymo trukmė ir mėginių ėmimas**

Tyrimas paprastai neturi būti ilgesnis kaip 100 parų (6), ir turi vykti tol, kol nustatomas skilimo kelias ir pasiskirstymo tarp vandens ir nuosėdų charakteristika arba 90 % bandomosios medžiagos išsisklaido transformavimo keliu ir (arba) išgaruoja. Mėginiai turi būti imami bent šešis kartus (įskaitant nulinį laiką), naudojant neprivalomą pradinį tyrimą (žr. 1.9.4 skirsnį) tinkamam mėginių ėmimo režimui ir bandymo trukmei nustatyti, išskyrus kai apie bandomąją medžiagą yra pakankamas kiekis duomenų iš ankstesnių tyrimų. Jei tiriamos hidrofobinės bandomosios medžiagos, pradiniu tyrimo laikotarpiu gali būti reikalingi papildomi mėginių ėmimo taškai pasiskirstymo tarp vandens ir nuosėdų fazių greičiui nustatyti.

Atitinkamu mėginio ėmimo laiku inkubavimo indai su visu turiniu (kartotiniai mėginiai) imami analizei atlikti. Nuosėdos ir virš jų esantis vanduo analizuojami atskirai ([1]). Paviršinis vanduo atsargiai nupilamas, kiek įmanoma mažiau liečiant nuosėdas. Bandomosios medžiagos ir transformavimo produktų ekstrahavimas ir apibūdinimas turi būti daromas taikant atitinkamas analizės metodikas. Reikia imtis priemonių pašalinti medžiagą, kuri galėjo adsorbuotis ant inkubavimo indo arba jungiamuosiuose vamzdeliuose, naudojamuose lakiosioms medžiagoms sugauti.

1.9.4. **Neprivalomas pradinis bandymas**

Jei trukmė ir mėginių ėmimo režimas negali būti įvertinti pagal ankstesnius atitinkamus bandomosios medžiagos tyrimus, gali būti tikslinga atlikti išankstinį bandymą, kuris turi būti atliekamas tomis pačiomis bandymo sąlygomis, kurios yra numatytos galutiniam tyrimui. Ataskaitoje turi būti trumpai nurodytos išankstinio bandymo, jei atliekamas, sąlygos ir rezultatai.

1.9.5. **Matavimai ir analizė**

Kiekvieną kartą imant mėginį matuojama ir ataskaitoje nurodoma bandomosios medžiagos ir transformavimo produktų koncentracija vandenyje ir nuosėdose (kaip koncentracija ir įdėto kiekio procentinė dalis). Paprastai galioja taisyklė, kad transformavimo produktai, kurių randama $\geq$ 10 % nuo bendro vandens ir nuosėdų sistemos pradinio radioaktyvumo, turi būti identifikuoti, išskyrus kai galima pagrįsti, kad tai neįmanoma. Be to, turi būti identifikuoti transformavimo produktai, kurių koncentracija visą tyrimo laiką didėja, netgi jei jų koncentracija nėra didesnė už pirmiau pateiktas ribines vertes, kadangi toks reiškinys gali rodyti jų išsilaikymą. Tai turi būti nagrinėjama kiekvienu konkrečiu atveju, ataskaitoje pateikiant pagrįstus paaiškinimus.

Ataskaitoje turi būti pateikti rezultatai, kiekvienu mėginio ėmimo metu gauti dujų ar lakiųjų medžiagų sugavimo sistemose (CO_2 ir kiti produktai, t. y. lakieji organiniai junginiai). Turi būti pateiktos mineralizacijos greičio vertės. Kiekvienam mėginio ėmimo laikui pateikiamas neekstrahuojamų (surištųjų) likučių kiekis.

([1]) Tais atvejais, kai gali vykti greitas anaerobinio virsmo produktų pakartotinis oksidavimas, imant mėginius ir analizuojant turi būti užtikrinamos anaerobinės sąlygos.

▼C1

2. **DUOMENYS**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Kiekvieną kartą imant mėginį turi būti apskaičiuojamas įdėto radioaktyvumo bendras masių balansas arba regeneravimo laipsnis (žr. 1.7.1 skirsnį). Rezultatai turi būti pateikiami kaip pridėto radioaktyvumo procentinė dalis. Ataskaitoje turi būti pateiktas radioaktyvumo pasiskirstymas tarp vandens ir nuosėdų kiekvieną kartą imant mėginį, išreikštas kaip koncentracija ir kaip procentinės dalys.

Turi būti apskaičiuota bandomosios medžiagos pusėjimo trukmė, DT_{50} ir, jei tinka, DT_{75} ir DT_{90} kartu nurodant pasikliovimo ribas (žr. 1.7.3 skirsnį). Informacijos apie bandomosios medžiagos išsisklaidymo vandenyje ir nuosėdose greitį galima gauti naudojant atitinkamus įvertinimo būdus. Tai gali būti pseudopirmojo laipsnio kinetikos taikymas, empirinės geriausio kreivių atitikimo metodikos, kuriose taikomi grafinis arba skaitmeninis sprendimai, ir sudėtingesni įvertinimo būdai, taikantys, pvz., vieno arba kelių skyrių modelius. Daugiau informacijos galima rasti atitinkamuose paskelbtuose literatūros šaltiniuose (35) (36) (37).

Visi būdai turi savo privalumų ir silpnųjų vietų ir labai skiriasi sudėtingumu. Prielaida apie pirmojo laipsnio kinetiką gali būti per didelis skilimo ir pasiskirstymo procesų supaprastinimas, tačiau esant galimybei gaunamas dydis (greičio konstanta arba pusėjimo trukmė), kurį lengva suprasti ir kuris yra labai naudingas kuriant imitacinį modelį ir apskaičiuojant numatomas aplinkos koncentracijos vertes. Taikant empirinius metodus arba tiesines transformacijas, galima gauti geresnį kreivių ir duomenų atitikimą, taigi geriau įvertinti pusėjimo trukmę, DT_{50} ir, jei tinka, DT_{75} ir DT_{90} vertes. Tačiau gautųjų konstantų taikymas yra ribotas. Taikant modelius su skyriais galima gauti kelias rizikos įvertinimui naudingas konstantas, kurios aprašo skilimo skirtinguose skyriuose greitį ir cheminės medžiagos pasiskirstymą. Be to, tokie modeliai turėtų būti naudojami pagrindinių transformavimo produktų susidarymo ir skilimo greičio konstantoms įvertinti. Visais atvejais pasirinktas metodas turi būti pagrįstas ir tyrėjas turi grafiškai ir (arba) statistiškai parodyti gerą atitikimo kokybę.

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

— bendrinis pavadinimas, cheminis pavadinimas, CAS numeris, struktūrinė formulė (rodanti žymėtojo (-ųjų) atomo (-ų) padėtį, jei naudojama žymėtoji medžiaga) ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės,

— bandomosios medžiagos grynumas (priemaišos),

— radiocheminis žymėtosios cheminės medžiagos grynumas ir molinis aktyvumas (jei tinka).

▼C1

Etaloninės medžiagos:

— etaloninių medžiagų, naudojamų transformavimo produktams apibūdinti ir (arba) identifikuoti, cheminis pavadinimas ir struktūra.

Bandomosios nuosėdos ir vanduo:

— vandens telkinių dugno nuosėdų ėmimo vieta (-os), įskaitant, jei įmanoma, užteršimo istoriją,

— visa informacija apie vandens ir nuosėdų sistemų ėminių ėmimą, laikymą (jei taikomas) ir aklimatizavimą,

— vandens ir nuosėdų ėminių charakteristikos, išvardytos 1.8.2.2 skirsnio lentelėje.

Bandymo sąlygos:

— naudota bandymo sistema (pvz., taikanti pratekėjimą, biometrinė, ventiliavimo būdas, maišymo būdas, vandens tūris, nuosėdų masė, vandens ir nuosėdų sluoksnių storis, bandymo indų matmenys ir t. t.),

— bandomosios medžiagos dėjimas į bandymo sistemą: naudota bandymo koncentracija, kartotinių ir kontrolinių ėminių skaičius, bandomosios medžiagos įdėjimo būdas (pvz., tirpiklis, jei naudojamas), ir t. t.,

— inkubavimo temperatūra,

— mėginių ėmimo laikas,

— ekstrahavimo metodai ir jų efektyvumas, be to, analizės metodai ir aptikimo ribos,

— transformavimo produktų apibūdinimo ar identifikavimo metodai,

— nukrypimai tyrimo metu nuo bandymo protokolo arba bandymo sąlygų.

Rezultatai:

— tipinių analizių neapdorotų duomenų skaičiai (visi neapdoroti duomenys turi būti saugomi GLP archyve),

— taikytų analizės metodų pakartojamumas ir jautrumas,

— regeneravimo laipsnio vertės (tinkamu patvirtinto tyrimo % vertės yra pateiktos 1.7.1 skirsnyje),

— bandomosios medžiagos ir, jei tinka, transformavimo produktų ir neekstrahuojamo radioaktyvumo rezultatų, išreiškiamų kaip naudotos dozės % ir mg kg^{-1}, gautų vandenyje, nuosėdose ir visoje sistemoje (tik %), lentelės,

— masių balansas tyrimų eigoje ir juos užbaigus,

— transformavimo vandens bei nuosėdų dalyse ir visoje sistemoje (įskaitant mineralizaciją) grafinis vaizdas,

— mineralizacijos greičio vertės,

▼C1

— bandomosios medžiagos ir, jei tinka, pagrindinių transformavimo produktų transformavimo vandenyje, nuosėdose ir visoje sistemoje pusėjimo arba DT_{50}, ir, jei tinka DT_{75} ir DT_{90} vertės, įskaitant pasikliovimo ribas,

— bandomosios medžiagos ir, jei tinka, pagrindinių transformavimo produktų transformavimo kinetikos įvertinimas,

— pasiūlytas transformavimo kelias, jei tinka,

— rezultatų aptarimas.

4. **NUORODOS**

1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5–1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

3) MAFF Pesticides SAFEty Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.

4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) – Anaerobic and aerobic. Canada, pp 35–37.

5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162–3, Anaerobic aquatic metabolism.

6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.

8) ISO/DIS 5667–12. (1994). Water quality – Sampling – Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98–080.

10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945–956 (IUPAC 1984).

12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994–2000): Addenda 6–11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC – Pests and Diseases, 3B-4, 149–158.

▼C1

15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85–114. J. Wiley & Sons.

16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631–637.

17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661–667.

18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038–1039.

22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop „A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests“, 3–4 July 1991.

23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8–10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858–2868.

25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, 329–338.

26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197–203.

27) ISO-14240–2. (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13–21.

29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850–857.

30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527–1550.

31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499–1509.

▼C1

32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597–3603.

33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98–090.

34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, 961–968.

35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 39, 187–203.

36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 33, 47–60.

37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases, pp. 1349–1354.

▼C1

1 priedėlis

NURODYMAI DĖL AEROBINIŲ IR ANAEROBINIŲ BANDYMO SISTEMŲ

Aerobinė bandymų sistema

Šiame bandymo metode aprašytą aerobinę bandymo sistemą sudaro aerobinis vandens sluoksnis (tipinė deguonies koncentracijos verčių intervalas nuo 7 iki 10 mg 1–1) ir nuosėdų sluoksnis, aerobinis paviršiuje ir anaerobinis giliau po paviršiniu sluoksniu (tipinės vidutinės oksidacijos-redukcijos potencialo (E_h) vertės anaerobinėje nuosėdų zonoje yra nuo -80 iki -190 mV). Drėgnas oras leidžiamas virš vandens paviršiaus kiekviename inkubavimo įrenginyje pakankamam deguonies kiekiui erdvėje virš skysčio užtikrinti.

Anaerobinė bandymų sistema

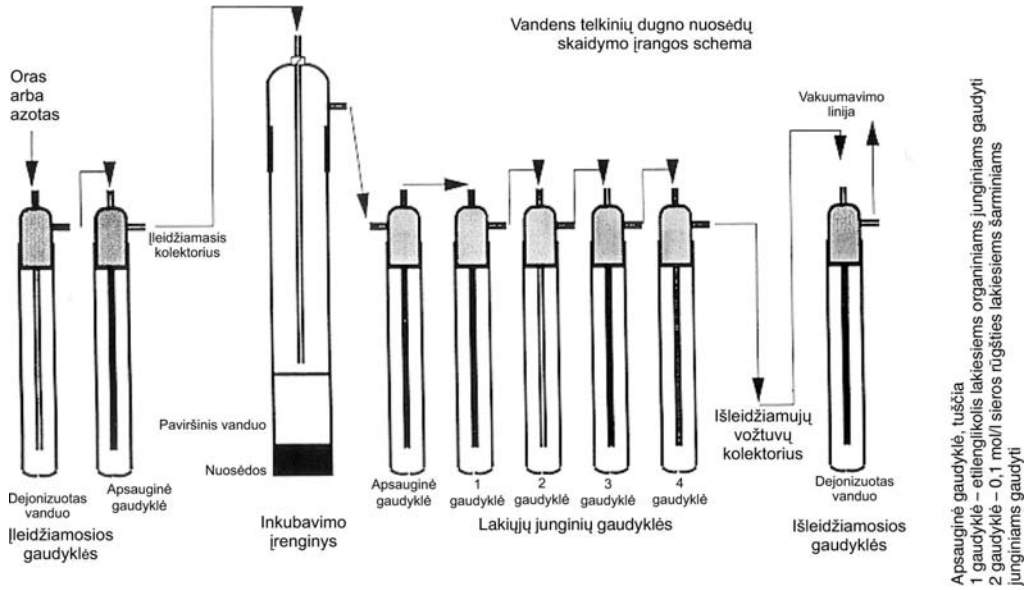
Bandymo naudojant anaerobinę bandymo sistemą metodika iš esmės atitinka metodiką, aprašytą aerobinei sistemai, išskyrus tai, kad virš vandens paviršiaus leidžiamas drėgnas azotas kiekviename inkubavimo įrenginyje pakankamam azoto kiekiui erdvėje virš skysčio užtikrinti. Nuosėdos ir vanduo laikomi anaerobiniais, kai oksidacijos-redukcijos potencialas (E_h) yra mažesnis kaip -100 mV.

Atliekant anaerobinį bandymą, mineralizacijos įvertinimą sudaro ir išsiskyrusio anglies dioksido bei metano kiekio matavimas.

▼C1

2 priedėlis

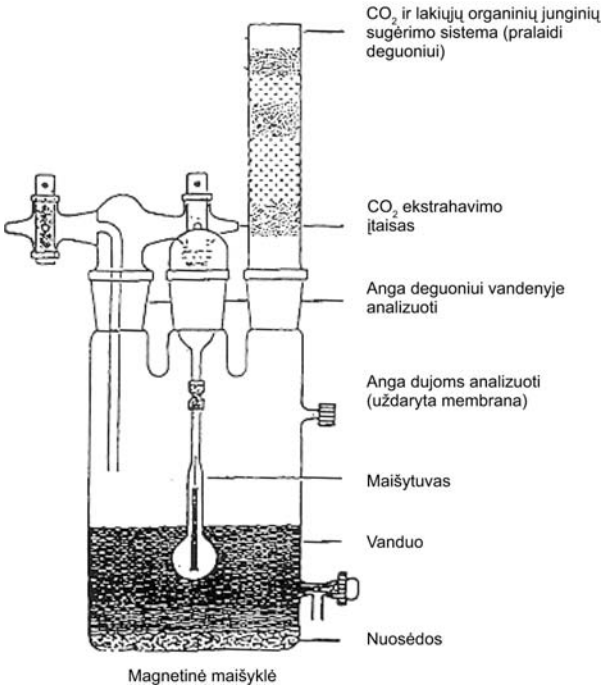
DUJŲ PRATEKĖJIMO APARATŪROS PAVYZDYS



▼C1

3 priedėlis

BIOMETRINĖS APARATŪROS PAVYZDYS



▼C1

4 priedėlis

Į BANDYMO INDUS DEDAMOS DOZĖS APSKAIČIAVIMO PAVYZDYS

Cilindro vidinis skersmuo:	= 8 cm
Vandens stulpelio gylis, išskyrus nuosėdas:	= 12 cm
Paviršiaus plotas: $3,142 \times 4^2$	= 50,3 cm^2
Įterpimo norma: 500 g bandomosios medžiagos/ha atitinka 5 µg/cm^2	
Bendras kiekis µg: 5 × 50,3	= 251,5 µg
Kiekis nustatomas pagal 100 cm stulpelio gylį: 12 x 251,5 ÷ 100	= 30,18 µg
Vandens stulpelio tūris: 50,3 x 12	= 603 ml
Koncentracija vandenyje: 30,18÷603	= 0,050 µg/ml arba 50µg/l

▼M1

C.25. **AEROBINĖ MINERALIZACIJA PAVIRŠINIAME VANDENYJE. BIOLOGINIO SKAIDYMO BANDYMO MODELIAVIMAS**

1. **METODAS**

Šis metodas atitinka OECD TG 309 (2004) (1).

1.1. ĮVADAS

Šio bandymo tikslas – išmatuoti mažos koncentracijos bandomosios medžiagos biologinio skaidymo eigą aerobiniame gamtiniame vandenyje ir kiekybiškai įvertinti stebėjimus greičio kinetinių lygčių pavidalu. Šis modeliavimo bandymas yra laboratorinis atskirų ėminių kratomos kolbos bandymas organinių medžiagų aerobinio biologinio skaidymo gamtinio paviršinio vandens (gėlo, sūroko arba jūros) ėminiuose greičiui nustatyti. Jis yra pagrįstas ISO/DIS 14592–1 (2), be to, į jį yra įtraukti C.23 ir C.24 bandymo metodų (3)(4) elementai. Siekiant išvengti bandymo mikrokosmo savybių blogėjimo, kai bandymų trukmė yra didelė, atskirų ėminių bandymą galima pakeisti pusiau nepertraukiamu procesu. Pagrindinis modeliavimo bandymo tikslas – nustatyti bandomosios medžiagos mineralizaciją paviršiniame vandenyje, ir mineralizacija sudaro skaidymo kinetikos išraiškos pagrindą. Tačiau papildomas antrinis bandymo tikslas – gauti duomenų apie pirminį skaidymą ir pagrindinių virsmo produktų susidarymą. Virsmo produktų identifikavimas ir, jei įmanoma, jų koncentracijos kiekybinis įvertinimas yra ypač svarbus labai lėtai mineralizuojamoms medžiagoms (pvz., kurių visos liekamosios ^{14}C pusėjimo trukmė viršija 60 parų). Dėl analizinių apribojimų pagrindiniams virsmo produktams identifikuoti ir kiekybiškai įvertinti paprastai turėtų būti naudojama didesnė bandomosios medžiagos koncentracija (pvz., > 100 μg/l).

Šio bandymo sąlygomis maža koncentracija yra tokia gana maža koncentracija (pvz., mažesnė kaip 1 μg/l – 100 μg/l), kuri galėtų užtikrinti, kad gauta biologinio skaidymo kinetika atitinka aplinkoje laukiamą kinetiką. Mažos koncentracijos bandomoji medžiaga bus kaip antrinis substratas palyginti su visa biologiškai skaidomos anglies substratų, esančių bandymo gamtiniame vandenyje, mase. Taigi tikėtina, kad biologinio skaidymo kinetika yra pirmojo laipsnio („ne augimo“ kinetika) ir kad bandomoji medžiaga gali būti skaidoma „kometabolizmo“ būdu. Pirmojo laipsnio kinetika reiškia, kad skaidymo greitis (mg/l/parą) yra proporcingas per laiką mažėjančiai substrato koncentracijai. Esant tikrajai pirmo laipsnio kinetikai, savitoji skaidymo greičio konstanta, k, nėra laiko ir koncentracijos funkcija. T. y. k mažai kinta bandymo laikotarpiu ir nekinta dėl koncentracijos padidinimo tarp bandymų. Pagal apibrėžtį, savitoji skaidymo greičio konstanta yra lygi santykiniam koncentracijos pokyčiui per laiką: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Nors nustatytomis sąlygomis paprastai laukiama pirmojo laipsnio kinetikos, gali būti tam tikrų aplinkybių, kai labiau tiktų kito tipo kinetika. Nukrypimus nuo pirmojo laipsnio kinetikos galima stebėti, kai biologinio virsmo greitį riboja ne reakcijos greitis, bet masės pernešimo reiškiniai, pvz., difuzijos greitis. Tačiau duomenis beveik visuomet galima aprašyti pseudopirmojo laipsnio kinetika, darant prielaidą apie greičio konstantos priklausomybę nuo koncentracijos.

▼M1

Informacija apie bandomosios medžiagos biologinį skaidumą esant didesnei koncentracijai (pvz., tipinių atrankos bandymų) ir informacija apie abiotinį skaidumą, virsmo produktus ir atitinkamas fizikochemines savybes turėtų būti gauta prieš bandymą, kad ji galėtų padėti parengti bandymo planą ir interpretuoti rezultatus. ^{14}C žymėtų bandomųjų medžiagų naudojimas ir ^{14}C fazinio pasiskirstymo bandymo pabaigoje nustatymas sudaro sąlygas visiškam biologiniam skaidumui nustatyti. Kai naudojama nežymėta bandomoji medžiaga, visišką biologinį skaidymą galima tik įvertinti, jei bandomos didesnės koncentracijos vertės ir yra žinomi visi pagrindiniai virsmo produktai.

1.2. APIBRĖŽTYS

Pirminis biologinis skaidymas. Mikroorganizmais veikiamos cheminės medžiagos struktūros pokytis (virsmas), jai netenkant cheminės tapatybės.

Funkcinis biologinis skaidymas. Mikroorganizmais veikiamos cheminės medžiagos struktūros pokytis (virsmas), jai netenkant būdingos savybės.

Visiškas aerobinis biologinis skaidymas. Mikroorganizmais veikiamos cheminės medžiagos skaidymas esant deguoniui į anglies dioksidą, vandenį ir į visų kitų ją sudarančių elementų neorganines druskas (mineralizacija) ir naujos biomasės bei organinės mikrobinės biosintezės produktų gamyba.

Mineralizacija. Mikroorganizmais veikiamos cheminės medžiagos arba organinės medžiagos skaidymas esant deguoniui į anglies dioksidą, vandenį ir į visų kitų ją sudarančių elementų neorganines druskas.

Vėlavimo tarpsnis. Laikas nuo bandymo pradžios iki skaidomųjų mikroorganizmų adaptacijos momento ir cheminės medžiagos arba organinės medžiagos biologinio skaidymo laipsnio padidėjimo iki nustatomo lygio (pvz., 10 % didžiausio teorinio biologinio skaidymo arba mažiau, atsižvelgiant į matavimo metodo tikslumą).

Didžiausias biologinio skaidymo laipsnis. Cheminės medžiagos arba organinės medžiagos biologinio skaidymo laipsnis procentais, kurį pasiekus biologinis skaidymas toliau bandant nebevyksta.

Pirminis substratas. Gamtinių anglies ir energijos šaltinių rinkinys, kuris užtikrina mikrobinės biomasės augimą ir gyvavimą.

Antrinis substratas. Tokios mažos koncentracijos substrato komponentas, dėl kurio skaidymo tik nežymiai padidėja veikliųjų mikroorganizmų anglies ir energijos ištekliai, palyginti su anglies ir energijos ištekliais, kuriuos tiekia pagrindiniai substrato komponentai (pirminiai substratai).

Skaidymo greičio konstanta. Pirmojo arba pseudopirmojo laipsnio kinetikos greičio konstanta, k (d^{-1}), kuri rodo skaidymo procesų greitį. Atliekant siuntos bandymą, k apskaičiuojama pagal pradinę skaidymo kreivės, gautos pasibaigus vėlavimo tarpsniui, dalį.

▼M1

Pusėjimo trukmė, $t_{1/2}$ (d). Terminas, vartojamas pirmojo laipsnio reakcijos greičiui apibūdinti. Tai laikas, per kurį koncentracija sumažėja 2 kartus. Pusėjimo trukmė ir skaidymo greičio konstanta yra susietos lygtimi $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Skaidymo pusėjimo trukmė. DT_{50} (d). Terminas, vartojamas kiekybiškai įvertinti biologinio skaidymo bandymą. Tai laikas, įskaitant vėlavimo tarpsnį, per kurį pasiekiamas 50 % biologinis skaidymas.

Aptikimo riba (LOD) ir kiekybinio nustatymo riba (LOQ). Aptikimo riba (LOD) – medžiagos koncentracija, kai jai esant mažesnei negalima atskirti medžiagos tapatybės požymių ir analizinių trukdžių. Kiekybinio nustatymo riba (LOQ) – medžiagos koncentracija, kai koncentracijai esant mažesnei ji negali būti nustatyta priimtinu tikslumu.

Ištirpusi organinė anglis (DOC). Ta vandens ėminio organinės anglies dalis, kuri negali būti pašalinta fazių atskyrimu, pvz., 15 min trukmės centrifugavimu esant 40 000 ms^{-2} pagreičiui arba membraniniu filtravimu, naudojant membranas, kurių poros yra 0,2 μm – 0,45 μm skersmens.

Suminis organinės ^{14}C aktyvumas (TOA). Suminis ^{14}C aktyvumas, atitinkantis organinę anglį.

Ištirpusios organinės ^{14}C aktyvumas (DOA). Suminis ^{14}C aktyvumas, atitinkantis ištirpusią organinę anglį.

Kietųjų dalelių organinės ^{14}C aktyvumas (POA). Suminis ^{14}C aktyvumas, atitinkantis kietųjų dalelių organinę anglį.

1.3. BANDYMO TAIKOMUMAS

Šis modeliavimo bandymas skirtas nelakioms arba mažai lakioms organinėms medžiagoms, bandomoms esant mažai koncentracijai. Jei naudoti atmosferai atviras kolbas (pvz., užkimštas vata), medžiagos, kurių Henrio dėsnio konstanta yra mažesnė nei maždaug 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (apie 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$), praktiškai gali būti priskirtos nelakioms. Naudojant uždarytas kolbas su laisvąja erdve, galima bandyti mažai lakias medžiagas (kurių Henrio dėsnio konstantos < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ arba < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$), nepatiriant bandymo sistemos nuostolių. Gali būti ^{14}C žymėtų medžiagų nuostoliai, jei nebūtų imamasi tinkamų atsargumo priemonių šalinant CO_2. Tokiais atvejais gali tekti gaudyti CO_2 naudojant vidinį šarminį absorbentą arba naudoti išorinę CO_2 absorbento sistemą (tiesioginis $^{14}CO_2$ nustatymas; žr. 3 priedą). Biologinio skaidymo kinetikai nustatyti bandomosios medžiagos koncentracijos vertės turi būti mažesnės nei tirpumo vandenyje vertės. Tačiau reikėtų pažymėti, literatūroje pateikiamos tirpumo vandenyje vertės gali būti gerokai didesnės nei bandomosios medžiagos tirpumas gamtiniuose vandenyse. Ypač mažai vandenyje tirpių bandomųjų medžiagų tirpumas gali būti nustatytas naudojant bandomus gamtinius vandenis.

Metodas gali būti taikomas norint modeliuoti biologinį skaidymą stambių dalelių neturinčiame paviršiniame vandenyje (pelaginis bandymas) arba drumstame paviršiniame vandenyje, pvz., kuris gali būti arti vandens ir nuosėdų sąlyčio paviršiaus (suspenduotų nuosėdų bandymas).

▼M1

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Atliekamas atskirų ėminių bandymas, inkubuojant bandomąją medžiagą tik su paviršiniu vandeniu (pelaginis bandymas) arba su paviršiniu vandeniu, į kurį pridėta 0,01–1 g/l sausos masės suspenduotų kietųjų dalelių (nuosėdų) (suspenduotų nuosėdų bandymas) vandens telkiniui su suspenduotomis kietosiomis dalelėmis arba su suspenduotomis nuosėdomis modeliuoti. Apatinę šio intervalo dalį atitinkanti suspenduotų kietų dalelių (nuosėdų) koncentracija yra tipinė didesnės dalies paviršinių vandenų koncentracija. Bandymo kolbos inkubuojamos tamsoje esant aplinkos temperatūrai, aerobinėmis ir maišymo sąlygomis. Skaidymo kinetikai nustatyti turėtų būti naudojamos bent dvi skirtingos bandomosios medžiagos koncentracijos vertės. Koncentracijos vertės turi skirtis 5–10 kartų ir turi atitikti tikėtina koncentracijos aplinkoje intervalą. Didžiausia bandomosios medžiagos koncentracija turėtų būti ne didesnė kaip 100 μg/l, bet siekiant užtikrinti, kad biologinis skaidymas atitiktų pirmojo laipsnio kinetiką, pageidautina didžiausia bandymo koncentracija yra 10 μg/l arba mažesnė. Mažiausia koncentracija neturėtų būti didesnė kaip 10 μg/l, bet pageidautina 1–2 μg/l arba mažesnė kaip 1 μg/l bandymo koncentracija. Pakankamai tiksli analizė esant tokioms mažoms koncentracijos vertėms dažniausiai gali būti pasiekta naudojant komercines ^{14}C žymėtas medžiagas. Dėl analizinių apribojimų dažnai neįmanoma išmatuoti bandomosios medžiagos koncentraciją reikiamu tikslumu, jei pridedamos bandomosios medžiagos koncentracija ≤ 100 μg/l (žr. 1.7.2 skirsnio antrąją pastraipą). Pagrindiniams virsmo produktams identifikuoti galima naudoti didesnes bandomosios medžiagos koncentracijos vertes (> 100 μg/l ir kartais > 1 mg/l), jei nėra specifinio mažą aptikimo ribą turinčio analizės metodo. Jei bandant naudojama didesnė bandomosios medžiagos koncentracija, rezultatų gali būti neįmanoma panaudoti pirmojo laipsnio skaidymo konstantai ir pusėjimo trukmei įvertinti, kadangi skaidymas gali neatitikti pirmojo laipsnio kinetikos.

Skaidymas stebimas atitinkamais laiko intervalais, matuojant liekamąją ^{14}C arba liekamąją bandomosios medžiagos koncentraciją, kai taikoma specifinė analizė. Patvariausios molekulės dalies žymėjimas ^{14}C užtikrina visiškos mineralizacijos nustatymą, žymint ^{14}C mažiau patvarią molekulės dalį arba taikant specifinę analizę, galima įvertinti tik pirminį biologinį skaidymą. Tačiau patvariausioje dalyje nebūtinai turi būti molekulei būdinga funkcinė grupė (kuri galėtų būti susieta su specifine savybe, pvz., toksiškumu, biologiniu kaupimusi ir t. t.). Tokiu atveju galbūt būtų tikslinga naudoti bandomąją medžiagą, kurios funkcinė grupė būtų žymėta ^{14}C specifinės savybės išnykimui stebėti.

1.5. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

Šiame bandyme galima naudoti žymėtąsias ir nežymėtas bandomąsias medžiagas. Rekomenduojama taikyti ^{14}C žymėjimo metodą ir paprastai turėtų būti žymėta patvariausia (-ios) molekulės dalis (-ys) (žr. dar 1.4 skirsnį). Jei medžiagos turi daugiau kaip vieną aromatinį žiedą, geriau būtų ^{14}C žymėti vieną arba daugiau anglies atomų kiekviename žiede. Be to, geriau būtų žymėti ^{14}C vieną arba daugiau anglies atomų abiejose lengvai skaidomų jungčių pusėse. Bandomosios medžiagos cheminis ir (arba) radiocheminis grynumas turėtų būti > 95 %. Siekiant palengvinti ^{14}C matavimus, kai atliekami mažos koncentracijos medžiagų bandymai, žymėtųjų medžiagų savitasis aktyvumas turėtų būti maždaug 50 μCi/mg (1,85 MBq) arba didesnis. Turi būti ši informacija apie bandomąją medžiagą:

▼M1

— tirpumas vandenyje [A.6 metodas],

— tirpumas organiniame (-iuose) tirpiklyje (-iuose) (tirpiklyje ištirpintų arba mažo tirpumo vandenyje medžiagų),

— disociacijos konstanta (pKa), jei medžiaga gali prisijungti arba atiduoti protonus [OECD TG 112] (5),

— garų slėgis [A.4 metodas] ir Henrio dėsnio konstanta,

— cheminis stabilumas vandenyje ir tamsoje (hidrolizė) [C.7 metodas].

Kai vandenyje mažai tirpios medžiagos yra bandomos jūros vandenyje, gali būti naudinga žinoti išsūdymo konstantą (arba „Sečenovo konstantą“) K^s, apibrėžiamą lygtimi: log (S/S') = K^s C_m, kurioje S ir S' yra medžiagos tirpumas gėlame ir jūros vandenyje, C_m – molinė druskos koncentracija.

Jei bandymas atliekamas kaip „suspenduotų nuosėdų bandymas“, reikėtų turėti šią informaciją:

— pasiskirstymo koeficientas n-oktanolis/vanduo [A.8 metodas],

— adsorbcijos koeficientas [C.18 metodas].

Kita naudinga informacija gali būti:

— koncentracija aplinkoje, jei žinoma arba įvertinta,

— bandomosios medžiagos toksiškumas mikroorganizmams [C.11 metodas],

— lengvas ir (arba) būdingasis biologinis skaidumas [C.4 A–F, C.12, C.9 metodai, OECD TG 302 (5)],

— aerobinio arba anaerobinio biologinio skaidumo dirvožemyje ir nuosėdų (vandens) virsmo tyrimai [C.23, C.24 metodai].

1.6. ETALONINĖ MEDŽIAGA

Etalonine medžiaga turėtų būti naudojama medžiaga, kuri paprastai lengvai skaidoma aerobinėmis sąlygomis (pvz., anilinas arba natrio benzoatas). Tikėtina anilino ir natrio benzoato skaidymo trukmė paprastai yra mažesnė kaip 2 savaitės. Etaloninių medžiagų naudojimo tikslas – užtikrinti, kad bandymo vandens mikrobinis aktyvumas atitiktų tam tikras ribas; t. y. kad mikrobų populiacija vandenyje būtų aktyvi.

▼M1

1.7. KOKYBĖS KRITERIJAI

1.7.1. **Atgavimas**

Iškart po bandomosios medžiagos pridėjimo kiekviena pradinė bandymo koncentracija turėtų tikrinama matuojant bent dviejų kartotinių ėminių ^{14}C aktyvumą arba atliekant cheminę analizę nežymėtų medžiagų atveju. Taip gaunama informacija apie analizės metodo tinkamumą ir pakartojamumą ir apie bandomosios medžiagos pasiskirstymo vienodumą. Atliekant vėlesnę duomenų analizę, paprastai naudojamas išmatuotas pradinis ^{14}C aktyvumas arba bandomosios medžiagos koncentracija, bet ne vardinė koncentracija, kadangi tokiu būdu kompensuojami nuostoliai dėl sorbcijos ir dozavimo paklaidos. ^{14}C žymėtos bandomosios medžiagos atgavimo laipsnis bandymo pabaigoje nurodomas kaip masių balansas (žr. 1.8.9.4 skirsnio paskutinę pastraipą). Geriausiu atveju žymėtųjų cheminių medžiagų masių balansas turėtų būti intervale nuo 90 % iki 110 %, analizės tikslumas turėtų užtikrinti 70 % – 110 % nežymėtų bandomųjų medžiagų atgavimo laipsnį. Šiuos intervalus reikėtų interpretuoti kaip kontrolinius skaičius ir jie neturėtų būti naudojami kaip bandymo priimtinumo kriterijai. Galėtų būti nustatomas bandomosios medžiagos, kai jos koncentracija yra mažesnė nei pradinė koncentracija, ir pagrindinių virsmo produktų analizės tikslumas.

1.7.2. **Analizės metodo pakartojamumas ir jautris**

Bandomosios medžiagos ir prireikus virsmo produktų kiekybinės analizės metodo pakartojamumas (įskaitant pradinio ekstrahavimo efektyvumą) gali būti patikrintas penkis kartus atliekant paviršinio vandens atskirų ekstraktų analizę.

Jei įmanoma, bandomosios medžiagos ir virsmo produktų analizės metodo aptikimo riba (LOD) turėtų būti bent 1 % į sistemą pridėto pradinio kiekio. Kiekybinio nustatymo riba (LOQ) turėtų būti lygi 10 % naudotos koncentracijos arba mažesnė. Didelio skaičiaus organinių medžiagų ir jų virsmo produktų cheminei analizei dažnai reikia, kad būtų pridedama palyginti didelės koncentracijos bandomoji medžiaga, t. y. > 100 μg/l.

1.8. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.8.1. **Įranga**

Bandymą galima atlikti atitinkamos talpos (pvz., 0,5 arba 1,0 litro) kūginėse arba cilindrinėse kolbose, užkimštose polisiloksaniniais arba guminiais kamščiais, arba serumo kolbose su CO_2 nelaidžiais dangčiais (pvz., su butilkaučiuko membrana). Kitaip bandymą galima atlikti naudojant daug kolbų, ir imti visą kolbos turinį, bent dviejų kolbų, kiekvienam mėginio ėmimo intervalui (žr. 1.8.9.1 skirsnio paskutinę pastraipą). Nelakių bandomųjų medžiagų, kurios nėra žymėtos, nebūtina sandariai užkimšti kamščiaus arba dangčiais; tinka nesandarūs vatos kamščiai, kurie apsaugotų nuo oro teršalų (žr. 1.8.9.1 skirsnio antrąją pastraipą). Mažai lakios medžiagos turėtų būti bandomos biometro tipo sistemoje, nestipriai maišant vandens paviršių. Siekiant apsisaugoti nuo užkrėtimo bakterijomis, prieš naudojimą indus galima sterilizuoti kaitinant krosnyje arba apdorojant autoklave. Be to, naudojama ši tipinė laboratorinė įranga:

— purtyklė arba magnetinės maišyklės bandymo kolbų turiniui nuolat maišyti;

▼M1

— centrifuga,

— pH-metras,

— nefelometras drumstumui matuoti nefelometriniais metodais,

— krosnis arba mikrobangė krosnis sausos medžiagos masei nustatyti,

— membraninio filtravimo aparatas,

— autoklavas arba krosnis stikliniams indams sterilizuoti karščiu,

— priemonės dirbti su ^{14}C žymėtomis medžiagomis,

— įranga CO_2 sugavimo tirpalų ir, jei reikia, nuosėdų mėginių ^{14}C aktyvumui kiekybiškai įvertinti,

— analizės įranga bandomajai (ir etaloninei) medžiagai nustatyti, jei taikoma specifinė cheminė analizė (pvz., dujų chromatografas, didelio slėgio skysčių chromatografas).

1.8.2. **Bandomosios medžiagos pradiniai tirpalai**

Bandomosios ir etaloninės medžiagos pradiniams tirpalams ruošti naudojamas dejonizuotas vanduo (žr. 1.8.7 skirsnio pirmąją pastraipą). Dejonizuotame vandenyje neturėtų būti medžiagų, kurios galėtų būti toksiškos mikroorganizmams, ir ištirpusios organinės anglies (DOC) turėtų būti ne daugiau kaip 1 mg/l (6).

1.8.3. **Paviršinio vandens ėminių rinkimas ir gabenimas**

Paviršinio vandens ėminių ėmimo vieta turėtų būti pasirinkta atsižvelgiant į bandymo tikslą tam tikromis aplinkybėmis. Pasirenkant ėminių ėmimo vietas, turi būti atsižvelgta į galimų žemės ūkio, pramonės arba buitinių šaltinių istoriją. Jei žinoma, kad vandens aplinka ketverius ankstesniu metus buvo teršiama bandomąja medžiaga arba jos struktūriniais analogais, bandymo vanduo neturėtų būti imamas, išskyrus kai tyrėjas specialiai tiria skaidymo greitį anksčiau užterštose vietose. Vandens pH ir temperatūra turėtų būti matuojama ėminių rinkimo vietoje. Be to, reikėtų nurodyti ėminio ėmimo gylį ir vandens ėminio išvaizdą (pvz., spalvą ir drumstumą) (žr. 3 skyrių). Turėtų būti išmatuota deguonies koncentracija ir (arba) oksidacijos redukcijos potencialas vandenyje ir nuosėdų paviršiniame sluoksnyje, kad galima būtų įrodyti aerobinių sąlygų buvimą, išskyrus kai jos yra akivaizdžios, sprendžiant pagal išvaizdą ir vietos istorinius duomenis. Paviršinis vanduo turėtų būti gabenamas labai gerai išplautuose induose. Gabenamo vandens temperatūra neturėtų labai viršyti bandymo temperatūrą. Rekomenduojama atšaldyti iki 4 °C, jei vanduo gabenamas ilgiau kaip 2–3 h. Vandens ėminys neturi būti užšalęs.

▼M1

1.8.4. **Paviršinio vandens laikymas ir ruošimas**

Pageidautina bandymą pradėti per parą nuo ėminio paėmimo. Jei vandenį tenka laikyti, jo laikymo trukmė turėtų būti kiek įmanoma trumpesnė ir jokiu atveju neturi viršyti 4 savaičių. Iki naudojimo vandens ėminys turėtų būti laikomas 4 °C temperatūroje ir aeruojamas. Prieš naudojimą turėtų būti pašalintos stambios dalelės, pvz., filtravimu per nailono filtrą, kurio akučių dydis apie 100 μm, arba per akytą popieriaus filtrą, arba sedimentacijos būdu.

1.8.5. **Vandens su nuosėdų priedu ruošimas (neprivaloma)**

Atliekant suspenduotų nuosėdų bandymą, paviršinės nuosėdos dedamos į kolbą su gamtiniu vandeniu (filtruojamu stambioms dalelėms pašalinti, kaip aprašyta 1.8.4 skirsnyje) suspensijai gauti; suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija turėtų būti nuo 0,01 iki 1 g/l. Paviršinės nuosėdos turėtų būti iš tos pačios vietos, iš kurios buvo paimtas vandens ėminys. Atsižvelgiant į konkrečią vandens aplinką, paviršinės nuosėdos gali būti apibūdinamos dideliu organinės anglies kiekiu (2,5–7,5 %) ir smulkiagrūde tekstūra arba mažu organinės anglies kiekiu (0,5–2,5 %) ir stambiagrūde tekstūra (3). Paviršines nuosėdas galima ruošti taip: išimami keli nuosėdų kernai, naudojant skaidraus plastiko vamzdį, iškart po ėminio paėmimo nupjaunami viršutiniai aerobiniai sluoksniai (nuo paviršiaus iki ne didesnio kaip 5 mm gylio) ir supilami kartu. Gautas nuosėdų ėminys turėtų būti gabenamas inde su didele laisvąja erdve orui, kad nuosėdas būtų galima laikyti aerobinėmis sąlygomis (atšaldoma iki 4 °C, jei jos gabenamos ilgiau kaip 2–3 h). Nuosėdų ėminys turėtų būti suspenduotas bandymo vandenyje santykiu 1:10 ir iki naudojimo laikomas 4 °C temperatūroje ir aeruojamas. Jei nuosėdas tenka laikyti, jų laikymo trukmė turėtų būti kiek įmanoma trumpesnė ir jokiu atveju neturi viršyti 4 savaičių.

1.8.6. **Pusiau nepertraukiama procedūra (neprivaloma)**

Gali tekti inkubuoti ilgiau (kelis mėnesius), jei yra ilgas vėlavimo tarpsnis prieš prasidedant didesniam bandomosios medžiagos skaidymui, kurį būtų galima išmatuoti. Jei tai žinoma iš ankstesnių medžiagos bandymų, bandymą galima pradėti, taikant pusiau nepertraukiamą procedūrą, kuri sudarytų sąlygas periodiškai atnaujinti bandymo vandens arba suspensijos dalį (žr. 2 priedą). Kitu būdu įprastas atskirų ėminių bandymas gali būti pakeistas pusiau nepertraukiamu bandymu, jei bandomosios medžiagos skaidymas neprasideda per maždaug 60 bandymo parų, taikant atskirų ėminių procedūrą (žr. 1.8.8.3 skirsnio antrąją pastraipą).

1.8.7. **Bandomosios (arba etaloninės) medžiagos pridėjimas**

Jei medžiagos gerai tirpsta vandenyje (> 1 mg/l) ir jų lakumas yra mažas (Henrio dėsnio konstantos < 1 Pa•m^3/mol arba < 10^{-5} atm•m^3/mol), pradinį tirpalą galima ruošti naudojant dejonizuotą vandenį (žr. 1.8.2 skirsnį); atitinkamas pradinio tirpalo tūris įpilamas į bandymo indus reikiamai koncentracijai pasiekti. Visų įpilamų pradinių tirpalų tūris turėtų būti kiek įmanoma mažesnis (< 10 % skysčio galutinio tūrio, jei įmanoma). Pagal kitą procedūrą, į kurią galima žiūrėti kaip į organinių tirpiklių naudojimo alternatyvą, bandomoji medžiaga ištirpinama didesniame bandymo vandens tūryje.

▼M1

Jei neišvengiama, vandenyje mažai tirpių nelakiųjų medžiagų tirpalai turėtų būti ruošiami naudojant lakųjį organinį tirpiklį, tačiau į bandymo sistemą pridėto tirpiklio kiekis neturėtų būti didesnis kaip 1 % V/V ir neturėtų neigiamai veikti mikrobų aktyvumo. Tirpiklis neturėtų veikti bandomosios medžiagos stabilumo vandenyje. Tirpiklis turėtų būti pašalintas iki visiškai mažo kiekio, kad labai nepadidintų DOC koncentracijos bandymo vandenyje arba suspensijoje. Tai turėtų būti tikrinama atliekant medžiagai specifinę analizę arba DOC analizę, jei įmanoma (6). Reikėtų imtis priemonių apriboti pernešto tirpiklio kiekį tik būtinuoju kiekiu ir užtikrinti, kad bandomosios medžiagos kiekis galėtų ištirpti galutiniame bandymo vandens tūryje. Galima taikyti kitus metodus bandomajai medžiagai pridėti į bandymo indus, kaip aprašyta (7) ir (8). Kai bandomajai medžiagai pridėti naudojamas organinis tirpiklis, tirpiklio ir bandymo vandens (be jokių priedų) kontroliniai ėminiai ir bandymo vandens su pridėta etalonine medžiaga ėminiai turėtų būti apdorojami panašiai kaip aktyvieji bandymo indai, į kuriuos pridėta nešiklyje ištirpinta bandomoji medžiaga. Tirpiklio kontrolinių ėminių tikslas – ištirti galimą neigiamą tirpiklio poveikį mikrobų populiacijai pagal etaloninės medžiagos skaidymą.

1.8.8. **Bandymo sąlygos**

1.8.8.1. *Bandymo temperatūra*

Inkubuoti reikėtų tamsoje (pageidautina) arba išsklaidytoje šviesoje, esant reguliuojamai (± 2 °C) tikslumu temperatūrai, kuri gali būti lauko temperatūra arba tipinė 20–25 °C temperatūra. Lauko temperatūra gali būti faktinė ėminio temperatūra jo ėmimo momentu arba vidutinė ėminio ėmimo vietos lauko temperatūra.

1.8.8.2. *Maišymas*

Turi būti užtikrintas nuolatinis purtymas arba maišymas, kad dalelės ir mikroorganizmai būtų suspenduoti. Be to, maišymas lengvina deguonies pernešimą iš laisvosios erdvės į skystį, taigi gali būti užtikrintos reikiamos aerobinės sąlygos. Kolbos statomos ant purtyklės (maišymas maždaug 100 min^{-1} dažniu) arba naudojama magnetinė maišyklė. Maišymas turi būti nuolatinis. Tačiau purtymas arba maišymas turėtų būti kiek įmanoma švelnesnis, bet visgi turi užtikrinti vienalytę suspensiją.

1.8.8.3. *Bandymo trukmė*

Bandymo trukmė paprastai neturėtų būti ilgesnė kaip 60 parų, išskyrus kai taikoma pusiau nepertraukiama procedūra ir periodinis bandymo suspensijos atnaujinimas (žr. 1.8.6 skirsnį ir 2 priedą). Tačiau atskirų ėminių bandymo trukmė gali būti padidinta iki ne ilgiau kaip 90 parų, jei bandomosios medžiagos skaidymas prasideda per pirmąsias 60 parų. Skaidymas stebimas atitinkamais laiko tarpais nustatant liekamosios ^{14}C aktyvumą arba išsiskyrusio $^{14}CO_2$ kiekį (žr. 1.8.9.4 skirsnį) ir (arba) atliekant cheminę analizę (1.8.9.5 skirsnis). Inkubavimo trukmė turi būti pakankamai ilga skaidymo procesui įvertinti. Pageidautina, kad skaidymo laipsnis būtų didesnis kaip 50 %; lėtai skaidomų medžiagų skaidymo laipsnis turi būti pakankamas (paprastai didesnis kaip 20 % skaidymas) kinetinės skaidymo greičio konstantos įverčiui gauti.

▼M1

Periodiškai turi būti matuojama pH vertė ir deguonies koncentracija bandymo sistemoje, išskyrus kai tokie matavimai nebūtini, turint ankstesnius panašių bandymų duomenis, gautus toje pačioje vietoje paimtiems vandens ir nuosėdų ėminiams. Kai kuriomis aplinkybėmis, esant gerokai didesnei koncentracijai vandenyje arba nuosėdose, dėl pirminių substratų metabolizmo išsiskyrusio CO_2 kiekio ir deguonies kiekio sumažėjimo gali pakakti labai pakeisti vykstančio bandymo sąlygas.

1.8.9. **Darbo eiga**

1.8.9.1. *Kolbų ruošimas pelaginiam bandymui*

Į bandymo kolbas įpilamas reikiamas bandymo vandens kiekis, kuris sudarytų apie trečdalį kolbos tūrio, bet ne mažiau kaip apie 100 ml. Jei naudojama daug kolbų (kad mėginį sudarytų visas kolbos turinys), reikiamas bandymo vandens tūris irgi yra apie 100 ml, nes maži ėminių tūriai gali turėti įtakos vėlavimo tarpsnio trukmei. Bandomoji medžiaga pridedama naudojant pradinį tirpalą, kaip aprašyta 1.8.2 ir 1.8.7 skirsniuose. Turėtų būti naudojamos bent dvi skirtingos bandomosios medžiagos koncentracijos vertės, kurios skirtųsi 5–10 kartų, kad būtų galima nustatyti skaidymo kinetikos laipsnį ir apskaičiuoti kinetinę skaidymo greičio konstantą. Abi pasirinktos koncentracijos vertės turėtų būti mažesnės kaip 100 μg/l ir pageidautina intervale < 1–10 μg/l.

Užkimškite kolbas kamščiais arba uždenkite orui ir CO_2 nelaidžiais dangčiais. Jei naudojamos ^{14}C nežymėtos ir nelakios bandomosios medžiagos, tinka nesandarūs vatos kamščiai, kurie apsaugotų nuo oro teršalų (žr. 1.8.1 skirsnį), jei žinoma, kad visi pagrindiniai skaidymo produktai yra nelakūs ir jei taikomas netiesioginis CO_2 nustatymo metodas (žr. 3 priedą).

Inkubuokite kolbas pasirinktoje temperatūroje (žr. 1.8.8.1 skirsnį). Paimkite mėginius cheminei analizei arba ^{14}C matavimams bandymo pradžioje (t. y. prieš biologinio skaidymo pradžią; žr. 1.7.1 skirsnį) ir vėliau atitinkamais laiko intervalais bandymo eigoje. Mėginius galima imti kaip dalinius mėginius (pvz., 5 ml alikvotines dalis) iš kiekvieno kartotinio ėminio arba kiekvienu mėginio ėmimo momentu imti visą kolbos turinį. Bandomosios medžiagos mineralizacija gali būti nustatyta netiesiogiai arba tiesiogiai (žr. 3 priedą). Norint gauti patikimą greičio konstantos įvertį, skaidymo tarpsniu (t. y. pasibaigus vėlavimo tarpsniui) paprastai turi būti paimti bent penki mėginiai, išskyrus kai galima pagrįsti, kad greitai skaidomoms medžiagoms pakanka trijų mėginių. Jei medžiagos skaidomos lėtai, skaidymo tarpsniu nesunku atlikti daugiau matavimų, taigi turėtų būti naudojama daugiau taškų k vertei gauti. Negalima nurodyti tam tikro mėginių ėmimo grafiko, kadangi biologinio skaidymo greitis yra nevienodas; tačiau lėto skaidymo atveju rekomenduojamas vienas mėginys per savaitę. Jei bandomoji medžiaga skaidoma greit, mėginius reikėtų imti kartą per parą pirmąsias tris paras ir vėliau kas antrą arba trečią parą. Tam tikromis aplinkybėmis, pvz., jei medžiagos greitai hidrolizuojasi, mėginius gali tekti imti kas valandą. Prieš bandymus rekomenduojama atlikti parengiamąjį tyrimą reikiamiems mėginių ėmimo intervalams nustatyti. Jei mėginius reikia turėti kitai specifinei analizei, patariama paimti daugiau mėginių ir tuomet atrinkti tuos, kurie turi būti analizuojami pasibaigus bandymui taikant atbulinės krypties strategiją, t. y. paskutiniai mėginiai analizuojami pirmi (žr. 1.8.9.5 skirsnio antrąją pastraipą dėl nurodymų laikomų ėminių stabilumui užtikrinti).

▼**M1**

1.8.9.2. *Kolbų ir ėminių skaičius*

Paruošiamas pakankamas skaičius bandymo kolbų, kad būtų:

— bandymo kolbos; bent dvi kolbos kiekvienai bandomosios medžiagos koncentracijai (geriau ne mažiau kaip 3) arba daug bandymo kolbų kiekvienai koncentracijai, jei kiekvieną imamą mėginį sudaro visas kolbos turinys (žymimos F_T),

— bandymo kolbos masių balansui apskaičiuoti; bent dvi kolbos kiekvienai bandymo koncentracijai (žymimos F_M),

— tuščiojo kontrolinio ėminio kolba, be bandomosios medžiagos; bent viena tuščiojo ėminio bandymo kolba, kurioje būtų tik bandymo vanduo (žymima F_B),

— etaloninio kontrolinio ėminio kolbos; dvi kolbos su etalonine medžiaga (pvz., anilinu arba natrio benzoatu, 10 μg/l) (žymimos F_C). Etaloninio kontrolinio ėminio paskirtis – patvirtinti mažiausią mikrobų aktyvumą. Jei tinka, galima naudoti žymėtąją etaloninę medžiagą, ir kai bandomosios medžiagos skaidymas stebimas atliekant cheminę analizę,

— sterilumo kontrolės kolbos; viena arba dvi kolbos, kuriose būtų sterilizuotas bandymo vanduo galimam abiotiniam skaidymui arba kitokio tipo ne biologiniam bandomosios medžiagos šalinimui tirti (žymimos F_S). Biologinį aktyvumą galima stabdyti bandymo vandenį apdorojant autoklave (121 °C; 20 min) arba pridedant toksinės medžiagos (pvz., natrio azido (NaN_3) 10–20 g/l, gyvsidabrio (II) chlorido ($HgCl_2$) 100 mg/l arba formalino at 100 mg/l) arba švitinant gama spinduliuote. Jei naudojamas $HgCl_2$, jis turėtų būti šalinamas kaip toksiškos atliekos. Jei naudojamas vanduo su dideli nuosėdų kiekiu, gauti sterilias sąlygas nelengva; šiuo atveju rekomenduojamas pakartotinis apdorojimas autoklave (pvz., tris kartus). Reikėtų atsižvelgti į tai, kad apdorojant autoklave gali pakisti nuosėdų sorbcinės charakteristikos,

— tirpiklio kontrolinės kolbos, kuriose būtų bandymo vanduo ir bandymo vanduo su etalonine medžiaga; po dvi kolbas, apdorotas tuo pačiu tirpiklio kiekiu, kurioms taikoma ta pati procedūra, kaip ir bandomosioms medžiagoms. Tirpiklio kontrolinių ėminių tikslas – ištirti galimą neigiamą tirpiklio poveikį mikrobų populiacijai, nustatant etaloninės medžiagos skaidymą.

Rengdamas bandymo planą, tyrėjas turėtų išnagrinėti santykinį bandinio kartotinių ėminių ir didesnio mėginių skaičiaus santykio reikšmingumą. Tikslus reikiamų kolbų skaičius priklausys nuo taikomo skaidymo matavimo metodo (žr. 1.8.9.1 skirsnio trečiąją pastraipą; 1.8.9.4 skirsnį ir 3 priedą).

▼M1

Kiekvienu mėginio ėmimo momentu iš kiekvienos bandymo kolbos turėtų būti imami du daliniai mėginiai (pvz., 5 ml alikvotinės dalys). Jei naudojama daug kolbų, kai mėginį sudaro visas kolbos turinys, kiekvieną kart imant mėginį turėtų būti paimtos bent dvi kolbos (žr. 1.8.9.1 skirsnio pirmąją pastraipą).

1.8.9.3. *Kolbų ruošimas suspenduotų nuosėdų bandymui [neprivaloma]*

Į bandymo indus įpilami reikiami tūriai bandymo vandens ir nuosėdų, jei reikia (žr. 1.8.5 skirsnį). Kolbų ruošimas suspenduotų nuosėdų bandymui atitinką kolbų ruošimą pelaginiam bandymui (žr. 1.8.9.1 ir 1.8.9.2 skirsnius). Geriausia naudoti serumo butelius arba panašios formos kolbas. Užkimštos kolbos dedamos horizontaliai ant purtyklės. Aišku, kad atviros kolbos su ^{14}C nežymėtomis, nelakiomis medžiagomis yra statomos; šiuo atveju rekomenduojama maišyti magnetine maišykle ir naudoti stiklu dengtus magnetinius strypelius. Prireikus buteliai aeruojami tinkamoms aerobinėms sąlygoms užtikrinti.

1.8.9.4. *Radiocheminiai nustatymai*

Išsiskyręs $^{14}CO_2$ yra matuojamas netiesiogiai ir tiesiogiai (žr. 3 priedą). $^{14}CO_2$ nustatomas netiesiogiai kaip skirtumas tarp pradinio ^{14}C aktyvumo bandymo vandenyje arba suspensijoje ir paimto mėginio suminio liekamojo aktyvumo, išmatuoto po mėginio rūgštinimo iki pH 2–3 ir CO_2 pašalinimo. Taip pašalinama neorganinė anglis ir išmatuotas liekamasis aktyvumas yra organinės medžiagos aktyvumas. Netiesioginis $^{14}CO_2$ nustatymas neturėtų būti taikomas, jei kaip pagrindiniai bandomosios medžiagos virsmo produktai susidaro lakieji junginiai (žr. 3 priedą). Jei įmanoma, išsiskyrusio $^{14}CO_2$ kiekis turėtų būti matuojamas tiesiogiai (žr. 3 priedą) kiekvieną kartą imant mėginį bent iš vienos bandymo kolbos; taikant šią procedūrą, galima patikrinti masių balansą ir biologinio skaidymo procesą, bet ji tinka tik bandymams, atliekamiems su uždarytomis kolbomis.

Jei atliekant bandymą išsiskyrusio $^{14}CO_2$ kiekis matuojamas tiesiogiai, šiam tikslui bandymo pradžioje turėtų būti paruošta daugiau kolbų. Rekomenduojamas tiesioginis $^{14}CO_2$ nustatymas, jei kaip pagrindiniai bandomosios medžiagos virsmo produktai susidaro lakieji junginiai. Kiekvieną kartą matuojant, papildomų bandymo kolbų turinys yra rūgštinamas iki pH 2–3 ir $^{14}CO_2$ surenkamas vidiniu arba išoriniu absorbentu (žr. 3 priedą).

^{14}C žymėtos bandomosios medžiagos ir pagrindinių virsmo produktų koncentracijos vertės gali būti nustatytos, taikant radiocheminę chromatografiją (pvz., plonasluoksnę chromatografiją, RAD-TLC) arba HPLC ir radiocheminį aptikimo metodą.

Papildomai galima nustatyti liekamojo radioaktyvumo fazinį pasiskirstymą (žr. 1 priedą), bandomosios medžiagos likutį ir virsmo produktus.

▼M1

Baigus bandymą, turėtų būti nustatytas masių balansas, tiesiogiai matuojant $^{14}CO_2$ atskirose bandymo kolbose, iš kurių atliekant bandymą mėginiai nebuvo imami (žr. 3 priedą).

1.8.9.5. *Specifinė cheminė analizė*

Jei yra jautrus specifinis analizės metodas, jį galima taikyti vietoj radiocheminių metodu pirminiam biologiniam skaidymui įvertinti, matuojant suminę bandomosios medžiagos liekamąją koncentraciją. Jei naudojama žymėtoji bandomoji medžiaga (visiškai mineralizacijai matuoti), specifinė cheminė analizė gali būti atliekama lygiagrečiai papildomai informacijai gauti ir procedūrai patikrinti. Be to, specifinė cheminė analizė gali būti taikoma nustatyti virsmo produktus, susidariusiems skaidant bandomąją medžiagą, ir ši analizė rekomenduojama medžiagoms, kurių mineralizacijos pusėjimo trukmė ilgesnė kaip 60 parų. Kiekvieną kart imant mėginį turėtų būti išmatuota ir pateikta ataskaitoje bandomosios medžiagos ir virsmo produktų koncentracija (kaip koncentracija ir kaip įdėto kiekio procentinė dalis). Apskritai, jei bet kuriuo mėginio ėmimo momentu aptikti virsmo produktai sudaro $\geq$ 10 % įdėtos medžiagos koncentracijos, jie turėtų būti identifikuoti, išskyrus kai jie gana patikimai patvirtinami kitu būdu. Virsmo produktų, kurių koncentracija visą tyrimą didėja, irgi turėtų būti identifikuojami, net jei jų koncentracija neviršija pirmiau nurodytos ribinės vertės, nes tai galėtų rodyti patvarumą. Reikėtų spręsti virsmo produktų analizės sterilumo kontrolės ėminiuose klausimą, jei manoma, kad galėtų vykti greitas abiotinis bandomosios medžiagos virsmas (pvz., hidrolizė). Virsmo produktų kiekybinio nustatymo ir identifikavimo būtinybė turėtų būti nagrinėjama kiekvienu konkrečiu atveju, pagrindimą pateikiant ataskaitoje. Ekstrahavimas organiniais tirpikliais turėtų būti taikomas pagal atitinkamos analizės metodikos rekomendacijas.

Visi mėginiai turėtų būti laikomi 2–4 °C temperatūroje ir nesiliesti su oru, jei analizė atliekama per 24 h (pageidautina). Laikant ilgiau, mėginiai turėtų būti užšaldomi žemiau –18 °C arba konservuojami cheminiu būdu. Konservuojamų mėginių rūgštinti nerekomenduojama, kadangi rūgštinti mėginiai gali būti nestabilūs. Jei analizei skirti mėginiai laikomi ilgiau kaip 24 h, turėtų būti atliktas stabilumo laikymo sąlygomis tyrimas, kuris įrodytų nagrinėjamų cheminių medžiagų stabilumą, kai laikoma –18 °C temperatūroje arba konservavimo sąlygomis. Jei analizės metodą sudaro ekstrahavimas tirpikliu arba kietosios fazės ekstrahavimas (*anglų k*. SPE), ekstrahuoti reikėtų iškart paėmus mėginį arba ne vėliau kaip per 24 h, jei mėginys atšaldomas.

Atsižvelgiant į analizės metodo jautrį, gali tekti imti didesnio tūrio ėminius nei nurodyta 16 skirsnyje. Bandymą būtų lengva atlikti, jei būtų naudojami vieno litro bandymo tūriai 2–3 litrų talpos kolbose, iš kurių būtų galima imti maždaug 100 ml mėginius.

▼M1

2. **DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

2.1.1. **Duomenų grafikas**

Mėginių ėmimo laikas suapvalinamas iki sveiko valandų skaičiaus (išskyrus kai medžiaga skyla dideliu laipsniu per minutes arba valandas), bet ne iki sveiko parų skaičiaus. Braižomi bandomosios medžiagos liekamojo aktyvumo (^{14}C žymėtų medžiagų) arba liekamosios koncentracijos (nežymėtų medžiagų) įverčių kaip laiko funkcijos grafikai, naudojant linijinius ir pusiau logaritminius parametrus (žr. 1a, 1b paveikslus). Jei skaidymas vyko, lyginami F_T ir F_S kolbų rezultatai. Jei kolbų su bandomąja medžiaga (F_T) ir sterilių kolbų (F_S) rezultatų vidurkiai skiriasi mažiau kaip 10 %, galima daryti prielaidą, kad stebimas skaidymas iš esmės yra abiotinis. Jei skaidymas F_S kolbose vyksta mažesniu laipsniu, skaičiai gali būti naudojami F_T kolboms gautų rezultatų pataisai daryti (atimant), kad ūbtų galima įvertinti biologinio skaidymo laipsnį. Kai atliekama neprivaloma pagrindinių virsmo produktų analizė, be bandomosios medžiagos išnykimo grafiko turėtų būti pateikti virsmo produktų susidarymo ir išnykimo grafikai.

Pagal skaidymo kreivę nustatoma vėlavimo tarpsnio trukmė t_L (pusiau logaritminis grafikas) tiesiąją kreivės dalį ekstrapoliuojant į nulinį skaidymo laiką arba nustatant maždaug 10 % skaidymo trukmę (žr. 1a ir 1b paveikslus). Pagal pusiau logaritminį grafiką įvertinama pirmojo laipsnio greičio konstanta k ir jos standartinė paklaida, atliekant ln (liekamojo ^{14}C aktyvumo arba bandomosios medžiagos koncentracijos) kaip lakiko funkcijos tiesinę regresiją. Konkrečiai, kai atliekami ^{14}C matavimai, reikia naudoti tik pradinės tiesinės kreivės dalies, pasibaigus vėlavimo tarpsniui, duomenis, ir geriau atrinkti nedidelį skaičių tipinių duomenų, bet ne didesnį skaičių mažiau apibrėžtų duomenų. Šiuo atveju neapibrėžtį sudaro paklaidos, būdingos taikant rekomenduojamą tiesioginio liekamojo ^{14}C aktyvumo (žr. toliau) matavimo metodą. Kartais galbūt reikėtų apskaičiuoti dvi skirtingas greičio konstantas, jei skaidymas atitinka dviejų tarpsnių schemą. Šiuo tikslu nustatomi du skirtingi skaidymo kreivės tarpsniai. Greičio konstantos k ir pusėjimo trukmė $t_{½} = \ln 2/k$ turėtų būti apskaičiuojamos atskirai kiekvienai kartotinių ėminių kolbai, kai daliniai mėginiai imami iš tos pačios kolbos, arba naudojant vidutines vertes, kai kiekvieną kartą kaip mėginys imamas visas kolbos turinys (žr. 1.8.9.2 skirsnio paskutinę pastraipą). Kai taikoma pirmoji nurodyta procedūra, ataskaitoje turėtų būti pateikta greičio konstanta ir pusėjimo trukmė, gauta atskirai kiekvienai kolbai, jų vidutinė vertė ir jos standartinė paklaida. Jei buvo naudojamos didelės bandomosios medžiagos koncentracijos vertės, skaidymo kreivė gali gerokai nukrypti nuo tiesės (pusiau logaritminio grafiko) ir pirmojo laipsnio kinetika gali negalioti. Taigi neįmanoma apibrėžti pusėjimo trukmės. Tačiau ribotam duomenų intervalui galima taikyti pseudopirmojo laipsnio kinetiką ir įvertinti skaidymo pusėjimo trukmę DT_{50} (laikas 50 % skaidymo laipsniui pasiekti). Tačiau reikia atminti, kad skaidymo eigos, išskyrus pasirinktą duomenų intervalą, negalima prognozuoti taikant DT_{50}, kuri aprašo tik nurodytą duomenų rinkinį. Nesunku gauti statistiniams apskaičiavimams ir kreivės pritaikymui palengvinti skirtas analizines priemones ir rekomenduojama naudoti šio tipo programinę įrangą.

▼M1

Jei atliekama specifinė cheminė analizė, įvertinamos pirminio skaidymo greičio konstantos ir pusėjimo trukmės vertės, kaip tai buvo atliekama visiškai mineralizacijai. Jei pirminis skaidymas yra greitį ribojantis procesas, kartais galima naudoti visos skaidymo eigos duomenų taškus. Taip yra todėl, kad priešingai ^{14}C aktyvumo matavimui, šie matavimai yra tiesioginiai.

Jei naudojamos ^{14}C žymėtos medžiagos, masių balansas bent bandymo pabaigoje turėtų būti išreikštas kaip naudotos pradinės koncentracijos procentinė dalis.

2.1.2. **Liekamasis aktyvumas**

Kai biologiškai skaidoma ^{14}C žymėta organinės medžiagos dalis, didžiausia ^{14}C dalis virsta $^{14}CO_2$, kita jo dalis naudojama biomasei didinti ir (arba) neląstelinių metabolitų sintezei. Taigi vykstant „visiškam“ biologiniam medžiagos skaidymui, ne visa jos anglis virsta $^{14}CO_2$. ^{14}C, patekęs į biosintezės būdu gautus produktus, vėliau lėtai išsiskiria kaip $^{14}CO_2$ dėl „antrinės mineralizacijos“. Dėl šių priežasčių liekamojo organinio ^{14}C aktyvumo (išmatuoto pašalinus CO_2) arba gauto $^{14}CO_2$ kiekio kaip laiko funkcijos kreivėse atsiranda „uodega“, kai skaidymas jau yra baigtas. Tai apsunkina duomenų kinetinį interpretavimą ir tik pradinė kreivės dalis (pasibaigus vėlavimo tarpsniui ir anksčiau nei pasiekiamas maždaug 50 % skaidymas) paprastai turėtų būti naudojama skaidymo greičio konstantai įvertinti. Jei bandomoji medžiaga yra skaidoma, suminis liekamasis organinės ^{14}C aktyvumas yra visuomet didesnis nei ^{14}C aktyvumas, atitinkantis likusią nesuskaidytą bandomąją medžiagą. Jei bandomoji medžiaga skaidoma pagal pirmojo laipsnio reakciją ir pastovi dalis α mineralizuojama į CO_2, pradinis ^{14}C išnykimo (suminės organinės ^{14}C kaip laiko funkcijos) kreivės krypties koeficientas bus lygus α, padaugintai iš bandomosios medžiagos (arba, jei kalbėti tiksliai, bandomosios medžiagos ^{14}C žymėtosios dalies) atitinkamos koncentracijos kreivės krypties koeficiento. Taigi naudojant nepataisyto suminio organinės ^{14}C aktyvumo matavimus, apskaičiuota skaidymo greičio konstanta bus sumažinta. Bandomosios medžiagos koncentracijos verčių apskaičiavimo pagal išmatuotą radiocheminį aktyvumą metodikos, pagrįstos įvairiomis supaprastinančiomis prielaidomis, yra aprašytos literatūroje (2)(9)(10)(11). Tokias metodikas lengviausia taikyti greitai skaidomoms medžiagoms.

2.2. REZULTATŲ INTERPRETAVIMAS

Jei nustatoma, kad didinant koncentraciją k nesikeičia (t. y., jei apskaičiuotoji k vertė yra maždaug tokia pati, esant skirtingoms bandomosios medžiagos koncentracijos vertėms), galima daryti prielaidą, kad esamas bandymo sąlygas, t. y. bandomąją medžiagą, vandens ėminį ir bandymo temperatūrą, atitinka pirmojo laipsnio greičio konstanta. Ekspertų sprendimu turi būti įvertinta, kokiu laipsniu rezultatus galima apibendrinti ir ekstrapoliuoti kitoms sistemoms. Jei naudojama didelė bandomosios medžiagos koncentracija, ir dėl tos priežasties skaidymas neatitinka pirmojo laipsnio kinetikos, duomenys negali būti naudojami tiesiogiai įvertinti pirmojo laipsnio greičio konstantą arba atitinkamą pusėjimo trukmę. Tačiau duomenys, gauti atliekant bandymus, kuriuose naudojama didelė bandomosios medžiagos koncentracija, vis dar gali būti naudingi visiškos mineralizacijos laipsniui įvertinti ir (arba) virsmo produktams aptikti ir kiekybiškai nustatyti.

▼M1

Jei yra žinomi kitų nei biologinis skaidymas išnykimo procesų (pvz., hidrolizės arba garavimo) greičiai, juos galima atimti iš bandymo metu stebimo suminio išnykimo greičio apytikriam biologinio skaidymo įverčiui gauti. Hidrolizės duomenis galima, pvz., gauti pagal sterilumo kontrolės ėminio duomenis arba atlikti lygiagretų bandymą, naudojant didesnę bandomosios medžiagos koncentraciją.

Netiesioginis ir tiesioginis $^{14}CO_2$ nustatymas (1.8.9.4 skirsnis ir 3 priedas) gali būti taikomas tik bandomosios medžiagos mineralizacijos į CO_2 laipsniui matuoti. Radiocheminė chromatografija (RAD-TLC) arba HPLC gali būti naudojama ^{14}C žymėtos bandomosios medžiagos koncentracijos vertėms nustatyti ir pagrindinių virsmo produktų susidarymui analizuoti (1.8.9.4 skirsnio trečioji pastraipa). Norint tiesiogiai įvertinti pusėjimo trukmę, būtina, kad nebūtų pagrindinių virsmo produktų (pagal apibrėžtį sudarančių ≥ 10 % pridėto bandomosios medžiagos kiekio). Jei esama pagrindinių virsmo produktų, kaip jie yra apibrėžti pagal šį bandymą, reikia atlikti detalų duomenų įvertinimą. Jį gali sudaryti pakartotinis bandymas ir (arba) virsmo produktų identifikavimas (žr. 1.8.9.5 skirsnio pirmąją pastraipą), išskyrus kai virsmo produktų likimas gali būti pakankamai pagrįstai įvertintas naudojant turimus duomenis (pvz., informaciją apie skaidymo kelią). Kadangi CO_2 virtusios bandomosios medžiagos anglies dalis kinta (labiausiai dėl bandomosios medžiagos ir kitų esančių substratų koncentracijos, bandymų sąlygų ir mikrobų populiacijos), šiuo bandymu neįmanoma tiesiogiai įvertinti visišką biologinį skaidymą, kaip DOC išnykimo metodu; bet rezultatas yra panašus į respirometriniu bandymu gaunamą rezultatą. Todėl mineralizacijos laipsnis bus lygus arba mažesnis kaip mažiausias visiško biologinio skaidymo lygis. Išsamesniam visiško biologinio skaidymo (mineralizacijos ir įjungimo į biomasę) vaizdui gauti, bandymo pabaigoje reikėtų atlikti ^{14}C fazinio pasiskirstymo analizę (žr. 1 priedą). Telkinyje su kietosiomis dalelėmis ^{14}C sudarys į biomasę įjungtas ^{14}C ir organinėmis dalelėmis sorbuotas ^{14}C.

2.3. BANDYMO TINKAMUMAS

Jei etaloninė medžiaga nesuskaidoma per numatomą laiko intervalą (anilino ir natrio benzoato – paprastai trumpesnė kaip dvi savaitės), turėtų būti suabejota bandymo tinkamumu ir turi būti papildomai patikrintas arba turėtų būti pakartotas naujo vandens ėminio bandymas. ISO atliktame tarplaboratoriniame metodo tyrime, kuriame dalyvavo septynios po Europą išdėstytos laboratorijos, buvo priimta, kad anilino skaidymo greičio konstantų intervalas yra 0,3–1,7 $para^{-1}$, jo vidurkis 0,8 d^{-1} ir standartinė paklaida ±0,4 d^{-1} ($t_{½}$ = 0,9 paros). Tipinės vėlavimo trukmės vertės buvo 1–7 paros. Nurodoma, kad tirtų vandens ėminių bakterijų biomasė atitiko 10^3 – 10^4 kolonijas sudarančių vienetų (*anglų k*. CFU) viename ml. Skaidymo greitis daug mitybinių medžiagų turinčiuose vidurio Europos vandenyse buvo didesnis nei šiauriniuose oligotrofiniuose vandenyse, galbūt dėl skirtingos trofinės būsenos arba dėl ankstesnio cheminių medžiagų veikimo.

Suminis žymėtųjų medžiagų atgavimas (masių balansas) bandymo pabaigoje turėtų būti nuo 90 % iki 110 %, tuo tarpu nežymėtų medžiagų pradinis atgavimas bandymo pradžioje turėtų būti nuo 70 % iki 110 %. Tačiau nurodyti intervalai turėtų būti suprantami tik kaip kontroliniai skaičiai ir netaikomi kaip bandymo priėmimo kriterijai.

▼M1

3. **BANDYMŲ ATASKAITA**

Tyrimo tipas, t. y. pelaginis arba suspenduotų nuosėdų bandymas, turėtų būti aiškiai nurodytas bandymų ataskaitoje, kurioje dar turi būti bent ši informacija:

Bandomoji medžiaga ir etaloninė (-ės) medžiaga (-os):

— įprasti pavadinimai, cheminiai pavadinimai (rekomenduojama vartoti IUPAC ir (arba) CAS pavadinimus), CAS numeriai, struktūrinės formulės (rodančios ^{14}C padėtį, jei naudojama žymėtoji medžiaga) ir atitinkamos fizikocheminės savybės (žr. 1.5 ir 1.6 skirsnius),

— medžiagų, naudojamų kaip virsmo produktų identifikavimo ir kiekybinio nustatymo etalonai, cheminiai pavadinimai, CAS numeriai, struktūrinės formulės (rodančios ^{14}C padėtį, jei naudojama žymėtoji medžiaga) ir atitinkamos fizikocheminės savybės,

— bandomosios ir etaloninės medžiagų grynumas (priemaišos),

— radiocheminis žymėtosios cheminės medžiagos grynumas ir savitasis aktyvumas (jei tinka).

Paviršinis vanduo:

Turi būti pateikta bent ši informacija apie paimta vandens ėminį:

— ėminio ėmimo vieta ir jos aprašymas, įskaitant, jei įmanoma, užteršimo istoriją,

— ėminio ėmimo data ir laikas,

— mitybinės medžiagos (suminis N, amonis, nitritas, nitratas, suminis P, ištirpęs ortofosfatas),

— ėmimo gylis,

— ėminio išvaizda (pvz., spalva ir drumstumas),

— DOC ir TOC,

— BOD,

— temperatūra ir pH ėminio ėmimo vietoje ir ėmimo laiku,

— deguonies koncentracija arba oksidacijos redukcijos potencialas (privaloma, jei nėra aiškaus aerobinių sąlygų įrodymo),

— druskingumas arba laidis (jūros ir sūroko vandens atveju),

— suspenduotos kietosios dalelės (drumsto ėminio atveju),

— visa kita galima informacija apie ėminio vietą ėmimo momentu (pvz., faktiniai arba anksčiau sukaupti duomenys apie upių arba jūros srovių srautą, šalia esančius pagrindinius ištakius ir ištakių tipą, oro sąlygas prieš ėminio ėmimą),

ir neprivalomai:

— mikrobų biomasė (pvz., tiesioginis skaičius, naudojant akridino oranžinį, arba kolonijas sudarančių vienetų skaičius),

▼M1

— neorganinė anglis,

— chlorofilo a koncentracija kaip specifinis dumblių biomasės įvertis.

Be to, turėtų būti pateikta ši papildoma informacija apie nuosėdas, jei atliekamas suspenduotų nuosėdų bandymas:

— nuosėdų ėmimo gylis,

— nuosėdų išvaizda (pvz., spalvotos, purvinos, dumblinos arba smėlėtos),

— tekstūra (pvz., % stambaus smėlio, smulkaus smėlio, dumblo ir molio),

— sausų suspenduotų kietųjų dalelių masė g/l, TOC koncentracija arba masės nuostolis iškaitinus, kaip organinės medžiagos kiekio matas,

— pH,

— deguonies koncentracija arba oksidacijos redukcijos potencialas (privaloma, jei nėra aiškaus aerobinių sąlygų įrodymo).

Bandymų sąlygos:

— laiko tarpas nuo ėminio paėmimo iki jo panaudojimo laboratoriniame bandyme, ėminio laikymas ir pradinis apdorojimas, tyrimų atlikimo data,

— įdėtos bandomosios medžiagos kiekis, bandomosios ir etaloninės medžiagos koncentracija,

— bandomosios medžiagos įdėjimo būdas, įskaitant tirpiklių naudojimą,

— naudoto paviršinio vandens ir nuosėdų (jei naudotos) tūris ir analizei imamo kiekvieno mėginio tūris,

— naudotos bandymo sistemos aprašymas,

jei neturi būti užtikrinamos tamsos sąlygos, informacija apie „išsklaidyto šviesos“ sąlygas,

— informacija apie metodą (-us), taikytą (-us) sterilumo kontrolės ėminiams gauti (pvz., temperatūra, apdorojimų autoklave trukmė ir skaičius),

— inkubavimo temperatūra,

— informacija apie analizės metodus, radiocheminių matavimų, masės balanso tikrinimo ir fazinio pasiskirstymo matavimo (jei atliekamas) metodą (-us),

— kartotinių ėminių skaičius.

Rezultatai:

— atgavimo procentinės dalies vertės (žr. 1.7.1 skirsnį),

— taikytų analizės metodų pakartojamumas ir jautrumas, įskaitant aptikimo ribą (LOD) ir kiekybinio nustatymo ribą (LOQ) (žr. 1.7.2 skirsnį),

▼M1

— visų matavimų duomenys (įskaitant mėginių ėmimo laiko taškus) ir apskaičiuotos vertės lentelių ir skaidymo kreivių pavidalu; kiekvienai bandymo koncentracijai ir kiekvienai kartotinio ėminio kolbai nurodomas logaritminio grafiko tiesinės koreliacijos krypties koeficientas, vėlavimo tarpsnio ir pirmojo laipsnio arba pseudopirmojo laipsnio greičio konstantos (jei įmanoma) įvertis, atitinkama skaidymo pusėjimo trukmė (arba pusėjimo periodas, t_{50}),

— ataskaitoje atitinkamos vertės pateikiamos kaip atskirų kartotinių ėminių rezultatų vidurkis, pvz., vėlavimo tarpsnio trukmės, skaidymo greičio konstantos ir skaidymo pusėjimo trukmės (arba t_{50}),

— sistema priskiriama prie neprisitaikiusios arba prisitaikiusios pagal skaidymo kreivės išvaizdą ir galimą bandymo koncentracijos įtaką,

— galutinio masės balanso tikrinimo ir fazinio pasiskirstymo matavimų (jei buvo atliekami) rezultatai,

— mineralizuotos ^{14}C dalis ir galutinis pirminio skaidymo lygis, jei taikoma specifinė analizė,

— įdėtų ir pagrindinių virsmo produktų identifikavimas, molinė koncentracija ir procentinė dalis (žr. 1.8.9.5 skirsnio pirmąją pastraipą), jei tinka,

— siūlomas virsmo kelias, jei tinka,

— rezultatų aptarimas.

4. **LITERATŪRA**

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.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.

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

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 (to be published summer 2000).

▼M1

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.

▼M1

1 Priedas

^{14}C Fazinis pasiskirstymas

Norint patikrinti procedūrą, įprasti liekamojo suminio organinės ^{14}C aktyvumo (TOA) matavimai turėtų būti papildyti masių balanso matavimais, įskaitant tiesioginį išsiskyrusio ir absorbentu sugauto $^{14}CO_2$ nustatymą (žr. 3 priedą). Patvirtintas $^{14}CO_2$ susidarymas jau pats savaime yra tiesioginis biologinio skaidymo, bet ne abiotinio skaidymo arba kitų mažėjimo mechanizmų, pvz., garavimo ir sorbcijos, įrodymas. Papildoma naudinga informacija, apibūdinanti biologinio skaidumo charakteristikas, gali būti gauta matuojant TOA pasiskirstymą tarp skystosios fazės (ištirpusios organinės ^{14}C aktyvumą DOA) ir kietųjų dalelių fazės (kietųjų dalelių organinės ^{14}C aktyvumą POA), kietąsias daleles atskyrus membraniniu filtravimu arba centrifugavimu. Be bandomosios medžiagos anglies, kuri buvo panaudota naujų ląstelių medžiagai sintetinti ir taip pateko į kietąją biomasę, POA sudaro bandomoji medžiaga, sorbuota ant mikrobų biomasės ir ant kitų kietųjų dalelių. Ištirpusios organinės medžiagos ^{14}C susidarymas gali būti įvertintas kaip DOA biologinio skaidymo pabaigoje (skaidymo kaip laiko funkcijos kreivės gulsčioji dalis).

Liekamosios ^{14}C faziniam pasiskirstymui pasirinktuose ėminiuose įvertinti, ėminiai filtruojami per 0,22 μm arba 0,45 μm membraninį filtrą, pagamintą iš medžiagos, kuri neadsorbuoja didelių bandomosios medžiagos kiekių (gali tikti polikarbonatiniai filtrai). Jei bandomosios medžiagos sorbcija ant filtro per didelė, kad į ją būtų galima neatsižvelgti (turi būti tikrinama prieš bandymą), vietoj filtravimo galima naudoti didelio greičio centrifugavimą (2 000 g; 10 min).

Filtratas arba centrifugatas apdorojamas taip, kaip 3 priede aprašyta nefiltruotiems ėminiams. Membraniniai filtrai ištirpinami atitinkamame scintiliacijos skystyje ir skaičiuojama kaip visuomet, paprastai taikant tik išorinio etalono santykio metodą gesinimo pataisai įvertinti, arba naudojamas ėminio oksidatorius. Jei buvo naudojamas centrifugavimas, susidariusi kietųjų dalelių tabletė suspenduojama 1–2 ml distiliuoto vandens ir skystis supilamas į scintiliacijos buteliuką. Centrifugavimo mėgintuvėlis du kartus plaunamas 1 ml distiliuoto vandens ir plovimo vanduo supilamas į buteliuką. Prireikus suspensija gali būti įlieta į gelį scintiliacijai skystyje skaičiuoti.

▼M1

2 Priedas

Pusiau nepertraukiamo skaidymo procedūra

Gali tekti inkubuoti keliems mėnesiams pakankamam patvarių medžiagų skaidymo laipsniui pasiekti. Bandymo trukmė paprastai neturėtų būti ilgesnė kaip 60 parų, išskyrus kai pradinio vandens ėminio charakteristikos išlaikomos atnaujinant bandymo suspensija. Tačiau bandymo laikotarpis gali būti pratęstas iki ne daugiau kaip 90 parų neatnaujinant bandymo suspensijos, jei bandomosios medžiagos skaidymas prasidėjo per pirmąsias 60 parų.

Inkubuojant ilgą laiką gali sumažėti mikrobų populiacijos įvairovė dėl įvairių išnykimo mechanizmų ir dėl galimo vandens ėminio pagrindinių mitybinių medžiagų ir pirminių anglies substratų išeikvojimo. Todėl lėtai skaidomų medžiagų skaidymo greičiui nustatyti rekomenduojama taikyti pusiau nepertraukiamą bandymą. Bandymas turėtų būti pradėtas taikant pusiau nepertraukiamą procedūrą, jei ankstesnis patyrimas rodo, kad reikės trijų mėnesių inkubavimo laikotarpio 20 % medžiagos skaidymo laipsniui pasiekti. Kitu būdu įprastas atskirų ėminių bandymas gali būti pakeistas pusiau nepertraukiamu bandymu, jei maždaug per 60 bandymo parų, taikant atskirų ėminių procedūrą, bandomosios medžiagos skaidymas neprasidėjo. Pusiau nepertraukiama procedūra gali būti sustabdyta ir bandymas tęsiamas kaip atskirų ėminių bandymas, kai yra pasiekiamas didelis skaidymo laipsnis (pvz., > 20 %).

Atliekant pusiau nepertraukiamą bandymą, maždaug trečdalis bandymo suspensijos tūrio kas dvi savaites keičiamas iš naujo paimtu vandeniu su bandomąją medžiaga, kurios koncentracija atitinka pradinę koncentraciją. Tokiu pat būdu į pakaitinį vandenį įdedama nuosėdų, kurių koncentracija atitinka pradinę koncentraciją (nuo 0,01 iki 1 g/l), jei atliekamas neprivalomas suspenduotų nuosėdų bandymas. Atliekant suspenduotų nuosėdų bandymą svarbu, kad keičiant vandenį būtų išlaikoma visiškai suspenduotų dalelių sistema ir kad būtų vienoda kietųjų dalelių ir vandens buvimo trukmė, nes priešingu atveju galima netekti laukiamo panašumo su vienalyte vandenine sistema be nejudančiųjų fazių. Dėl šių priežasčių būtų geriau, jei taikant pusiau nepertraukiamą procedūrą suspenduotų nuosėdų pradinė koncentracija atitiktų nurodyto intervalo apatines vertes.

Daroma prielaida, kad dėl nustatytų bandomosios medžiagos kiekių įdėjimo iš dalies atnaujinant bandymo suspensiją, pradinė bandomosios medžiagos koncentracija nėra viršijama, taigi išvengiama adaptacijos, kuri dažnai stebima esant didelei bandomosios medžiagos koncentracijai. Kadangi procedūrą sudaro pakartotinis sėjimas ir suvartotų mitybinių medžiagų bei pirminių substratų kompensavimas, atstatoma pradinė mikrobų įvairovė ir bandymo trukmė iš esmės gali būti begalinė. Reikia atkreipti dėmesį, kad taikant pusiau nepertraukiamą procedūrą turi būti daroma liekamosios bandomosios medžiagos koncentracijos pataisa dėl bandomosios medžiagos kiekio, pridėto ir pašalinto per kiekvieną atnaujinimo procedūrą. Jei junginių sorbcija maža, vietoj suminės bandomosios medžiagos koncentracijos galima naudoti ištirpusios bandomosios medžiagos koncentraciją ir atvirkščiai. Nurodytomis sąlygomis (0,1–1 g kietųjų dalelių/l) mažai sorbuojamos (< 5 %) medžiagos, kurių log K_{ow} < 3 (tinka neutraliems, lipofiliniams junginiams). Tai galima įrodyti šiuo apskaičiavimo pavyzdžiu. 0,1 g/l kietųjų dalelių atitinka maždaug 10 mg anglies viename litre (anglies dalis f_C = 0,01). Darant prielaidą, kad:

log K_{ow} (bandomosios medžiagos) = 3,

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

pasiskirstymo koeficientas, $K_d = f_C \times K_{oc}$,

ištirpusiai medžiagai tenkanti suminės koncentracijos dalis (C vandenyje (C_w)/C suminė (C_t) yra:

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

▼M1

3 Priedas

$^{14}CO_2$ Nustatymas

Netiesioginis $^{14}CO_2$ nustatymas

Atliekant įprastus matavimus, netiesioginis metodas paprastai reikalauja mažiausiai laiko ir yra tiksliausias, jei bandomoji medžiaga yra nelaki ir nevirsta lakiais virsmo produktais. Nefiltruoti mėginiai pvz., 5 ml tūrio, tiesiog supilami į scintiliacijos buteliukus. Tinkamas mėginių pradinis aktyvumas yra 5 000 dpm-10 000 dpm (80–170 Bq) ir mažiausias pradinis aktyvumas yra apie 1 000 dpm. CO_2 turėtų būti pašalintas, parūgštinus iki pH 2–3 1–2 lašais koncentruotos H_3PO_4 arba HCl. CO_2 galima pašalinti, barbotuojant orą maždaug ½-1 h. Kitaip buteliukus galima stipriai purtyti 1–2 h (pvz., ant mikroplokštelių purtyklės) arba per naktį purtant švelniau. CO_2 šalinimo procedūros efektyvumas turi būti tikrinamas (pratęsiant aeravimo arba purtymo trukmę). Įpilama scintiliacijos skysčio, tinkamo vandeninių mėginių scintiliacijai skaičiuoti, mėginys maišomas sūkuriniu maišytuvu ir radioaktyvumas nustatomas skaičiuojant scintiliaciją skystyje ir atimant fono aktyvumą, nustatytą bandymo tuščiajam ėminiui (F_B). Jei bandymo vanduo nėra labai spalvotas arba kietųjų dalelių koncentracija nėra didelė, mėginių gesinimas bus tolygus ir pataisoms dėl gesinimo daryti pakaktų išorinio etalono. Jei bandymo vanduo yra labai spalvotas, pataisą dėl gesinimo gali tekti daryti naudojant vidinį etaloną. Jei kietųjų dalelių koncentracija yra didelė, gali būti neįmanoma gauti vienalyčio tirpalo arba gelio arba gali labai skirtis mėginių gesinimas. Tokiu atveju galima taikyti toliau aprašytą skaičiavimo metodą, taikomą bandymo suspensijoms. Jei bandymas atliekamas kaip suspenduotų nuosėdų bandymas, $^{14}CO_2$ galima matuoti netiesiogiai, imant vienalytį 10 ml bandymo vandens ir suspensijos mėginį ir atskiriant fazes centrifugavimu, esant tinkamam pagreičiui (pvz., 40 000 m/s^2, 15 min). Vėliau vandeninė fazė apdorojama kaip pirmiau aprašyta. Kietųjų dalelių fazės ^{14}C aktyvumui (POA) nustatyti nuosėdas vėl suspenduojamos mažame tūryje distiliuoto vandens, suspensija supilama į scintiliacijos buteliukus ir įpilama scintiliacijos skysčio geliui gauti (šiam tikslui yra specialūs scintiliacijos skysčiai). Atsižvelgiant į kietųjų dalelių tipą (pvz., organinių medžiagų kiekį jose), gal būtų tikslinga mėginį per naktį skaidyti audinių soliubilizavimo priemone ir prieš įpilant scintiliacijos skysčio homogenizuoti sūkuriniu maišytuvu. Kitaip POA gali būti nustatytas mėginį sudeginant oksidacijos įrenginyje, esant deguonies pertekliui. Skaičiuojant visuomet reikėtų įtraukti vidinius etalonus, ir gali tekti daryti pataisas dėl gesinimo, kiekvienam atskiram mėginiui naudojant vidinį etaloną.

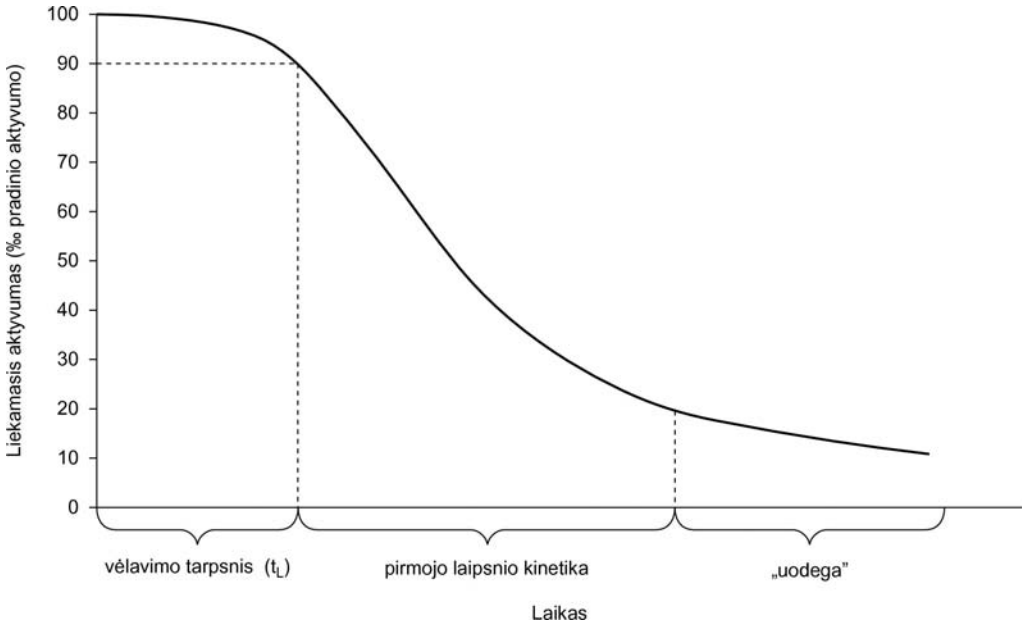
Tiesioginis $^{14}CO_2$ nustatymas

Jei išsiskyręs $^{14}CO_2$ yra matuojamas tiesiogiai, tai turėtų būti daroma ruošiant daugiau kolbų bandymo pradžioje, kiekvienam matavimui imti visą bandymo kolbos turinį, jį rūgštinti iki pH 2–3 ir surinkti $^{14}CO_2$ vidiniu (bandymo pradžioje įdėtu į kiekvieną bandymo kolbą) arba išoriniu absorbentu. Absorbentu gali būti šarmas (pvz., 1 N NaOH tirpalas arba NaOH granulės), etanolaminas, absorbentai etanolamino pagrindu ir prekyboje esantys absorbentai. Atliekant tiesioginį $^{14}CO_2$ matavimą, kolbos turėtų būti uždarytos, pvz., butilkaučiuko membrana.

▼M1

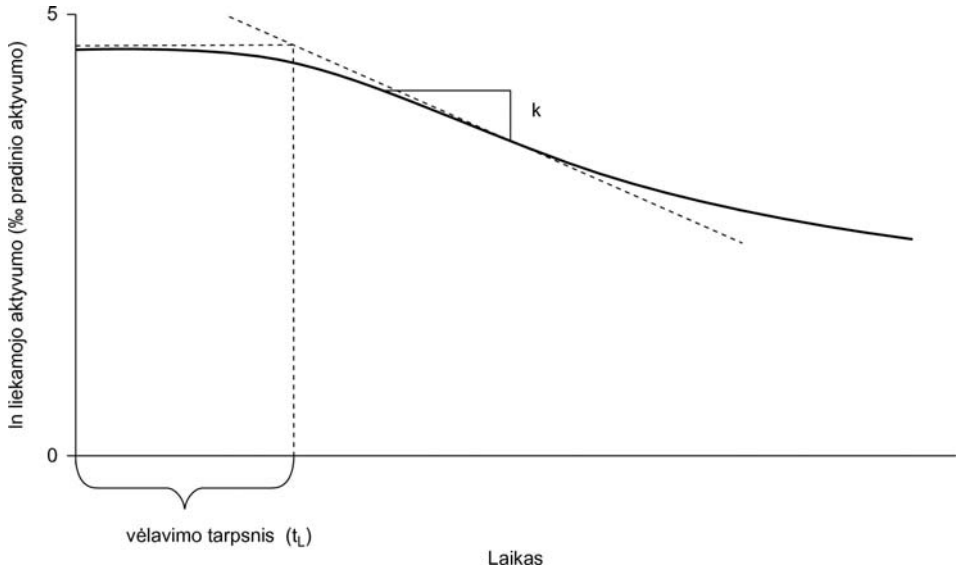
1a paveikslas.

Aritmetinio duomenų grafiko pavyzdys (liekamasis aktyvumas kaip laiko funkcija)



1b paveikslas.

Pusiau logaritminio duomenų grafiko pavyzdys (ln liekamojo aktyvumo kaip laiko funkcija)



▼M6

C.26. *LEMNA* RŪŠIŲ AUGALŲ AUGIMO SLOPINIMO BANDYMAS

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 221 (2006). Jis skirtas cheminių medžiagų toksiškumui *Lemna* (plūdenų) genties gėlo vandens augalams vertinti. Jis pagrįstas esamais metodais (1), (2), (3), (4), (5), (6), tačiau į jį įtraukti tų metodų pakeitimai, atsižvelgiant į naujus mokslinius tyrimus ir konsultacijas keliais svarbiais klausimais. Šio bandymo metodo tinkamumas patvirtintas tarptautiniu tarplaboratoriniu bandymu (7).

2. Pagal šį bandymo metodą atliekami toksiškumo bandymai naudojant *Lemna gibba* ir *Lemna minor* rūšių augalus; abi rūšys yra plačiai ištirtos ir joms taikomi minėti standartai. *Lemna* spp. klasifikacija yra sudėtinga dėl didelės fenotipų įvairovės. Nors *Lemna* atsakas į nuodingųjų medžiagų poveikį gali priklausyti nuo genetinio kintamumo, kol kas nepakanka duomenų apie šio kintamumo pobūdį, kad bandymams pagal šį metodą būtų galima rekomenduoti konkretų kloną. Pažymėtina, kad nors šie bandymai nėra atliekami steriliai, įvairiuose bandymo proceso etapuose imamasi priemonių užkrėtimui kitais organizmais, kiek įmanoma, sumažinti.

3. Išsamiai aprašyta šio bandymo atlikimo atnaujinant bandymo tirpalą (pusiau stacionarusis ir pratekamojo srauto bandymas) ir jo neatnaujinant (stacionarusis bandymas) tvarka. Atsižvelgiant į bandymo tikslus ir norminius reikalavimus, rekomenduojama apsvarstyti galimybę taikyti pusiau stacionarųjį ir pratekamojo srauto metodus, jeigu, pvz., cheminės medžiagos greitai dingsta iš tirpalo dėl garavimo, fotocheminio skilimo, nuosėdų susidarymo ar biologinio skaidymo. Papildomų gairių pateikta literatūroje (8).

4. Taikant šį metodą vartojamos sąvokos apibrėžtos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

5. Eksponentiškai augančios *Lemna* genties augalų monokultūros septynias paras auginamos veikiant įvairių koncentracijų bandomajai cheminei medžiagai. Šio bandymo tikslas – kiekybiškai įvertinti cheminės medžiagos poveikį augalų vegetatyviniam augimui per tą laikotarpį remiantis pasirinktų matuojamų kintamųjų vertinimais. Pagrindinis matuojamas kintamasis yra augalų gniužulų skaičius. Kartu su juo matuojamas dar bent vienas kintamasis (bendras gniužulų plotas, sausos medžiagos masė arba šviežios medžiagos masė), nes kai kurios cheminės medžiagos gali paveikti kitus matuojamus kintamuosius kur kas labiau nei gniužulų skaičių. Siekiant kiekybiškai išreikšti cheminės medžiagos poveikį, augalų augimas bandymo tirpaluose palyginamas su kontrolinės grupės augimu ir nustatoma konkretų x % (pvz., 50 %) augimo slopinimą sukelianti tos cheminės medžiagos koncentracija, kuri išreiškiama EC_x (pvz., EC_{50}).

6. Bandymo vertinamoji baigtis yra augalų augimo slopinimas, išreiškiamas kaip logaritminis matuojamo kintamojo didėjimas (vidutinis savitasis augimo greitis) bandomosios medžiagos veikimo laikotarpiu. Pagal vidutinius savituosius augimo greičius, išmatuotus naudojant bandymo tirpalų seriją, nustatoma konkretų augimo greičio sumažėjimą x % (pvz., 50 %) sukelianti koncentracija, kuri išreiškiama E_rC_x (pvz., E_rC_{50}).

7. Taikant šį bandymo metodą naudojamas papildomas atsako kintamasis – išeiga, kurią gali reikėti nustatyti pagal kai kurių valstybių konkrečius norminius reikalavimus. Išeiga apibrėžiama kaip matuojamų kintamųjų skirtumas, atsiradęs nuo bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžios iki pabaigos. Pagal išeigą, nustatytą naudojant bandymo tirpalų seriją, apskaičiuojama konkretų procentinį išeigos sumažėjimą x % (pvz., 50 %) sukelianti koncentracija, kuri išreiškiama E_yC_x (pvz., E_yC_{50}).

▼M6

8. Be to, galima statistiškai nustatyti mažiausią pastebėto poveikio koncentraciją (LOEC) ir nepastebėto poveikio koncentraciją (NOEC).

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

9. Turėtų būti taikomas pakankamo jautrio analizės metodas cheminės medžiagos kiekiui bandymo terpėje nustatyti.

10. Nustatant bandymo sąlygas gali būti naudinga žinoti šią informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą: jos struktūrinę formulę, grynumą, tirpumą vandenyje, stabilumą veikiant vandeniui ir šviesai, disociacijos konstantą, oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientą, garų slėgį ir biologinį skaidumą. Tirpumo vandenyje ir garų slėgio duomenis galima panaudoti apskaičiuojant Henrio dėsnio konstantą, iš kurios būtų aišku, ar yra tikimybė per bandymo laikotarpį netekti didelio bandomosios cheminės medžiagos kiekio. Tai padėtų nustatyti, ar reikia imtis konkrečių priemonių tokiems nuostoliams mažinti. Jeigu turima informacija apie bandomosios cheminės medžiagos tirpumą ir stabilumą kelia abejonių, patartina įvertinti šias savybes bandymo sąlygomis, t. y. bandymui naudojamoje auginimo terpėje, esant bandymo temperatūrai ir apšvietimo režimui.

11. Jeigu itin svarbu kontroliuoti bandymo terpės pH lygį, pvz., atliekant metalų arba vandenyje nepatvarių cheminių medžiagų bandymus, į auginimo terpę rekomenduojama įpilti buferinio tirpalo (žr. 21 skirsnį). Daugiau gairių, kaip atlikti bandymus su cheminėmis medžiagomis, kurias tirti yra sunkiau dėl jų fizikinių ir cheminių savybių, pateikta literatūroje (8).

BANDYMO TINKAMUMAS

12. Bandymas pripažįstamas tinkamu, jeigu augalų gniužulų skaičius kontroliniuose bandiniuose padvigubėja greičiau nei per 2,5 paros (60 val.), taigi per septynias paras padidėja maždaug septynis kartus, o vidutinis savitasis augimo greitis yra 0,275 para^{-1}. Šio bandymo metodo aprašyme nurodytų terpių ir bandymo sąlygomis šį kriterijų gali atitikti stacionarusis bandymas (5). Taip pat numatoma, kad šį kriterijų gali atitikti ir pusiau stacionariosiomis bei pratekamojo srauto sąlygomis atliekami bandymai. Kaip apskaičiuojama gniužulų dvigubėjimo trukmė, parodyta 49 skirsnyje.

ETALONINĖ CHEMINĖ MEDŽIAGA

13. Bandymo procedūrai patikrinti galima atlikti bandymą su etalonine chemine medžiaga arba medžiagomis, pvz., 3,5-dichlorfenoliu, kuris naudotas per tarptautinį tarplaboratorinį bandymą (7). Etaloninės cheminės medžiagos bandymą patartina atlikti bent dukart per metus arba, jeigu rečiau, – tuo pačiu metu, kai nustatomas bandomosios cheminės medžiagos toksiškumas.

METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

14. Visa įranga, kuri liečiasi su bandymo terpėmis, turėtų būti pagaminta tik iš stiklo ar kitos chemiškai inertinės medžiagos. Augalų kultūroms auginti ir bandymams naudojami stikliniai indai turėtų būti išvalyti, kad juose neliktų cheminių medžiagų priemaišų, kurios galėtų būti išplautos į bandymo terpę, ir sterilūs. Bandymui turėtų būti naudojami pakankamai platūs indai, kad atskirų kolonijų gniužulai kontrolinės grupės induose iki bandymo pabaigos augtų nesudarydami sanklotos. Nesvarbu, ar augalų šaknys siekia bandymo indo dugną, ar ne, tačiau patartina naudoti ne mažiau kaip 20 mm gylio ir 100 ml tūrio indus. Galima rinktis bet kokius bandymo indus, kurie atitinka

▼M6

šiuos reikalavimus. Iš praktikos žinoma, kad tinka reikiamų matmenų cheminės stiklinės, kristalizatoriai arba stiklinės Petri lėkštelės. Bandymo indai turi būti uždengti, siekiant kuo labiau sumažinti garavimą ir apsaugoti nuo atsitiktinio užteršimo, tačiau juose turi pakankamai cirkuliuoti oras. Tinkami bandymo indai ir ypač jų dangčiai neturi mesti šešėlių ar keisti šviesos spektrinių savybių.

15. Kultūrų auginimo ir bandymo indų nereikėtų laikyti kartu; geriausia naudoti atskiras klimatines auginimo kameras, inkubatorius arba patalpas. Apšvietimas ir temperatūra turi būti reguliuojami ir pastovūs (žr. 35–36 skirsnius).

Bandomieji organizmai

16. Šiam bandymui naudojami *Lemna gibba* arba *Lemna minor* rūšies organizmai. Toksiškumo bandymams naudojamos plūdenų rūšys glaustai aprašytos 2 priedėlyje. Augalų medžiaga gali būti gauta iš kultūrų rinkinio, kitos laboratorijos arba iš lauko. Jei augalai surinkti lauke, jų kultūrą reikėtų bent aštuonias savaites iki naudojimo laikyti tokioje pačioje terpėje, kokia bus naudojama bandymui. Lauko vietose, iš kurių renkamos pradinės kultūros, neturi būti jokių pastebimų taršos šaltinių. Iš kitos laboratorijos arba kultūrų rinkinio gautas kultūras reikėtų tokia pačia tvarka laikyti mažiausiai tris savaites. Bandymo ataskaitoje reikėtų visuomet nurodyti bandymui naudotos augalų medžiagos šaltinį, rūšį ir kloną (jei žinomas).

17. Turėtų būti naudojamos monokultūros be pastebimų užkrėtimo kitais organizmais, kaip antai dumbliais ir pirmuonimis, požymių. Sveiki *L. minor* rūšies augalai sudaro 2–5 gniužulų kolonijas, o sveikose *L. gibba* kolonijose gali būti iki 7 gniužulų.

18. Bandymo rezultatas labai priklauso nuo bandymui naudojamų augalų kokybės ir vienodumo, todėl reikėtų kruopščiai atrinkti augalus. Turėtų būti naudojami jauni, sparčiai augantys augalai be matomų pažeidimų ar spalvos pakitimų (chlorozės). Aukštos kokybės kultūrų požymis – daug kolonijų, kuriose yra bent po du gniužulus. Vieno gniužulo kolonijų gausa yra aplinkos sukelto streso, pvz., mitybinių medžiagų trūkumo, požymis, todėl tokių kultūrų augalų medžiagos bandymams naudoti nereikėtų.

Auginimas

19. Kad augalų kultūroms reikėtų mažiau priežiūros (pvz., jei kurį laiką neketinama atlikti bandymų su *Lemna*), jas galima laikyti prietemoje ir žemesnėje (4–10 °C) temperatūroje. Kultūrų auginimas išsamiai aprašytas 3 priedėlyje. Kai yra akivaizdžių užkrėtimo dumbliais ar kitais organizmais požymių, gali reikėti paimti dalinį *Lemna* gniužulų ėminį, atlikti paviršinį sterilizavimą ir perkelti jį į šviežią terpę (žr. 3 priedėlį). Tokiu atveju likusią užkrėstą kultūrą reikėtų pašalinti.

20. Iki bandymo likus bent septynioms paroms, pakankamai kolonijų steriliu būdu perkeliama į šviežią sterilią terpę, kurioje kultūra 7–10 parų auginama bandymo sąlygomis.

Bandymo terpė

21. *Lemna minor* ir *Lemna gibba* rekomenduojama naudoti skirtingas terpes, kaip aprašyta toliau. Reikėtų kruopščiai apsvarstyti pH reguliuoti skirto buferinio tirpalo (MOPS (4-morfolinpropansulfonrūgšties, CAS Nr. 1132-61-2) – *L. minor* terpėje, $NaHCO_3$ – *L. gibba* terpėje) naudojimą bandymo terpėje, jeigu įtariama, kad jis gali reaguoti su bandomąja chemine medžiaga ir paveikti jos toksiškumo savybes. Be to, galima naudoti Steinbergo terpę (9), jei ji atitinka bandymo tinkamumo kriterijus.

▼M6

22. *L. minor* rūšies kultūrų auginimui ir bandymams rekomenduojama naudoti modifikuotą *Lemna* auginimo terpę pagal Švedijos standartą (SIS). Šios terpės sudėtis aprašyta 4 priedėlyje.

23. *L. gibba* rūšies kultūrų auginimui ir bandymams rekomenduojama naudoti 20X-AAP auginimo terpę, kaip aprašyta 4 priedėlyje.

24. 4 priedėlyje aprašyta Steinbergo terpė taip pat tinka *L. minor*, tačiau ją galima naudoti ir *L. gibba* auginti, jei tai atitinka bandymo tinkamumo kriterijus.

Bandymo tirpalai

25. Bandymo tirpalai paprastai ruošiami atskiedžiant pradinį tirpalą. Bandomosios cheminės medžiagos pradiniai tirpalai paprastai ruošiami ištirpinant cheminę medžiagą augalų auginimo terpėje.

26. Didžiausia bandymui pasirinkta bandomosios cheminės medžiagos koncentracija paprastai neturėtų viršyti tos cheminės medžiagos tirpumo vandenyje ribos bandymo sąlygomis, tačiau pažymėtina, kad *Lemna* spp. genties augalai plūduriuoja vandens paviršiuje ir gali būti veikiami cheminių medžiagų, besikaupiančių ties vandens ir oro riba (tai, pvz., vandenyje mažai tirpios, hidrofobinės arba paviršinio aktyvumo cheminės medžiagos). Tokiomis sąlygomis augalai patirtų ne tirpale esančių, o kitų medžiagų poveikį, ir bandymo koncentracijos, priklausomai nuo bandomosios cheminės medžiagos savybių, gali viršyti tos medžiagos tirpumo vandenyje lygį. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga yra mažai tirpi vandenyje, gali reikėti paruošti koncentruotą jos pradinį tirpalą arba dispersinę terpę naudojant organinį tirpiklį arba dispergentą, kad būtų lengviau į bandymo terpę įdėti tikslius bandomosios cheminės medžiagos kiekius, ir siekiant palengvinti jos dispergavimą bei tirpimą. Kiek įmanoma, tokių medžiagų reikėtų vengti – bandomieji augalai neturėtų patirti fitotoksinio poveikio dėl naudojamų pagalbinių tirpiklių ar dispergentų. Įprastų tirpiklių, kurie nėra fitotoksiški, kol jų koncentracija neviršija 100 µl/l, pavyzdžiai yra acetonas ir dimetilformamidas. Jeigu naudojamas tirpiklis arba dispergentas, jo galutinė koncentracija turėtų būti nurodyta ataskaitoje ir kuo mažesnė (≤ 100 µl/l), be to, tirpiklio arba dispergento koncentracija turėtų būti vienoda visuose bandomosios ir kontrolinės grupių bandiniuose. Daugiau gairių, kaip naudoti dispergentus, pateikta literatūroje (8).

Bandomosios ir kontrolinės grupės

27. Turint išankstinių žinių apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą *Lemna*, pvz., atlikus intervalo nustatymo bandymą, bus lengviau pasirinkti bandymui tinkamas jos koncentracijas. Nustatomajam toksiškumo bandymui paprastai reikėtų pasirinkti bent penkias bandomosios medžiagos koncentracijos vertes geometrinės progresijos seka. Patartina, kad gretimos bandymui pasirinktos koncentracijos vertės skirtųsi ne daugiau nei 3,2 karto, tačiau skirtumas gali būti ir didesnis, jei koncentracijos ir atsako kreivė yra gulsčia. Mažiau nei penkių koncentracijų naudojimą reikėtų pagrįsti. Reikėtų paruošti bent po tris kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotinius bandinius.

28. Nustatant bandymo koncentracijos verčių intervalą (atliekant intervalo nustatymo ir (arba) toksiškumo nustatomąjį bandymą) reikėtų atsižvelgti į šiuos dalykus:

— siekiant užtikrinti tinkamą pasikliautinąjį lygmenį, nustatoma EC_x vertė turėtų patekti į bandymui pasirinktų koncentracijos verčių intervalą; pavyzdžiui, vertinant EC_{50}, didžiausia bandymo koncentracijos vertė turėtų viršyti EC_{50} vertę. Jeigu EC_{50} vertė nepateks į bandymo koncentracijos verčių intervalą, atitinkami pasikliautinieji intervalai bus dideli ir gali būti neįmanoma tinkamai įvertinti statistinės taikomo modelio atitikties;

— jeigu siekiama įvertinti LOEC (NOEC), mažiausia pasirinkta bandomosios medžiagos koncentracija turėtų būti pakankamai maža, kad jos veikiamų augalų augimas nebūtų pastebimai lėtesnis negu kontrolinės grupės augalų, o didžiausia bandymo koncentracija turėtų būti pakankamai didelė, kad jos veikiami augalai augtų kur kas lėčiau negu kontrolinės grupės augalai. Jei taip nėra, bandymą teks pakartoti nustačius

▼M6

kitokių koncentracijų intervalą (nebent didžiausia koncentracija atitiktų tirpumo vandenyje ribą arba būtų didžiausia privaloma ribinė koncentracija, pvz., 100 mg/l).

29. Per kiekvieną bandymą turėtų būti naudojami kontroliniai bandiniai su ta pačia mitybine terpe, gniužulų bei kolonijų skaičius juose turi būti toks pats ir aplinkos sąlygos bei procedūros tokios pačios, kaip ir bandymo induose, į juos tik nededama bandomosios cheminės medžiagos. Jeigu naudojamas pagalbinis tirpiklis arba dispergentas, reikėtų paruošti papildomą kontrolinę grupę su tuo tirpikliu ar dispergentu, kurio koncentracija būtų tokia pati, kaip ir induose, į kuriuos dėta bandomosios cheminės medžiagos. Kontrolinės grupės kartotinių bandinių indų (ir, kai tinka, indų su tirpikliu) turėtų būti bent tiek pat, kiek ir kiekvienos bandymo koncentracijos indų; geriausia, kad jų būtų du kartus daugiau.

30. Jeigu nereikia nustatyti NOEC, galima pakeisti bandymo planą, padidinant koncentracijos verčių skaičių ir sumažinant kiekvienos koncentracijos kartotinių bandinių skaičių, tačiau turi būti ne mažiau kaip trys kartotiniai kontroliniai bandiniai.

Poveikis

31. Iš 2–4 matomų gniužulų sudarytos kolonijos paimamos iš sėjamos kultūros indo ir steriliomis sąlygomis atsitiktine tvarka paskirstomos bandymo induose. Kiekviename inde turėtų iš viso būti 9–12 gniužulų. Gniužulų ir kolonijų skaičius kiekviename bandymo inde turėtų būti vienodas. Iš šio metodo taikymo patirties ir tarplaboratorinio bandymo duomenų žinoma, kad trijų kartotinių kiekvienos bandomosios grupės bandinių, kurių kiekviename iš pradžių yra po 9–12 gniužulų, pakanka nustatyti augalų augimo bandomosiose grupėse skirtumams esant maždaug 4–7 % slopinimui, apskaičiuotam pagal augimo greitį (10–15 %, apskaičiuotas pagal išeigą) (7).

32. Siekiant, kiek įmanoma, sumažinti bandymo indų padėties erdvėje, šviesos stiprio ar temperatūros skirtumų įtaką, reikia atsitiktine tvarka išdėstyti bandymo indus inkubatoriuje. Be to, stebėjimus reikia atlikti „blokinės schemos“ tvarka arba atsitiktine tvarka sukeičiant indus vietomis (arba dažniau juos perkeliant į kitą vietą).

33. Jeigu atlikus išankstinį stabilumo bandymą nustatyta, kad pastovios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos per visą bandymo trukmę (7 paras) palaikyti neįmanoma (t. y. matuojamoji koncentracija nesiekia 80 % išmatuotos pradinės koncentracijos), rekomenduojama taikyti pusiau stacionariojo bandymo režimą. Šiuo atveju bandomosios ir kontrolinės grupių tirpalai, kuriuose laikomos augalų kolonijos, turėtų būti keičiami šviežiais bent dukart per bandymą (pvz., 3 ir 5 dienomis). Terpės keitimo dažnis priklauso nuo bandomosios cheminės medžiagos stabilumo; labai nestabilių arba lakių cheminių medžiagų tirpalus gali reikėti keisti dažniau, siekiant palaikyti beveik vienodas jų koncentracijas. Tam tikromis aplinkybėmis bandymą gali reikėti atlikti pagal pratekamojo srauto procedūrą (8), (10).

34. Bandomosios medžiagos poveikio per augalų lapus (purškiant) scenarijus pagal šį bandymo metodą netaikomas; vietoj to žr. (11).

Inkubavimo sąlygos

35. Turėtų būti užtikrintas nuolatinis apšvietimas šiltai arba šaltai balta liuminescencinių lempų šviesa, kurios stipris būtų 85–135 $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$ intervale, matuojant fotosintezei optimalaus spektro (400–700 nm) spinduliuotę tokiu pačiu atstumu nuo šviesos šaltinio, kokiu nuo jo yra *Lemna* gniužulai (atitikmuo liuksais yra 6 500–10 000 lx). Šviesos stipris virš bandymo vietos neturi kisti daugiau kaip ± 15 % pasirinkto šviesos stiprio intervalo. Išmatuota vertė priklausys nuo šviesos aptikimo ir matavimo metodo, ypač naudojamo jutiklio rūšies. Sferiniai jutikliai (reaguojantys į šviesą, krintančią

▼M6

visais kampais virš ir žemiau matavimo plokštumos) ir „kosinusiniai“ jutikliai (reaguojantys į šviesą, krintančią visais kampais virš matavimo plokštumos) yra tinkamesni nei vienakrypčiai jutikliai, ir jais bus gauti didesni rodmenys naudojant čia aprašyto tipo daugiataškį šviesos šaltinį.

36. Temperatūra bandymo induose turėtų būti 24 ± 2 °C. Kontrolinių bandinių terpės pH per bandymą neturėtų padidėti daugiau kaip 1,5 vieneto, tačiau net jeigu nuokrypis būtų didesnis kaip 1,5 vieneto, bandymas vis vien būtų pripažintas tinkamu, jei tik būtų galima įrodyti atitiktį tinkamumo kriterijams. Reikia imtis papildomų atsargumo priemonių dėl pH kitimo konkrečiais atvejais, pvz., atliekant nestabilių cheminių medžiagų arba metalų bandymus. Papildomų gairių dėl to pateikta literatūroje (8).

Trukmė

37. Bandymas baigiamas po 7 parų nuo augalų perkėlimo į bandymo indus.

Matavimai ir analiziniai nustatymai

38. Pradedant bandymą nustatomas ir užrašomas gniužulų skaičius bandymo induose, stengiantis įskaityti atsikišusius, aiškiai matomus gniužulus. Įprastos ir neįprastos išvaizdos gniužulų skaičių būtina nustatyti bandymo pradžioje, bent kas 3 paras bandomosios medžiagos veikimo laikotarpiu (t. y. bent du kartus per 7 paras) ir baigiant bandymą. Reikėtų aprašyti augalų vystymosi, pvz., gniužulų dydžio arba išvaizdos, pokyčius, nurodyti nekrozės požymius, chlorozę arba gumbuotumą, kolonijų smulkėjimą arba plūdrumo netekimą, šaknų ilgį ir išvaizdą. Taip pat reikėtų nurodyti svarbias bandymo terpės savybes (pvz., jeigu bandymo inde yra neištirpusios medžiagos arba auga dumbliai).

39. Per bandymą skaičiuojant gniužulus, taip pat vertinamas bandomosios cheminės medžiagos poveikis vienam (arba daugiau) iš šių matuojamų kintamųjų:

i) bendram gniužulų plotui;

ii) sausos medžiagos masei;

iii) šviežios medžiagos masei.

40. Bendras gniužulų plotas yra pranašesnis už kitus kintamuosius tuo, kad jį galima nustatyti kiekviename bandomosios ir kontrolinės grupių inde bandymo pradžioje, eigoje ir pabaigoje. Sausos arba šviežios medžiagos masė turėtų būti nustatoma bandymo pradžioje paimant sėjamos kultūros, naudojamos pradedant bandymą, pavyzdį ir bandymo pabaigoje paimant augalų medžiagos pavyzdžius iš kiekvieno bandomosios ir kontrolinės grupių indo. Jei gniužulų plotas nematuojamas, geriau matuoti ne šviežios, o sausos medžiagos masę.

41. Bendrą gniužulų plotą, sausos medžiagos masę ir šviežios medžiagos masę galima nustatyti toliau aprašyta tvarka.

i) *Bendras gniužulų plotas*. Visų kolonijų gniužulų bendras plotas gali būti nustatomas išanalizuojant jų vaizdą. Galima užfiksuoti bandymo indo ir jame esančių augalų siluetą vaizdo kamera (t. y. pastačius indą ant šviesdėžės) ir gautą vaizdą apdoroti skaitmeniniu būdu, o tada kalibruojant pagal plokščius žinomo ploto vaizdus galima nustatyti bendrą gniužulų plotą. Dėl indo krašto atsiradusius trukdžius reikėtų pašalinti. Pagal kitą metodą (kurį taikant reikia įdėti daugiau darbo) padaroma bandymo indų ir juose esančių augalų fotokopija, gautas kolonijų siluetas iškerpamas ir jų plotas nustatomas naudojant lapų ploto analizatorių arba milimetrinį popierių. Gali tikti ir kiti metodai (pvz., kolonijų silueto ploto ir vienetinio ploto popieriaus masės santykio nustatymas).

▼M6

ii) *Sausos medžiagos masė.* Visos kolonijos surenkamos iš kiekvieno bandymo indo ir nuplaunamos distiliuotu arba dejonizuotu vandeniu. Pašalinus vandens perteklių sugeriamuoju popieriumi, kolonijos, įskaitant visus šaknų likučius, išdžiovinamos 60 °C temperatūroje iki pastovios masės. Sausos medžiagos masė turėtų būti nustatoma bent 0,1 mg tikslumu.

iii) *Šviežios medžiagos masė.* Visos kolonijos surenkamos į iš anksto pasvertus polistireno (arba kitos inertinės medžiagos) mėgintuvėlius su išgaubtais dugnais, kuriuose yra mažų (1 mm skersmens) skylučių. Tada mėgintuvėliai 10 min. centrifuguojami 3 000 sūkių/min. greičiu, palaikant kambario temperatūrą. Mėgintuvėliai su nusausintomis kolonijomis pasveriami iš naujo ir šviežios medžiagos masė apskaičiuojama atimant tuščio mėgintuvėlio masę.

Matavimų ir analizinių nustatymų dažnis

42. Pagal stacionariojo bandymo planą kiekvieno bandomosios grupės indo pH vertė turėtų būti išmatuota pradedant ir baigiant bandymą. Pagal pusiau stacionariojo bandymo planą reikėtų išmatuoti kiekvienos šviežio bandymo tirpalo partijos pH vertę kaskart prieš atnaujinant tirpalą ir panaudotų keičiamų tirpalų pH vertę.

43. Šviesos stipris turėtų būti matuojamas tose auginimo kameros, inkubatoriaus arba patalpos vietose, kurios nuo šviesos šaltinio yra nutolusios tokiu pačiu atstumu, kaip ir *Lemna* gniužulai. Matavimai bandymo metu turėtų būti atliekami bent kartą. Reikėtų bent kartą per dieną užrašyti terpės temperatūrą pakaitiniame inde, kuris tokioms pačiomis sąlygomis laikomas auginimo kameroje, inkubatoriuje arba atitinkamoje patalpoje.

44. Per bandymą tinkamais laiko intervalais nustatomos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos. Atliekant stacionariuosius bandymus, būtina nustatyti koncentracijas pradedant ir baigiant bandymą.

45. Atliekant pusiau stacionariuosius bandymus, kai nesitikima, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentracija išliks vardinės koncentracijos ± 20 % intervalo ribose, būtina išanalizuoti visus naujai paruoštus bandymo tirpalus ir tuos pačius tirpalus kaskart, kai jie atnaujinami (žr. 33 skirsnį). Tačiau kai per bandymą išmatuota pradinė bandomosios cheminės medžiagos koncentracija nepatenka į vardinės koncentracijos ± 20 % intervalą, bet galima pakankamais įrodymais pagrįsti, kad pradinės koncentracijos yra pakartojamos ir pastovios (t. y. patenka į 80–120 % pradinės koncentracijos intervalą), galima atlikti tik didžiausios ir mažiausios bandymo koncentracijų cheminę analizę. Visais atvejais bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas iki tirpalo atnaujinimo tereikia nustatyti viename kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotinio bandinio inde (arba analizuojant sujungiamas kartotinių indų turinys).

46. Atliekant pratekamojo srauto bandymą tinka analizuoti ėminius tokia pačia tvarka, kaip ir per pirmiau aprašytus pusiau stacionarius bandymus, įskaitant analizę bandymo pradžioje, viduryje ir pabaigoje, tačiau šiuo atveju nereikia atlikti panaudotų tirpalų matavimų. Per šio pobūdžio bandymus skiediklio ir bandomosios cheminės medžiagos arba bandomosios cheminės medžiagos pradinio tirpalo srautas turėtų būti tikrinamas kasdien.

47. Jeigu įrodyta, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją per visą bandymą pavyko išlaikyti nepakitusią daugiau kaip ± 20 % vardinės arba išmatuotos pradinės koncentracijos vertės, rezultatus galima analizuoti remiantis vardinėmis arba išmatuotomis pradinėmis vertėmis. Tačiau jeigu nuo vardinės arba išmatuotos pradinės koncentracijos nukrypta daugiau kaip ± 20 %, rezultatus reikėtų analizuoti remiantis bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio geometrinio vidurkio koncentracija arba taikant modelius bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos mažėjimui apibūdinti (8).

▼M6

Ribų nustatymo bandymas

48. Tam tikromis aplinkybėmis, pvz., jeigu išankstinis bandymas parodo, kad bandomoji cheminė medžiaga neturi toksinio poveikio, kol jos koncentracija nesiekia 100 mg/l arba tirpumo bandymo terpėje ribos (mažesnės iš šių verčių), galima atlikti ribų nustatymo bandymą, palyginant kontrolinės grupės ir vienos bandomosios (100 mg/l arba tirpumo ribinei vertei lygios koncentracijos) grupės atsaką į poveikį. Taip gautus rezultatus labai patartina patvirtinti atliekant efektyviosios koncentracijos analizę. Ribų nustatymo bandymas turi atitikti visas pirmiau aprašytas bandymo sąlygas ir tinkamumo kriterijus, tačiau kartotinių bandinių su bandomąja medžiaga turėtų būti dukart daugiau. Kontrolinės ir bandomosios grupių augalų augimą galima analizuoti taikant statistinį kriterijų vidurkiams palyginti, pvz., Stjudento *t* kriterijų.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Dvigubėjimo trukmė

49. Siekiant nustatyti gniužulų skaičiaus dvigubėjimo trukmę (T_d) ir ar tyrimas atitinka šį tinkamumo kriterijų (12 skirsnis), gautiems kontrolinių indų duomenims taikoma ši formulė:

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

kurioje μ yra vidutinis savitasis augimo greitis, nustatytas 54–55 skirsniuose aprašyta tvarka.

Atsako kintamieji

50. Šio bandymo tikslas – nustatyti bandomosios cheminės medžiagos poveikį *Lemna* genties augalų vegetatyviniam augimui. Pagal šį bandymo metodą apibūdinami du atsako kintamieji, nes įvairiose jurisdikcijose skiriasi prioritetai ir norminiai reikalavimai. Siekiant, kad bandymo rezultatai būtų priimtini visose jurisdikcijose, poveikį reikėtų vertinti taikant abu toliau aprašytus atsako kintamuosius *a* ir *b*:

a) vidutinis savitasis augimo greitis. Šis atsako kintamasis apskaičiuojamas pagal kontrolinių bandinių ir kiekvienos bandomosios grupės gniužulų skaičiaus logaritmų pokyčius ir, papildomai, kito matuojamo parametro (bendro gniužulų ploto, sausos medžiagos masės arba šviežios medžiagos masės) logaritmų pokyčius per laiko tarpą (išreiškiamą para). Jis kartais vadinamas santykiniu augimo greičiu (12);

b) išeiga – šis atsako kintamasis apskaičiuojamas pagal kontrolinių bandinių ir kiekvienos bandomosios grupės gniužulų skaičiaus pokyčius ir, papildomai, kito matuojamo parametro (bendro gniužulų ploto, sausos medžiagos masės arba šviežios medžiagos masės) pokyčius iki bandymo pabaigos.

51. Pažymėtina, kad taikant šiuos du atsako kintamuosius apskaičiuotos toksiškumo vertės nėra lygintinos tarpusavyje ir jų skirtumą būtina pripažinti naudojant bandymo rezultatus. Turint omenyje atitinkamų metodų matematinį pagrindą, jei laikomasi bandymo pagal šį metodą sąlygų, pagal vidutinį savitąjį augimo greitį nustatytos EC_x vertės (E_rC_x) paprastai yra didesnės negu išeiga pagrįsti rezultatai (E_yC_x). To nereikėtų suprasti kaip abiejų atsako kintamųjų jautrio skirtumo – tiesiog vertės skiriasi matematiškai. Vidutinio savitojo augimo greičio sąvoka apibrėžiama remiantis bendrąja eksponentinio plūdenų augimo nevaržomose kultūrose schema, kurią taikant toksiškumas vertinamas pagal poveikį augimo greičiui, nepriklausomai nuo kontrolinės kultūros absoliučiojo savitojo augimo greičio, koncentracijos ir atsako kreivės krypties koeficiento ar bandymo trukmės. Kitu atsako kintamuoju – išeiga – pagrįsti rezultatai, priešingai, priklauso nuo visų šių kitų kintamųjų. E_yC_x vertė priklauso nuo kiekvienam bandymui naudojamos plūdenų rūšies savitojo augimo greičio ir nuo didžiausio savitojo augimo greičio, kuris įvairių rūšių ar net atskirų klonų gali būti skirtingas. Šio atsako kintamojo nereikėtų naudoti lyginant kelių plūdenų rūšių ar net atskirų klonų jautrį nuodingosioms medžiagoms. Nors toksiškumui vertinti moksliniu požiūriu labiau tinka vidutinis savitasis augimo greitis, pagal šį bandymo

▼M6

metodą numatyta naudoti ir išeiga pagrįstus toksiškumo įverčius, kurie yra privalomi pagal kai kuriose jurisdikcijose galiojančių norminių teisės aktų reikalavimus.

52. Toksiškumo įverčiai turėtų būti nustatomi pagal gniužulų skaičių ir vieną papildomą matuojamą kintamąjį (bendrą gniužulų plotą, sausos medžiagos masę arba šviežios medžiagos masę), nes kai kurios cheminės medžiagos gali paveikti kitus matuojamus kintamuosius kur kas labiau nei gniužulų skaičių, o skaičiuojant tik gniužulus šis poveikis nebūtų nustatytas.

53. Gniužulų skaičius ir visi kiti užrašyti matuojami kintamieji, t. y. bendras gniužulų plotas, sausos medžiagos masė arba šviežios medžiagos masė, surašomi į lenteles kartu su per kiekvieną matavimą nustatytomis bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertėmis. Vėliau analizuojant duomenis, pvz., siekiant nustatyti LOEC, NOEC arba EC_x įvertį, reikėtų remtis atskirų kartotinių bandinių vertėmis, o ne apskaičiuotais kiekvienos bandomosios grupės vidurkiais.

Vidutinis savitasis augimo greitis

54. Vidutinis savitasis augimo greitis tam tikru laikotarpiu kiekviename kontrolinės grupės ir bandomųjų grupių kartotiniame bandinyje apskaičiuojamas kaip augimo kintamųjų – gniužulų skaičiaus ir vieno kito matuojamo kintamojo (bendro gniužulų ploto, sausos medžiagos masės arba šviežios medžiagos masės) – logaritminis didėjimas pagal formulę

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

kurioje:

— μ_{i-j} vidutinis savitasis augimo greitis per laiko tarpą *i–j*;

— N_i bandymo arba kontroliniame inde *i* laiku išmatuotas kintamasis;

— N_j bandymo arba kontroliniame inde *j* laiku išmatuotas kintamasis;

— t laiko tarpas nuo *i* iki *j*.

Apskaičiuojama kiekvienos bandomosios ir kontrolinės grupės augimo greičio vidutinė vertė ir dispersijos įverčiai.

55. Reikėtų apskaičiuoti viso bandymo laikotarpio (pateiktoje formulėje *i* laikas yra bandymo pradžia, *j* laikas – bandymo pabaiga) vidutinį savitąjį augimo greitį. Apskaičiuokite kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos ir kontrolinės grupės vidutinio savitojo augimo greičio vidutinę vertę kartu su dispersijos įverčiais. Be to, reikėtų įvertinti augimo greitį atskirais laiko tarpais, siekiant įvertinti bandomosios cheminės medžiagos poveikį jos veikimo laikotarpiu (pvz., nagrinėjant logaritmuotas augimo kreives). Jeigu tokie nustatyti augimo greičiai atskirais laiko tarpais reikšmingai skiriasi nuo vidutinio augimo greičio, tai rodo nuokrypį nuo tolygaus eksponentinio augimo ir reikia nuodugniai ištirti augimo kreives. Šiuo atveju taikytinas konservatyvus metodas būtų bandomųjų kultūrų savitojo augimo greičio didžiausio slopinimo laikotarpiu ir kontrolinių bandinių savitojo augimo greičio tuo pačiu laikotarpiu palyginimas.

56. Tada galima apskaičiuoti kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos (bandomosios grupės) augimo greičio slopinimo lygį procentais (I_r) pagal formulę

▼M6

$$\%\ I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

kurioje:

— % I_r – vidutinio savitojo augimo greičio slopinimo procentinis lygis;

— μ_C – kontrolinės grupės vidutinė μ vertė;

— μ_T – bandomosios grupės vidutinė μ vertė.

Išeiga

57. Poveikis išeigai nustatomas pagal du matuojamus kintamuosius – gniužulų skaičių ir vieną kitą matuojamą kintamąjį (bendrą gniužulų plotą, sausos medžiagos masę arba šviežios medžiagos masę) – kiekviename bandymo inde pradedant ir baigiant bandymą. Matuojant sausos arba šviežios medžiagos masę, pradinė biomasė nustatoma paėmus gniužulų ėminį iš tos pačios paruoštos kultūros, kuri pasėta į bandymo indus, partijos (žr. 20 skirsnį). Apskaičiuokite kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos ir kontrolinės grupės išeigos vidutinę vertę kartu su dispersijos įverčiais. Kiekvienos bandomosios grupės išeigos vidutinį sumažėjimą procentais (% I_y) galima apskaičiuoti pagal formulę

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

kurioje:

— % I_y – išeigos sumažėjimas procentais;

— b_C – kontrolinės grupės galutinės ir pradinės biomasės skirtumas;

— b_T – bandomosios grupės galutinės ir pradinės biomasės skirtumas.

Koncentracijos ir atsako kreivių braižymas

58. Reikėtų nubrėžti koncentracijos ir atsako kreives, susiejant pasirinkto atsako kintamojo slopinimo vidutinį lygį procentais (apskaičiuotą I_r, arba I_y, kaip parodyta 56 arba 57 skirsnyje) su bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos logaritmu.

EC_x vertinimas

59. EC_x įverčiai (pvz., EC_{50}) turėtų būti nustatomi tiek pagal vidutinį savitąjį augimo greitį (E_rC_x), tiek pagal išeigą (E_yC_x), nustatytus pagal gniužulų skaičių ir vieną papildomą matuojamą kintamąjį (bendrą gniužulų plotą, sausos medžiagos masę arba šviežios medžiagos masę. Tai daroma dėl tos priežasties, kad kai kurios bandomosios cheminės medžiagos nevienodai veikia gniužulų skaičių ir kitus matuojamus kintamuosius. Todėl reikiami toksiškumo parametrai yra pagal kiekvieną slopinimo lygį *x* apskaičiuojamos keturios EC_x vertės: E_rC_x (gniužulų skaičius), E_rC_x (bendras gniužulų plotas, sausos medžiagos masė arba šviežios medžiagos masė), E_yC_x (gniužulų skaičius) ir E_yC_x (bendras gniužulų plotas, sausos medžiagos masė arba šviežios medžiagos masė).

Statistinės procedūros

60. Tikslas yra nustatyti kiekybinį koncentracijos ir atsako santykį atliekant regresinę analizę. Galima taikyti svertinę tiesinę regresiją atlikus atsako duomenų tiesinamąjį transformavimą, pvz., į probito, logito arba Weibull vienetus (13), tačiau geriau atlikti procedūras netiesinės regresijos metodais, per kurias geriau apdorojami neišvengiami duomenų neatitikimai ir nukrypimai nuo glodžiųjų skirstinių. Artėjant prie nulinio arba visiško augimo slopinimo, tokie neatitikimai dėl transformavimo gali padidėti ir trukdyti analizei (13). Pažymėtina, kad standartiniai analizės metodai taikant probito, logito arba Weibull transformuotus dydžius yra skirti dvireikšmiams (pvz.,

▼M6

mirtingumo arba išgyvenimo) kintamiesiems, todėl norint juos naudoti augimo greičio ar išeigos duomenims, būtina juos atitinkamai pritaikyti. Konkrečios EC_x verčių nustatymo iš tolydžiųjų duomenų procedūros aprašytos literatūroje (14), (15), (16).

61. Analizuodami kiekvieną atsako kintamąjį, remdamiesi koncentracijos ir atsako santykiu, apskaičiuokite EC_x verčių taškinius įverčius. Kai įmanoma, reikėtų nustatyti kiekvieno įverčio 95 % pasikliovimo ribas. Reikėtų pagal grafiką arba statistiškai įvertinti atsako duomenų atitiktį regresijos modeliui. Regresinė analizė turėtų būti atliekama naudojant atskirų kartotinių bandinių atsakus, o ne visos bandomosios grupės vidutines vertes.

62. Be to, jeigu esami regresijos modeliai ir (arba) metodai netinka turimiems duomenims, EC_{50} įverčius ir pasikliovimo ribas taip pat galima gauti atliekant tiesinę interpoliaciją su saviranka (angl. *bootstrapping*) (17).

63. Siekiant įvertinti LOEC, taigi ir NOEC, būtina palyginti bandomosios grupės vidutines vertes taikant dispersinės analizės (ANOVA) metodus. Taip gautą kiekvienos koncentracijos grupės vidurkį reikia palyginti su kontrolinės grupės vidurkiu taikant tinkamą kartotinių palyginimų arba trendo kriterijaus metodą. Gali būti naudinga taikyti Dunnett arba Williams kriterijų (18), (19), (20), (21). Būtina įvertinti, ar tinka ANOVA dispersijos vienalytiškumo prielaida. Šį vertinimą galima atlikti naudojant grafiką arba taikant formalųjį kriterijų (22). Tinka taikyti Levene arba Bartlett kriterijus. Jeigu netinka dispersijų vienalytiškumo prielaida, kartais galima tai pataisyti logaritmine duomenų transformacija. Jei dispersija yra itin nevienalytė ir to neįmanoma pataisyti transformuojant duomenis, reikėtų apsvarstyti galimybę atlikti analizę kitais metodais, pvz., taikant žingsnio žemyn Jonkheere trendo kriterijus. Papildomų gairių, kaip nustatyti NOEC, pateikta literatūroje (16).

64. Atsižvelgiant į naujus mokslo pasiekimus, rekomenduojama atsisakyti NOEC sąvokos ir vietoj jos naudoti regresija pagrįstus EC_x taškinius įverčius. Pagal šį *Lemna* bandymo metodą tinkama *x* vertė nenustatyta, tačiau atrodo, kad tinka į 10–20 % intervalą patenkanti vertė (kuri priklauso nuo pasirinkto atsako kintamojo). Ataskaitoje geriausia nurodyti abi (EC_{10} ir EC_{20}) vertes.

Ataskaitos rengimas

65. Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta toliau nurodyta informacija.

Bandomoji cheminė medžiaga

— Medžiagos fizikinė prigimtis ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės, įskaitant tirpumo vandenyje ribą.

— Cheminės medžiagos atpažinties duomenys (pvz., CAS numeris), įskaitant grynumą (priemaišas).

Bandomosios rūšys

— Mokslinis pavadinimas, klonas (jei žinomas) ir šaltinis.

Bandymo sąlygos

— Pasirinkta bandymo procedūra (stacionarusis, pusiau stacionarusis ar pratekamojo srauto bandymas).

— Bandymo pradžios data ir trukmė.

— Bandymo terpė.

— Bandymo plano aprašymas: naudoti bandymo indai ir dangčiai, tirpalų tūris, bandymo pradžioje kiekviename bandymo inde buvusių kolonijų ir gniužulų skaičius.

— Bandymui pasirinktos koncentracijos vertės (vardinės ir, kai tinka, išmatuotos) ir kiekvienos koncentracijos kartotinių bandinių skaičius.

▼M6

— Pradinių ir bandymo tirpalų ruošimo metodai, įskaitant bet kokių tirpiklių ar dispergentų naudojimą.

— Bandymo temperatūra.

— Apšvietimo šaltinis, šviesos stipris ir vienalytiškumas.

— Bandymo ir kontrolinės grupės terpių pH vertės.

— Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertės, analizės metodas ir atitinkami kokybės vertinimo duomenys (tinkamumo patvirtinimo tyrimai, analizės rezultatų standartiniai nuokrypiai arba pasikliovimo ribos).

— Gniužulų skaičiaus ir kitų matuojamų kintamųjų, pvz., sausos medžiagos masės, šviežios medžiagos masės arba gniužulų ploto, nustatymo metodai.

— Bet kokie nukrypimai nuo šio bandymo metodo.

Rezultatai

— Neapdoroti duomenys: gniužulų skaičius ir kiti kiekviename bandymo bei kontroliniame inde matuoti kintamieji per kiekvieną stebėjimą ir atliktą analizę.

— Kiekvieno matuojamo kintamojo vidurkis ir standartinis nuokrypis.

— Kiekvieną bandomosios medžiagos koncentraciją atitinkančios augimo kreivės (matuojamą kintamąjį patartina logaritmuoti, žr. 55 skirsnį).

— Kontrolinės grupės dvigubėjimo trukmė (augimo greitis) pagal gniužulų skaičių.

— Apskaičiuoti kiekvieno bandomosios grupės kartotinio bandinio atsako kintamieji, jų vidutinės vertės ir kartotinių bandinių variacijos koeficientas.

— Koncentracijos ir poveikio santykio grafikas.

— Toksiškumo vertinamųjų baigčių įverčiai pagal atsako kintamuosius, pvz., EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, ir atitinkami pasikliautinieji intervalai. LOEC ir (arba) NOEC vertės (jeigu apskaičiuotos) ir statistiniai metodai, pagal kuriuos jos nustatytos.

— Jei taikytas ANOVA metodas – mažiausio aptinkamo poveikio dydis (pvz., mažiausias reikšminis skirtumas).

— Bet koks bandomosiose grupėse nustatytas augimo skatinimas.

— Visi pastebėti fitotoksiškumo požymiai ir bandymo tirpalų stebėjimų duomenys.

— Rezultatų aptarimas, be kita ko, paaiškinant bet kokių nukrypimų nuo šio bandymo metodo įtaką bandymo rezultatams.

NUORODOS

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

(2) US EPA – United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96-156. 8pp.

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

(4) SSI – Swedish Standards Institute. (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

▼M6

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

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

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

(8) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

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

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

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

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

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

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

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

(16) OECD. (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

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

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

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

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

(21) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 519-531.

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

▼M6

1 priedėlis

Sąvokų apibrėžtys

Toliau pateiktos taikant šį bandymo metodą vartojamų sąvokų apibrėžtys ir santrumpos.

Biomasė – gyvų organizmų populiacijoje esančios sausosios medžiagos masė. Per šį bandymą vietoj biomasės paprastai matuojami pakaitiniai parametrai, kaip antai gniužulų skaičius arba gniužulų plotas, taigi biomasės sąvoka apima ir šiuos pakaitinius matavimo vienetus.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Chlorozė – augalo gniužulo audinio pageltimas.

Klonas – organizmas arba ląstelė, gauta iš vieno individo nelytinio dauginimosi būdu, todėl to iš paties klono išsivystę individai yra genetiškai tapatūs.

Kolonija – sujungtų motininių ir dukterinių gniužulų (paprastai 2–4) sankaupa, kartais vadinama augalu.

EC_x – bandymo terpėje ištirpusios bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant *Lemna* augimas per nustatytą bandomosios medžiagos veikimo laikotarpį (kuris, jeigu skiriasi nuo visos arba įprastos bandymo trukmės, turi būti tiksliai nurodytas) sumažėja x % (pvz., 50 %). Pagal augimo greitį arba išeigą nustatytai EC vertei vienareikšmiškai žymėti vartojami simboliai „E_rC“ (augimo greičio) ir „E_yC“ (išeigos), kartu nurodant naudotą matuojamą kintamąjį, pvz., E_rC (gniužulų skaičius).

Pratekamojo srauto bandymas – bandymas, kurį atliekant bandymo tirpalai nuolat keičiami.

Gniužulas – atskira (pavienė) plūdenos augalo „lapo formos“ struktūra. Tai mažiausiais gebantis daugintis vienetas, t. y. individas.

Gumbuotumas reiškia gumbuotų arba išsipūtusių gniužulų išvaizdą.

Augimas – matuojamo kintamojo, pvz., gniužulų skaičiaus, sausos medžiagos masės, šviežios medžiagos masės arba gniužulų ploto, didėjimas bandymo laikotarpiu.

Augimo greitis (vidutinis savitasis augimo greitis) – logaritminis biomasės didėjimas bandomosios medžiagos veikimo laikotarpiu.

Mažiausia pastebėto poveikio koncentracija (LOEC) – mažiausia bandymui pasirinkta koncentracija, kuriai esant pastebimas statistiškai reikšmingas cheminės medžiagos slopinamasis poveikis bandomųjų organizmų augimui (kai $p < 0,05$), palyginti su kontroliniais bandiniais, per nustatytą tos medžiagos veikimo laikotarpį; tačiau visų LOEC viršijančių bandymo koncentracijos verčių kenksmingas poveikis turi būti lygus LOEC poveikiui arba didesnis. Kai šios dvi sąlygos netenkinamos, būtina išsamiai paaiškinti, kaip pasirinkta LOEC (taigi ir NOEC) vertė.

Matuojami kintamieji – visų rūšių kintamieji, matuojami bandymo vertinamajai baigčiai išreikšti naudojant vieną arba daugiau skirtingų atsako kintamųjų. Pagal šį metodą matuojami kintamieji yra gniužulų skaičius, gniužulų plotas, šviežios medžiagos masė ir sausos medžiagos masė.

Monokultūra – vienos rūšies augalų kultūra.

Nekrozė – žuvęs (t. y. pabalęs arba vandens prisisunkęs) gniužulo audinys.

Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) – bandymui pasirinkta koncentracija, kuri yra tik truputį mažesnė negu LOEC koncentracija.

Fenotipas – pastebimos organizmo savybės, kurias lemia jo genų sąveika su aplinka.

Atsako kintamieji – toksiškumui vertinti naudojami kintamieji, gauti pagal bet kurį iš matuojamų kintamųjų, kuriais apibūdinama biomasė taikant skirtingus apskaičiavimo metodus. Pagal šį bandymo metodą iš matuojamų kintamųjų gaunami atsako kintamieji yra gniužulų skaičius, gniužulų plotas, šviežios medžiagos masė arba sausos medžiagos masė.

▼M6

Pusiau stacionarusis (atnaujinamasis) bandymas – bandymas, kurį atliekant bandymo tirpalas kas kiek laiko reguliariai keičiamas.

Stacionarusis bandymas – bandymo metodas, pagal kurį bandymo tirpalas per bandymą neatnaujinamas.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

Bandymo vertinamąja baigtimi vadinamas bendrasis parametras, kurio pokytį siekiama nustatyti per bandymą veikiant bandomajai cheminei medžiagai, palyginti su kontroline grupe. Bandymo vertinamoji baigtis pagal šį bandymo metodą yra bandomųjų augalų augimo slopinimas, kurį galima išreikšti įvairiais atsako kintamaisiais, nustatytais pagal vieną arba daugiau matuojamųjų kintamųjų.

Bandymo terpė – visiškai paruošta sintetinė auginimo terpė, kurioje per bandymą auginami bandomosios cheminės medžiagos veikiami augalai. Bandomoji cheminė medžiaga paprastai ištirpinama bandymo terpėje.

Išeiga – matuojamo kintamojo verčių bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pabaigoje ir pradžioje skirtumas, kuriuo išreiškiamas biomasės pokytis.

▼M6

2 priedėlis

Lemna spp. apibūdinimas

Lemna spp., vandens augalas, įprastai vadinamas plūdena, priklauso *Lemnaceae* šeimai, kurioje yra kelios visame pasaulyje paplitusios rūšys, priskiriamos keturioms gentims. Skirtinga jų išvaizda ir sistematika išsamiai aprašytos literatūroje (1), (2). Rūšys *Lemna gibba* ir *L. minor* yra būdingos vidutinio klimato zonoms ir dažnai naudojamos toksiškumo bandymams. Abiejų rūšių augalai turi plūduriuojantį arba panirusį disko formos kamieną (gniužulą) ir iš kiekvieno gniužulo apatinės dalies vidurio auga labai plona šaknis. *Lemna* spp. žydi retai, augalai dauginasi vegetatyviniu būdu sudarydami naujus gniužulus (3). Jaunesni augalai yra šviesesni nei seni augalai, turi trumpesnes šaknis ir susideda iš dviejų arba trijų skirtingo dydžio gniužulų. Smulkūs, nesudėtingos sandaros, nelytiniu būdu besidauginantys ir trumpos generacijos *Lemna* augalai labai tinka laboratoriniams bandymams (4), (5).

Kadangi įvairių rūšių jautris gali skirtis, lyginti galima tik vienos rūšies augalų jautrį.

Toliau pateikti bandymams naudojamų *Lemna* rūšių pavyzdžiai (rūšys ir nuorodos):

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 (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96-156. (p. 8).

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

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. (p. 15; švedų k.).

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

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

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 rūšių šaltiniai:

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Tel. +1-416-978-3641
Faks.+1-416-978-5878
El. paštas: jacreman@botany.utoronto.ca

▼**M6**

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

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
STOCKHOLM
SWEDEN
Tel. +46 8 674 7240
Faks. +46 8 674 7636

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

NUORODOS

(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.

▼M6

3 priedėlis

Pradinės kultūros priežiūra

Pradines kultūras galima ilgesnį laiką laikyti žemesnėje (4–10 °C) temperatūroje, tokiu atveju jų nereikia rekultivuoti. *Lemna* auginimo terpė gali būti tokia pati, kokia naudojama bandymui, tačiau pradinėms kultūroms galima naudoti ir kitokias pakankamai mitybinių medžiagų turinčias terpes.

Tam tikras jaunų, šviesiai žalių augalų skaičius reguliariai steriliomis sąlygomis perkeliamas į naujai kultūrai skirtus indus su nauja terpe. Jeigu, kaip pasiūlyta, augalai laikomi vėsesnėmis sąlygomis, persėti galima rečiausiai kas tris mėnesius.

Kultūroms auginti turėtų būti naudojami chemiškai švarūs (rūgštimi išplauti) ir sterilūs stikliniai indai ir taikomi sterilaus tvarkymo metodai. Jei pradinė kultūra užkrečiama, pvz., dumbliais arba grybeliais, būtina imtis priemonių užkrato organizmams pašalinti. Jei tai dumbliai ar dauguma kitų užkrečiamųjų organizmų, galima atlikti paviršinį sterilizavimą: paimamas užkrėstos augalų medžiagos ėminys ir nupjaunamos šaknys, tada augalų medžiaga įdedama į indą su švariu vandeniu ir stipriai sukratoma, po to kurį laiką (nuo 30 sekundžių iki 5 min.) laikoma įmerkta į 0,5 % (tūrinių procentų) natrio hipochlorito tirpalą. Tada augalų medžiaga praskalaujama steriliu vandeniu, išskirstoma į kelias dalis ir įdedama į kultūrai auginti skirtus indus su šviežia auginimo terpe. Po tokio apdorojimo, ypač apdorojant ilgesnį laiką, daug gniužulų žūsta, tačiau tam tikra likusių augalų dalis paprastai nebeturi užkrato ir juos galima naudoti naujoms kultūroms sėti.

▼M6

4 priedėlis

Terpės

L. minor ir *L. gibba* auginti rekomenduojamos skirtingos terpės. *L. minor* rekomenduojama naudoti modifikuotą terpę pagal Švedijos standartą (SIS), o *L. gibba* – 20X AAP terpę. Abiejų terpių sudėtis aprašyta toliau. Šioms terpėms ruošti turėtų būti naudojamos analiziškai grynos cheminės medžiagos ir dejonizuotas vanduo.

***Lemna* auginimo terpė pagal Švedijos standartą (SIS):**

— I–V pradiniai tirpalai sterilizuojami autoklave (120 °C, 15 min.) arba membraninio filtravimo būdu (akučių dydis turėtų būti maždaug 0,2 μm);

— VI (ir, jei pasirinktas, VII) pradinis tirpalas sterilizuojamas tik membraninio filtravimo būdu; šių tirpalų autoklave apdoroti nereikėtų;

— sterilūs pradiniai tirpalai turėtų būti laikomi vėsiai ir tamsoje. Nepanaudotus I–V pradinius tirpalus reikėtų pašalinti po šešių mėnesių, o VI (ir, jei pasirinktas, VII) tirpalo laikymo trukmė – vienas mėnuo.

Pradi-nio tirpalo Nr.	Cheminė medžiaga	Koncentracija pradiniame tirpale (g/l)	Koncentracija paruoštoje terpėje (mg/·l)	Paruošta terpė	
				Elemen-tas	Koncentracija (mg/·l)
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 (buferinis tirpalas)	490	490	-	-

Vienam SIS terpės litrui paruošti į 900 ml dejonizuoto vandens įpilama:

▼M6

— 10 ml I pradinio tirpalo;

— 5 ml II pradinio tirpalo;

— 5 ml III pradinio tirpalo;

— 5 ml IV pradinio tirpalo;

— 1 ml V pradinio tirpalo;

— 5 ml VI pradinio tirpalo;

— 1 ml VII pradinio tirpalo (nebūtinai).

Pastaba. Papildomo VII pradinio tirpalo (MOPS buferinio tirpalo) gali reikėti atliekant kai kurių cheminių medžiagų bandymus (žr. 11 skirsnį).

Naudojant 0,1 mol/l ar 1 mol/l HCl arba NaOH, pH lygis patikslinamas iki 6,5 ± 0,1, ir atskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 1 litro tūrio.

20X AAP auginimo terpė

Pradiniams tirpalams ruošti naudojamas sterilus distiliuotas arba dejonizuotas vanduo.

Sterilūs pradiniai tirpalai turėtų būti laikomi vėsiai ir tamsoje. Tokiomis sąlygomis pradinius tirpalus galima laikyti bent 6–8 savaites.

20X-AAP terpei paruošiami penki pradiniai mitybinių medžiagų tirpalai (A1, A2, A3, B ir C) iš analiziškai grynų cheminių medžiagų. Ruošiant auginimo terpę, po 20 ml kiekvieno pradinio mitybinių medžiagų tirpalo įpilama į maždaug 850 ml dejonizuoto vandens. Naudojant 0,1 mol/l ar 1 mol/l HCl arba NaOH, pH lygis patikslinamas iki 7,5 ± 0,1, ir atskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 1 litro tūrio. Tada terpė perfiltruojama į sterilų indą per (maždaug) 0,2 μm dydžio akučių membraninį filtrą.

Bandymui skirtą auginimo terpę reikėtų paruošti prieš 1–2 paras iki naudojimo, kad nusistovėtų pH lygis. Prieš naudojant auginimo terpę, jos pH reikėtų patikrinti ir, jei reikia, patikslinti naudojant 0,1 mol/l ar 1 mol/l NaOH arba HCl, kaip aprašyta pirmiau.

Pradinio tirpalo Nr.	Cheminė medžiaga	Koncentracija pradiniame tirpale (g/·l) (*)	Koncentracija paruoštoje terpėje (mg/·l) (*)	Paruošta terpė	
				Elementas	Koncentracija (mg/·l) (*)
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	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2 \cdot O$	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

▼M6

Pradinio tirpalo Nr.	Cheminė medžiaga	Koncentracija pradiniame tirpale (g/·l) (*)	Koncentracija paruoštoje terpėje (mg/·l) (*)	Paruošta terpė	
				Elementas	Koncentracija (mg/·l) (*)
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Jei nenurodyta kitaip.

Pastaba. Teoriškai tinkama galutinė hidrokarbonato koncentracija (kad būtų išvengta didesnio pH reguliavimo) yra 15 mg/l, o ne 300 mg/l. Tačiau anksčiau 20X-AAP terpei ruošti, taip pat per tarplaboratorinį bandymą pagal šias gaires, naudota 300 mg/l koncentracija. (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.)

Steinbergo (STEINBERG) terpė (pagal ISO 20079)

Koncentracijos ir pradiniai tirpalai

Modifikuota Steinbergo terpė pagal standartą ISO 20079 naudojama tik *Lemna minor* (nes pagal šį standartą ją galima naudoti tik *Lemna minor*), tačiau atlikti bandymai parodė, kad gerų rezultatų galima gauti ir su *Lemna gibba*.

Terpei ruošti turėtų būti naudojamos analiziškai grynos cheminės medžiagos ir dejonizuotas vanduo.

Mitybinė terpė ruošiama iš pradinių tirpalų arba iš 10 kartų didesnės koncentracijos terpės – tai didžiausia terpės koncentracija, kuriai esant dar nesusidaro nuosėdų.

1 lentelė.

Pastovios pH vertės STEINBERG terpė (modifikuota pagal Altenburger)

Sudedamoji dalis		Mitybinė terpė	
Makroelementai	Molinė masė	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

▼**M6**

Sudedamoji dalis		Mitybinė terpė	
Mikroelementai	Molinė masė	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 dinatrio dihidratas	372,24	1 500,00	4,03

2 lentelė.

Pradiniai (makroelementų) tirpalai

1. Makroelementai (50 kartų didesnės koncentracijos)	**g/l**
1 pradinis tirpalas:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
2 pradinis tirpalas:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
3 pradinis tirpalas:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

3 lentelė.

Pradiniai (mikroelementų) tirpalai

2. Mikroelementai (1 000 kartų didesnės koncentracijos)	**mg/l**
4 pradinis tirpalas:	
H_3BO_3	120,0
5 pradinis tirpalas:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
6 pradinis tirpalas:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
7 pradinis tirpalas:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
8 pradinis tirpalas:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA dinatrio dihidratas	1 500,00

— 2 ir 3 pradinius tirpalus ir, atskirai, 4–7 pradinius tirpalus galima supilti kartu (atsižvelgiant į reikiamas koncentracijas).

▼**M6**

— Kad pradinius tirpalus būtų galima laikyti ilgesnį laiką, apdorokite juos autoklave 20 min. 121 °C temperatūroje arba steriliai perfiltruokite (per 0,2 μm dydžio akučių filtrą). Ypač patartina steriliai filtruoti (per 0,2 μm akučių filtrą) 8 pradinį tirpalą.

Galutinės koncentracijos STEINBERG (modifikuotos) terpės ruošimas:

— po 20 ml 1, 2 ir 3 pradinių tirpalų (žr. 2 lentelę) įpilama į maždaug 900 ml dejonizuoto vandens, kad nesusidarytų nuosėdų;

— įpilama po 1,0 ml 4, 5, 6, 7 ir 8 pradinių tirpalų (žr. 3 lentelę);

— pH turėtų būti 5,5 +/– 0,2 (reguliuojama įpilant minimalų NaOH tirpalo arba HCl kiekį);

— atskiedžiama vandeniu iki 1 000 ml tūrio;

— jei pradiniai tirpalai yra sterilizuoti ir paruošti naudojant tinkamą vandenį, papildomai sterilizuoti nebūtina. Jei sterilizuojama galutinė paruošta terpė, 8 pradinį tirpalą reikėtų įpilti po terpės apdorojimo autoklave (20 min., 121 °C temperatūroje).

10 kartų didesnės koncentracijos (modifikuotos) STEINBERG terpės, skirtos laikyti ilgesnį laiką, ruošimas:

— po 20 ml 1, 2 ir 3 pradinių tirpalų (žr. 2 lentelę) įpilama į maždaug 30 ml vandens, kad nesusidarytų nuosėdų;

— įpilama po 1,0 ml 4, 5, 6, 7 ir 8 pradinių tirpalų (žr. 3 lentelę). Atskiedžiama vandeniu iki 100 ml tūrio;

— jei pradiniai tirpalai yra sterilizuoti ir paruošti naudojant tinkamą vandenį, papildomai sterilizuoti nebūtina. Jei sterilizuojama galutinė paruošta terpė, 8 pradinį tirpalą reikėtų įpilti po terpės apdorojimo autoklave (20 min., 121 °C temperatūroje).

— Terpės (galutinės koncentracijos) pH vertė turėtų būti 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27. TOKSIŠKUMO BANDYMAS SU CHIRONOMIDAIS NUOSĖDOSE IR VANDENYJE, NAUDOJANT NUOSĖDAS SU ĮTERPTA BANDOMĄJA CHEMINE MEDŽIAGA

ĮVADAS

2. Šis bandymo metodas atitinka OECD bandymo gaires (TG) Nr. 218 (2004). Šiuo bandymo metodu siekiama įvertinti ilgalaikį cheminių medžiagų poveikį nuosėdose gyvenančioms gėlųjų vandenų dvisparnio vabzdžio *Chironomus* sp. lervoms. Šis bandymas grindžiamas turimais toksiškumo bandymo su *Chironomus riparius* ir *Chironomus tentans* protokolais, kurie parengti Europoje (1) (2) (3) ir Šiaurės Amerikoje (4) (5) (6) (7) (8) ir patikrinti tarplaboratorinio lyginimo bandymais (1) (6) (9). Taip pat leidžiama naudoti kitas dvisparnių vabzdžių rūšis, pvz., *Chironomus yoshimatsui* (10) (11), kurios tinkamai pagrįstos dokumentais.

2. Pasirinkus šiame bandymo metode naudojamą poveikio metodą į nuosėdas įterpiama bandomoji cheminė medžiaga. Atitinkamo poveikio scenarijaus pasirinkimas priklauso nuo numatomo bandymo taikymo. Pasirinkus bandomosios cheminės medžiagos įterpimo į nuosėdas scenarijų turi būti modeliuojami nuosėdose paprastai susikaupiantys cheminių medžiagų lygiai. Į šią poveikio sistemą įtrauktas bandomosios cheminės medžiagos įtepimas į nuosėdų—vandens bandymo sistemos nuosėdas.

3. Cheminės medžiagos, kurias būtina ištirti siekiant nustatyti jų poveikį nuosėdose gyvenantiems organizmams, paprastai šiame skyriuje išlieka ilgą laikotarpį. Nuosėdose gyvenančius organizmus galima veikti keliais būdais. Kiekvieno poveikio būdo santykinė svarba ir laikas, sugaištamas, kol taikant kiekvieną būdą užtikrinamas bendrasis toksiškas poveikis, priklauso nuo atitinkamos cheminės medžiagos fizinių ir cheminių savybių. Jei tai lengvai absorbuojamos cheminės medžiagos (pvz., kai $K_{ow} > 5$) ar kovalentiniais saitais su nuosėdomis susijusios cheminės medžiagos, užteršto maisto nurijimas galėtų būti tinkamas poveikio būdas. Siekiant, kad stipriomis lipofilinėmis savybėmis pasižyminčių cheminių medžiagų toksiškumas būtų vertinamas tinkamai, galima svarstyti galimybę, ar nereikėtų į nuosėdas įterpti maisto prieš taikant bandomąją cheminę medžiagą. Norint atsižvelgti į visus galimus poveikio būdus pagrindinis dėmesys taikant šį bandymo metodą skiriamas ilgalaikiui poveikiui. Bandymo trukmė naudojant *C. Riparius* ir *C. Yoshimatsui* yra 20–28 dienos ir 28–65 dienos, jeigu pasirenkama *C. tentans*. Jeigu konkrečiam tikslui, pvz., tiriant nestabilių cheminių medžiagų poveikį, būtini trumpalaikiai duomenys, papildomus kartotinius ėminius galima paimti po dešimties parų laikotarpio.

4. Išmatuotas poveikis yra bendras išsiritusių suaugusiųjų skaičius ir išsiritimo trukmė. Rekomenduojama, kad lervų išgyvenimo ir augimo rodikliai būtų matuojami tik po dešimties parų laikotarpio, jeigu būtini papildomi trumpalaikiai duomenys, ir šiuo atveju, jeigu reikia, naudojant papildomus pakartotinius ėminius.

5. Rekomenduojama naudoti sintetines nuosėdas. Sintetinės nuosėdos keliais atžvilgiais yra tinkamesnės negu natūralios nuosėdos:

— darant bandymą kintamumas yra sumažinamas, nes kintamumas sudaro atkuriamą „standartinę matricą“ ir nėra būtina nustatyti neužterštą ir švarų nuosėdų šaltinį,

— bandymus galima pradėti bet kuriuo metu ir nepaisyti bandomųjų nuosėdų sezoninio kintamumo bei šiuo atveju nebūtina iš anksto apdoroti nuosėdų, kad iš jų būtų pašalinta būdingoji fauna; naudojant sintetines nuosėdas taip pat sumažinamos išlaidos, išleidžiamos lauke renkant įprastiems bandymams reikalingą nuosėdų kiekį,

— naudojant sintetines nuosėdas galima lyginti toksiškumą ir atitinkamai klasifikuoti chemines medžiagas.

6. Taikomų sąvokų apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

▼M4

BANDYMO METODO ESMĖ

7. Pirmos stadijos chironomidų lervos veikiamos tam tikros koncentracijos bandomąja chemine medžiaga nuosėdų–vandens sistemose. Bandomoji cheminė medžiaga įterpiama į nuosėdas ir pirmos stadijos lervos sudedamos į bandymo laboratorines stiklines, kuriose nuosėdų ir vandens koncentracijos yra stabilizuotos. Bandymo pabaigoje matuojama chironomidų išsinėrimo ir augimo sparta. Taip pat galima matuoti lervų išgyvenimą ir masę po 10 parų, jeigu reikia (naudojant kartotinius ėminius, kai būtina). Šie duomenys analizuojami taikant regresijos modelį siekiant įvertinti koncentraciją, kuri būtų x % sumažinusi lervų išsinėrimą, arba lervų išgyvenimą ar augimą (pvz., EC_{15}, EC_{50} ir t. t.) arba hipotezę tikrinant statistiniais kriterijais siekiant nustatyti NOEC/LOEC (stebimo poveikio nedarančią koncentraciją ir (arba) mažiausią stebimo poveikio koncentraciją). Pastaruoju atveju pasitelkus statistinius kriterijus poveikio vertes būtina lyginti su kontrolinėmis vertėmis.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

8. Turėtų būti žinomas bandomosios cheminės medžiagos tirpumas vandenyje, jos garų slėgis, išmatuotas ar apskaičiuotas nuosėdų susidarymas ir stabilumas vandenyje bei nuosėdose. Turėtų būti prieinamas analizės metodas kiekybiniam bandomosios cheminės medžiagos kiekiui nustatyti paviršiniame vandenyje, porų vandenyje ir nuosėdose su žinomu ir praneštu tikslumu bei aptikimo riba. Naudinga informacija laikytina bandomosios cheminės medžiagos struktūrinė formulė ir grynumas. Bandomosios cheminės medžiagos cheminis išliekamumas (pvz., išsklaidymas, abiotinis ir biotinis suirimas ir t. t.) taip pat laikytinas naudinga informacija. Išsamios bandomųjų cheminių medžiagų, kurios dėl jų fizinių ir cheminių savybių sunkiai pritaikomos bandymams atlikti, gairės pateiktos (12).

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

9. Bandymus su etaloninėmis cheminėmis medžiagomis galima atlikti periodiškai ir juos darant būtų užtikrinama, kad bandymo protokolas ir bandymo sąlygos būtų patikimos. Etaloninės toksiškos medžiagos, tinkamos naudoti atliekant tarplaboratorinio lyginimo bandymus ir patvirtinimo tyrimus: lindanas, trifluralinas, pentachlorfenolis, kadmio chloridas ir kalio chloridas (1) (2) (5) (6) (13).

BANDYMO VALIDUMAS

10. Bandymas laikomas validuotu, jeigu taikomos šios sąlygos:

— bandymo pabaigoje lervų išsinėrimas kontroliniuose bandiniuose turi būti ne mažesnis negu 70 %; (1) (6),

— *C. riparius* ir *C. yoshimatsui* iš kontrolinių indų suaugėliais turėtų tapti 12–23 dienomis po lervų įleidimo į indus; *C. tentans*, šis laikotarpis turi būti 20–65 dienos,

— bandymo pabaigoje pH vertė ir ištirpusio deguonies koncentracija turėtų būti matuojama kiekviename inde; deguonies koncentracijos vertė esant naudojamai temperatūrai turėtų būti bent 60 % soties ore vertės ir paviršinio vandens pH vertė visuose bandymo induose turėtų atitikti 6–9 intervalą,

— vandens temperatūra neturėtų skirtis daugiau negu ± 1,0 °C. Vandens temperatūrą galima reguliuoti naudojant izoterminę patalpą ir šiuo atveju patalpos temperatūra turėtų būti patvirtinama atitinkamu laiko intervalu.

▼M4

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Bandymo indai

11. Tyrimas atliekamas naudojant 600 ml laboratorines stiklines (skersmuo 8 cm). Leidžiama rinktis kitus indus, tačiau juos naudojant turėtų būti užtikrinamas tinkamas paviršinio vandens ir nuosėdų storis. Nuosėdų paviršiaus plotas turėtų būti toks, kad vienai lervai tektų 2–3 cm^2. Nuosėdų storio ir paviršinio vandens sluoksnio storio santykis turėtų būti 1:4. Bandymo indai ir kiti įrenginiai, kurie liesis su bandymo sistema, turėtų būti vien iš stiklo ar kitos cheminiu atžvilgiu neutralios medžiagos (pvz., teflono).

Rūšių pasirinkimas

12. Renkantis atliekant bandymą naudojamą rūšį pirmenybė teikiama *Chironomus riparius*. Taip pat leidžiama naudoti *Chironomus tentans*, tačiau juos sunkiau prižiūrėti ir jiems būtinas ilgesnis bandymo laikotarpis. Be to, leidžiama naudoti *Chironomus yohimatsui*. Su *Chironomus riparius* susiję kultūrų auginimo metodai aprašyti 2 priedėlyje. Taip pat pateikiama informacija apie kitų rūšių, t. y. *Chironomus tentans* (4) ir *Chironomus yoshimatsui* (11), kultūrų auginimo sąlygas. Rūšies tapatybės nustatymas turi būti patvirtinamas prieš bandymą, tačiau patvirtinimas nėra būtinas prieš kiekvieną bandymą, jeigu organizmas paimtas iš vietoje išaugintos kultūros.

Nuosėdos

13. Pirmenybė teikiama pasiruoštoms nuosėdoms (jos dar vadinamos pertvarkytomis, dirbtinėmis ar sintetinėmis nuosėdomis). Tačiau jeigu naudojamos natūralios nuosėdos, turėtų būti nurodomos jų charakteristikos (bent pH, organinės anglies kiekis, kitų parametrų apibrėžtis, pvz., C/N santykis, ir taip pat rekomenduojama pateikti granuliometrinę sudėtį) ir nuosėdose neturi būti jokių teršalų bei kitų organizmų, kurie galėtų konkuruoti su chironomidais ar juos vartoti. Taip pat rekomenduojama, kad prieš nuosėdas pradedant naudoti toksiškumo bandymui su chironomidais, natūralios nuosėdos kondicionuojamos septynias dienas tomis pačiomis sąlygomis, kurios taikomos kitam bandymui. Atliekant šį bandymą (1) (15) (16) rekomenduojama naudoti iš dirbtinio dirvožemio, kuris naudojamas taikant bandymo metodą C.8 (14), pasiruoštas sintetines nuosėdas:

a) 4–5 % durpių (sausoji masė): pH vertė kiek įmanoma turi būti 5,5–6,0; privaloma naudoti smulkiai sumaltus (dalelių dydis ≤ 1 mm) durpių miltelius; jos turi būti džiovintos tik ore;

b) 20 % (sausoji masė) kaolino molio (pageidautina, kad kaolinito jame būtų daugiau negu 30 %);

c) 75–76 % (sausoji masė) kvarcinio smėlio (smulkusis smėlis turėtų sudaryti didžiausią dalį, daugiau negu 50 % dalelių dydis 50–200 μm);

d) įpilama dejonizuoto vandens, kad galutinio mišinio drėgnumas būtų 30—50 %;

e) įdedama chemijos požiūriu gryno kalcio karbonato ($CaCO_3$), kad galutinio nuosėdų mišinio pH vertė būtų 7,0 ± 0,5; galutinio mišinio sudėtyje turėtų būti 2 % (± 0,5 %) organinės anglies ir jos kiekis koreguojamas atitinkamais durpių ir smėlio kiekiais atsižvelgiant į a–c.

14. Turėtų būti žinomas durpių, kaolino molio ir smėlio gavimo šaltinis. Nuosėdų sudedamosios dalys turėtų būti patikrinamos, ar jose nėra cheminės taršos pėdsakų (pvz., sunkiųjų metalų, chlororganinių komponentų, fosfororganinių komponentų ir t. t.). Sintetinių nuosėdų pasiruošimo pavyzdys aprašytas 3 priedėlyje. Taip pat leidžiama maišyti sausąsias sudedamąsias dalis, jeigu įmanoma įrodyti, kad užpylus paviršinio vandens nėra atskiriamos nuosėdų sudedamosios dalys (pvz., neima plūduriuoti kietosios durpių dalelės) ir kad durpės ar nuosėdos yra kondicionuotos pagal reikalavimus.

▼M4

Vanduo

15. Kaip bandymo vandenį leidžiama rinktis bet kokį vandenį, atitinkantį 2 ir 4 priedėliuose išvardytas skiedimui tinkamo vandens chemines savybes. Bet kokį tinkamą vandenį, natūralų vandenį (paviršinį ar gruntinį), regeneruotą vandenį (žr. 2 priedėlį) arba vandentiekio vandenį, iš kurio pašalintas chloras, leidžiama rinktis kaip kultūros auginimo vandenį ir bandymo vandenį, jeigu chironomidai jame be streso požymių išgyvena kultūros veisimo ir bandymo laikotarpiu. Bandymo vandens pH vertė pradedant bandymą turėtų būti 6–9, o bendrasis kietumas ne didesnis negu 400 mg/l kaip $CaCO_3$. Tačiau jeigu galima daryti prielaidą, kad vandens kietumo jonai gali sąveikauti su bandomąja chemine medžiaga, turėtų būti naudojamas mažesnio kietumo vanduo (vadinasi, šiuo atveju neleidžiama rinktis Elendt Medium M4). Atliekant tyrimą turėtų būti naudojamas to paties tipo vanduo. 4 priedėlyje išvardytų vandens kokybės charakteristikų vertės turėtų būti matuojamos ne rečiau negu du kartus per metus arba kilus įtarimui, kad šios charakteristikos yra gerokai pakitusios.

Pradiniai tirpalai. Nuosėdos su įterpta bandomąja chemine medžiaga

16. Pasirinktos koncentracijos nuosėdos su įterpta bandomąja chemine medžiaga paprastai pasiruošiamos bandomosios cheminės medžiagos tirpalo įpilant tiesiogiai į nuosėdas. Bandomosios cheminės medžiagos pradinis tirpalas ištirpinamas dejonizuotame vandenyje ir maišymo įtaisu, tiekimo maišikliu ar rankomis maišomas su sintetinėmis nuosėdomis. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga sunkiai tirpsta vandenyje, ją galima ištirpinti kuo mažesniame tinkamo organinio tirpiklio kiekyje (pvz., heksane, acetone arba chloroforme). Šis tirpalas maišomas su 10 g smulkaus kvarco smėlio vienam bandymo indui. Palaukiama, kol tirpiklis išgaruoja ir jis turi būti visiškai pašalinamas iš smėlio; tada bandymo laboratorinėje stiklinėje smėlis maišomas su reikiamu nuosėdų kiekiu. Norint bandomąją cheminę medžiagą soliubilizuoti, disperguoti ar emulguoti leidžiama naudoti tik lengvai garuojančias medžiagas. Atkreiptinas dėmesys, kad ruošiantis nuosėdas turi būti atsižvelgiama į bandomoje cheminėje medžiagoje ir smėlio mišinyje esantį smėlį (t. y. nuosėdos turėtų būti pasiruošiamos naudojant mažiau smėlio). Privaloma pasirūpinti, kad į nuosėdas įterpiama bandomoji cheminė medžiaga būtų kruopščiai ir tolygiai paskirstoma nuosėdose. Jeigu būtina, galima analizuoti ėminio dalį siekiant nustatyti vienalytiškumą.

BANDYMO PLANAS

17. Sudarant bandymo planą pasirenkamos bandymo koncentracijos ir jų paskirstymas, kiekvienos koncentracijos indų skaičius ir lervų skaičius inde. Pateikiamas EC taško nustatymo, NOEC nustatymo ir ribos bandymo atlikimo aprašymas.

Regresinės analizės planas

18. Bandymui naudotos koncentracijos būtinai turi aprėpti poveikio koncentraciją (pvz., EC_{15}, EC_{50}) ir dominančio medžiagos poveikio koncentracijos verčių diapazoną. Apskritai tikslumo ir ypač validumo vertes, kurias naudojant galima įvertinti poveikio koncentracijas (EC_x), įmanoma patikslinti, jeigu poveikio koncentracijos vertės atitinka bandomųjų koncentracijų intervalą. Nereikėtų ekstrapoliuoti gerokai mažesnių negu mažiausioji teigiamoji koncentracija arba didesnių negu didžiausioji koncentracija verčių. Pradinis intervalo nustatymo bandymas praverčia renkantis naudotinų koncentracijų intervalą (žr. 27 pastraipą).

▼M4

19. Jeigu turi būti nustatomos poveikio koncentracijos (EC_x), turėtų būti atliekami bent penki bandymai naudojant kiekvieną koncentracijos vertę ir trys kartotiniai bandymai. Bet kuriuo atveju rekomenduojama naudoti pakankamą bandomųjų koncentracijų skaičių, kad modelis būtų reikiamai įvertinamas. Koncentracijų koeficiento vertė neturėtų būti didesnė negu 2 (išimtį leidžiama taikyti tais atvejais, jeigu dozės ir reakcijos santykio kreivė turi nuolaidų statumą). Kartotinių ėminių skaičių atliekant kiekvieną apdorojimą galima mažinti, jeigu padidėja skirtingą atsaką sukeliančių bandomųjų koncentracijų skaičius. Didinant kartotinių ėminių skaičių arba mažinant bandomųjų koncentracijų intervalo ribas būtų taikomi siauresni bandymo pasikliovimo intervalai. Papildomi kartotiniai ėminiai būtini tuo atveju, jeigu reikia įvertinti 10 parų lervų išgyvenimą ir augimą.

NOEC/LOEC įvertinimo planas

20. Jeigu reikia įvertinti LOEC arba NOEC, turėtų būti naudojamos ne mažiau negu keturių kartotinių bandymų penkios bandomosios koncentracijos ir koncentracijų koeficiento vertė ne turėtų viršyti 2. Kartotinių bandymų skaičius turėtų būti pakankamas siekiant užtikrinti reikiamą statistinę galią, kad būtų aptinkamas 20 % skirtumas nuo kontrolinio 5 % reikšmingumo lygmens ($p = 0,05$). Nustatant vystymosi greitį paprastai naudojama dispersinė analizė (ANOVA), pvz., Dunnett bandymas ir Williams bandymas (17) (18) (19) (20). Nustatant išskridimo normą galima naudoti Cochran-Armitage, Fisher (su Bonferroni pataisa) arba Mantel-Haentzal bandymus.

Ribinis bandymas

21. Ribinį bandymą galima atlikti (viena bandomoji koncentracija ir kontrolinis ėminys), jeigu darant pradinį intervalo nustatymo bandymą nebuvo nustatyta jokių poveikių. Ribinio bandymo tikslas – atlikti bandymą naudojant ganėtinai didelę koncentraciją, kad sprendimą priimantys asmenys galėtų išskirti galimą toksinį bandomosios cheminės medžiagos poveikį ir kad būtų nustatyta ribinė koncentracijos vertė, kuri jokiu būdu neturi būti naudojama. Rekomenduojama 1 000 mg/kg (sausoji masė). Paprastai poveikiui bandomąja medžiaga ir kontroliniam ėminiui būtini ne mažiau negu šeši pakartotiniai bandymai. Turi būti įrodoma pakankama statistinė galia aptikti 20 % skirtumą nuo kontrolinės vertės esant 5 % reikšmingumo lygiui ($p = 0,05$). Jeigu atsakas nurodomas metriniais vienetais (vystymosi greitis ir masė), t-bandymas yra tinkamas statistinis metodas, jeigu duomenys atitinka šio bandymo reikalavimus (atitiktis, vienalytės dispersijos). Jeigu šių reikalavimų nesilaikoma, leidžiama naudoti nelygiavertės dispersijos t-bandymą arba neparametrinį bandymą, pvz., Wilcoxon-Mann-Whithey bandymą. Nustatant išsiritimo normą atliktinas Fisher bandymas.

PROCEDŪRA

Poveikio sąlygos

Nuosėdų su įterpta bandomąja chemine medžiaga ir vandens sistemos pasiruošimas

22. Bandomosios cheminės medžiagos įtepimo procedūra aprašyta bandymo metode C.8: Nustatant toksiškumą sliekams rekomenduojama taikyti bandomąją medžiagą (14). Nuosėdos su įterpta bandomąja medžiaga dedamos į indus ir užpilamos paviršiniu vandeniu, kad būtų užtikrintas nuosėdų ir vandens santykis 1:4 (žr. 11 ir 15 pastraipas). Nuosėdų sluoksnio storis turėtų būti 1,5—3 cm. Kad į vandens tūrį pilant bandymo vandenį nuosėdų sudedamosios dalys neatsiskirtų ir kietosios dalelės vėl nebūtų suspenduojamos skystyje, nuosėdas leidžiama uždengti plastiko disku, kol vanduo pilamas ant nuosėdų, ir vėliau diskas nedelsiant nuimamas. Taip pat leidžiama naudoti kitus įtaisus.

23. Bandymo indai turėtų būti uždengiami (pvz., stiklo plokštėmis) Jeigu būtina, atliekant tyrimą leidžiama įpilti vandens, kad būtų užtikrinamas pradinis vandens tūris ir kompensuojama išgaruojanti vandens dalis. Papildomai turėtų būti pilamas distiliuotas ar dejonizuotas vanduo, kad nesusidarytų druskos.

▼M4

Stabilizavimas

24. Pasiruošus nuosėdas su įterpta bandomąja chemine medžiaga ir paviršiniu vandeniu rekomenduojama palaukti, kol bandomoji cheminė medžiaga iš hidratuotos fazės pereis į nuosėdas (3) (4) (6) (13). Šis procesas turėtų būti visų pirma atliekamas laikantis darant bandymą taikomų temperatūros ir aeracijos sąlygų. Nuosėdoms ir cheminei medžiagai būdinga tam tikra pusiausvyros nusistovėjimo trukmė bei ji gali aprėpti kelias valandas ar dienas ir retais atvejais ne daugiau negu kelias savaites (4–5 savaites). Šiuo atveju būtų pakankamai laiko biologiškai suskaidyti daugelį cheminių medžiagų ir pusiausvyra nenusistovėtų, tačiau rekomenduojama rinktis 48 val. pusiausvyros nusistovėjimo laikotarpį. Kito šio pusiausvyros nusistovėjimo laikotarpio pabaigoje turėtų būti matuojama bandomosios cheminės medžiagos koncentracija paviršiniame vandenyje, porų vandenyje ir nuosėdose, bent jau didžiausios koncentracijos ir mažiausios koncentracijos (žr. 38 pastraipą). Naudojantis šiais bandomosios cheminės medžiagos analiziniais nustatymais galima apskaičiuoti masės balansą ir išreikšti rezultatus atsižvelgiant į išmatuotas koncentracijas.

Bandomųjų organizmų pridėjimas

25. Keturias ar penkias dienas prieš bandomųjų organizmų įdėjimą į bandymo indus, kiaušinėlių masė turėtų būti paimama iš sėjimo kultūrų ir sudedama į mažus indus auginimo terpėje. Leidžiama naudoti iš kamieninės kultūros gautą terpę arba šviežią pasiruoštą terpę. Jeigu naudojama pastaroji, į auginimo terpę turėtų būti įdedamas mažas kiekis pašaro, pvz., žaliųjų dumblių ir (arba) įlašinami keli lašeliai smulkiai sumaltų žuvų maisto gabalėlių suspensijos filtrato (žr. 2 priedėlį). Turėtų būti naudojamos tik neseniai padėtų kiaušinėlių masės. Paprastai lervos ima ristis po kelių dienų nuo kiaušinėlių padėjimo (*Chironomus riparius* 20 °C temperatūroje išsirita per 2–3 dienas, *Chironomus tentans* 23 °C temperatūroje išsirita per 1–4 dienas ir *Chironomus yoshimatui* 25 °C temperatūroje) ir lervos augdamos pereina keturias stadijas, iš kurių kiekviena trunka 4–8 dienas. Atliekant bandymą turėtų būti naudojamos pirmosios stadijos lervos (2–3 arba 1–4 dienų po išsiritimo). Mašalų stadiją įmanoma nustatyti pagal galvutės apvalkalo plotį (6).

26. Pirmos stadijos dvidešimt lervų buka pipete atsitiktinai paskirstoma kiekvienam bandymo indui, kuriame yra nuosėdų su įterpta bandomąja chemine medžiaga ir vandens. Vandens aeravimas turi būti nutraukiamas, kol lervos dedamos į bandymo indą, ir ši būsena išlaikoma dar 24 valandas po lervų įdėjimo (žr. 25 ir 32 pastraipas). Pagal taikomą bandymo planą (žr. 19 ir 20 pastraipas) kiekviena koncentracija veikiama ne mažiau negu 60 lervų, jeigu nustatomas ES taškas, arba 80 lervų, jeigu apibrėžiama NOEC.

Bandomosios koncentracijos

27. Intervalo nustatymo bandymas gali būti naudingas siekiant apibrėžti darant galutinį bandymą pasirinktinų koncentracijų intervalą. Šiuo tikslu naudojamos labai besiskiriančių bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų serijos. Siekiant užtikrinti galutiniam bandymui naudojamų chironomidų vienodą paviršiaus tankumą, jie veikiami kiekviena bandomosios cheminės medžiagos koncentracija tol, kol įvertinamos atitinkamos bandomosios koncentracijos ir kartotiniai ėminiai nėra reikalingi.

28. Atliekant galutinį bandymą naudojamos bandomosios koncentracijos pasirenkamos atsižvelgiant į intervalo nustatymo bandymo rezultatą. Turėtų būti naudojamos ne mažiau negu penkios koncentracijos kaip aprašyta 18–20 pastraipose.

▼M4

Kontroliniai ėminiai

29. Kontrolinių ėminių indai be jokios bandomosios cheminės medžiagos, tačiau su nuosėdomis, turėtų būti naudojami atliekant bandymą su atitinkamu skaičiumi kartotinių ėminių (žr. 19–20 pastraipą). Jeigu taikant bandomąją cheminę medžiagą naudotas tirpiklis (žr. 16 pastraipą), turėtų būti įdedamas tirpiklio kontrolinis ėminys.

Bandymo sistema

30. Naudojamos statinės sistemos. Išskirtiniais atvejais leidžiama naudoti pusiau statines ar dinamines sistemas su trūkiuoju ar tolygiu paviršinio vandens atnaujinimu, pvz., jeigu vandens kokybės reikalavimai neatitinka taikomų bandomajam organizmui ar daro poveikį cheminei pusiausvyrai (pvz., ištirpusio deguonies lygiai pernelyg sumažėja, labai padidėja šalinimo produktų koncentracija arba iš nuosėdų ima sunktis mineralų skystis ir daro poveikį pH ir (arba) vandens kietumo vertėms). Tačiau paprastai pakanka kitų paviršinio vandens kokybės gerinimo metodų, pvz., aeracijos, ir jiems teiktina pirmenybė.

Pašaras

31. Lervas būtina maitinti; pageidautina kiekvieną dieną ar bent tris kartus per savaitę. Per pirmąsias 10 parų jaunoms lervoms per dieną turėtų pakakti 0,25–0,5 mg (*C. yoshimatui* lervoms 0,35–0,5 mg) žuvų maisto (vandens suspensija arba smulkiai sumaltas maistas, pvz., Tetra-Min arba Tetra-Phyll, išsami informacija pateikta 2 priedėlyje). Senesnėms lervoms pašaro reikia šiek tiek daugiau: likusiai bandymo daliai kiekvieną dieną lervoms turėtų pakakti 0,5–1 mg. Pašaro kiekis turėtų būti mažinamas visų apdorojimų atvejais ir kontrolinėje grupėje, jeigu nustatomas grybelio atsiradimas arba jeigu aptinkama, kad kontrolinės grupės gyvūnai gaišta. Jeigu grybelio augimo nepavyksta sustabdyti, bandymas turi būti pakartotas. Jeigu bandymai atliekami su lengvai absorbuojamomis cheminėmis medžiagomis (pvz., kai K_{ow} > 5) ar kovalentiniais saitais su nuosėdomis susijusiomis cheminėmis medžiagomis, išgyvenimui ir natūraliam augimui būtiną pašaro kiekį galima įterpti į sintetines nuosėdas prieš stabilizavimo laikotarpį. Šiuo tikslu turi būti naudojamas ne žuvų maistas, o augalinis pašaras, pvz., pridedama 0,5 % (sausoji masė) smulkiai sumaltų lapų, pvz., didžiosios dilgėlės (*Urtica dioeca*), baltojo šilkmedžio (*Morus alba*), persinio dobilo (*Trifolium repens*), daržinio špinato (*Spinacia oleracea*) arba galima naudoti kitą augalinę medžiagą (*Cerophyl* arba alfa celiuliozę).

Inkubacijos sąlygos

32. Rekomenduojama visų pirma 24 valandas po lervų įdėjimo nestipriai aeruoti bandymo indų paviršinį vandenį ir vėliau aeruojama per visą bandymo atlikimo trukmę (privaloma stebėti, ar ištirpusio deguonies koncentracijos vertė nėra mažesnė negu 60 % soties ore vertės (ASV)). Aeruojant naudojama stiklinė Pastero pipetė, pritvirtinta 2–3 cm virš nuosėdų sluoksnio (t. y. vienas ar keli burbulai per sek.). Darant bandymus su lakiosiomis cheminėmis medžiagomis galima nuspręsti nuosėdų–vandens sistemos neaeruoti.

33. Atliekant bandymą išlaikoma pastovi 20 °C (± 2 °C) temperatūra. Atliekant bandymą su *C. tentans* ir *C. yoshimatui* atitinkamai rekomenduojama pasirinkti 25 °C (± 2 °C) temperatūrą. Naudojamas 16 val. apšvietimo laikotarpis; šviesos intensyvumo vertės turėtų būti 500–1 000 liuksų.

▼M4

Poveikio trukmė

34. Poveikis prasideda lervas įdėjus į indus su bandomąją chemine medžiaga ir kontrolinių ėminių indus. Jeigu naudojami *C. riparius* ir *C. yoshimatsui*, poveikio trukmė yra 28 dienos, o kai pasirenkama *C. tentans* – 65 dienos. Jeigu mašalai atsiranda anksčiau, bandymą galima nutraukti ne anksčiau negu po penkių dienų atsiradus paskutiniam kontrolinės grupės suaugusiajam.

Stebėjimai

Lervų išsinėrimas

35. Nustatoma vystymosi trukmė ir bendras visų iki galo išsinėrusių mašalų patinų ir patelių skaičius. Patinėliai lengviau atpažįstami žiūrint į jų plunksniškus čiuptuvėlius.

36. Bandymo indai turėtų būti stebimi bent tris kartus per savaitę siekiant nustatyti bet kokią neįprastą veikseną (pvz., nuosėdų susidarymą, neįprastą plūduriavimą) palyginti su kontroliniai indais. Numatomo lervų išsinėrimo laikotarpiu būtina skaičiuoti kasdieną atsirandančius mašalus. Kiekvieną dieną registruojami visi atsiradę mašalai ir nurodoma jų lytis. Nustačius tapatybę mašalai pašalinami iš indų. Turėtų būti registruojamos visos prie užbaigiant bandymą padėtos kiaušinėlių masės ir po to pašalinamos, kad lervos pakartotinai nebūtų įdėtos į nuosėdas. Taip pat registruojamas matomų lėliukų skaičius, kurios nėra išsiritusios. Išsineriančių lervų skaičiavimo gairės pateiktos 5 priedėlyje.

Augimas ir išgyvenimas

37. Jeigu privaloma pateikti duomenis apie 10 parų lervų išgyvenimą ir augimą, iš pradžių turi būti įtraukiami papildomi bandymo indai, kad juos būtų galima naudoti vėliau. Šių papildomų indų nuosėdos sijojamos 250 μm sietu siekiant surinkti lervas. Nejudumas ar nepakankamas atsakas į mechaninius dirgiklius yra gaišimo kriterijai. Neatsigavusios lervos taip pat turėtų būti laikomos nugaišusiomis (bandymo pradžioje nugaišusios lervos galėjo būti žuvusios nuo mikrobų). Nustatoma bandymo inde išgyvenusių lervų sausoji masė (be pelenų) ir apskaičiuojama vidutinė pavienė indo sausoji masė. Tikslinga nustatyti, kurios stadijos yra išgyvenusi lerva; šiuo tikslu galima matuoti kiekvieno individo galvos apvalkalo plotį.

Analiziniai matavimai

Bandomosios cheminės medžiagos koncentracija

38. Prieš pradedant bandymą (t. y. prieš įdedant lervas) bent iš kiekvieno apdorojimo indo imami biriųjų nuosėdų ėminiai ir į juos atsižvelgiant bei naudojant analizinį nustatymą įvertinama bandomosios cheminės medžiagos koncentracija nuosėdose. Bandymo pradžioje ir pabaigoje rekomenduojama analizuoti bent paviršinio vandens, porų vandens ir nuosėdų ėminius (žr. 24 pastraipą) esant didžiausiai koncentracijai ir mažesnei koncentracijai. Nustačius bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją gaunama informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos elgseną ir (arba) pasiskirstymą vandens–nuosėdų sistemoje.

39. Jeigu atliekami tarpiniai matavimai (pvz., 7 dieną) ir jeigu analizei atlikti reikalingi dideli ėminiai, kuriuos paėmus bandymo sistemai būtų padarytas poveikis, analiziniai nustatymai turėtų būti atliekami naudojant iš panašiai apdorotų papildomų bandymo indų paimtus ėminius (įskaitant bandomųjų organizmų buvimą), tačiau biologiniam stebėjimui nenaudotų indų.

▼M4

40. Siekiant izoliuoti laisvąjį vandenį rekomenduojama naudoti 30 min. trukmės centrifugavimo procedūrą, pvz., 10 000 g ir 4 °C. Tačiau jeigu įrodoma, kad bandomosios cheminės medžiagos filtrai neadsorbuoja, taip pat galima rinktis filtravimą. Tam tikrais atvejais gali nebūti įmanoma analizuoti porų vandens koncentracijų, nes ėminys yra pernelyg mažas.

Fiziniai ir cheminiai parametrai

41. Tinkamu būdu turėtų būti matuojama bandymo indų pH ir temperatūros vertės (žr. 10 pastraipą). Bandymo pradžioje ir jo pabaigoje turėtų būti matuojama kontrolinių ėminių ir vieno bandymo indo kietumo ir amoniako vertės esant didžiausiai koncentracijai.

DUOMENYS IR ATASKAITŲ TEIKIMAS

Rezultatų apdorojimas

42. Šio bandymo tikslas – nustatyti bandomosios cheminės medžiagos poveikį mašalų patelių ir patinėlių vystymosi greičiui ir bendram jų skaičiui, arba, jeigu atliekamas 10 parų bandymas, poveikį lervų išgyvenimui ir jų masei. Jeigu neturima duomenų apie statistiniu požiūriu skirtingą lyčių jautrumą, atliekant statistinę analizę patinėlių ir patelių rezultatus galima sujungti. Apie lyčių jautrumo skirtumus galima spręsti naudojant statistines priemones, pvz., atliekant χ^2-r × 2 lentelės bandymą. Jeigu reikia, po 10 parų turi būti nustatomas lervų išgyvenimas ir vidutinė kiekvieno indo sausoji masė.

43. Visų pirmiausiai remiantis bandymo pradžioje (žr. 38 pastraipą) išmatuotomis nuosėdų koncentracijomis apskaičiuojamos sausąja mase pagrįstos ir išreikštos poveikio koncentracijos.

44. Indo statistinius duomenis, norint apskaičiuoti EC_{50} arba bet kokio kito EC_x taškinį įvertį, leidžiama naudoti kaip patikimus kartotinius duomenis. Apskaičiuojant kiekvieno EC_x pasikliovimo intervalą turėtų būti atsižvelgiama į kiekvieno indo skirtingumą arba būti įrodoma, kad šis kintamumas yra toks mažas ir kad jo galima nepaisyti. Jeigu modeliui taikomas mažiausiųjų kvadratų metodas, kiekvieno indo statistikos duomenims taikoma transformacija siekiant pagerinti dispersijos vienalytiškumą. Tačiau EC_x vertės turėtų būti apskaičiuojamos atsaką transformavus į pradinę vertę.

45. Jeigu taikant statistinę analizę siekiama apibrėžti NOEC/LOEC ir šiuo tikslu tikrinama hipotezė, turi būti atsižvelgiama į su indais susijusį skirtingumą, pvz., įterpiant ANOVA. Antraip jeigu susiklosto situacijos, kad įprastos ANOVA prielaidos gali būti pažeidžiamos, galima naudoti išsamesnius bandymus (21).

Išsinėrimo santykis

46. Išsinėrimo santykiai yra kiekybiniai duomenys ir juos galima analizuoti atliekant Cochran-Armitage bandymą, taikomą mažėjimo tvarka, jeigu laikoma, kad atsakas į dozę būsiąs monotoninis ir šie duomenys atitinka minėtą prielaidą. Jeigu ne, šiuo atveju leidžiama rinktis Fisher arba Mantel-Haentzal bandymą su pakoreguotomis pagal Bonferroni-Holm p vertėmis. Jeigu turima įrodymų, kad naudojant tą pačią koncentraciją kartotinių ėminių kintamumas yra didesnis negu būtų galima nustatyti atsižvelgiant į binominį skirstinį (dažnai vadinamą „pertekline dispersija“), šiuo atveju turėtų būti pasirenkamas (21) pasiūlytas išsamus Cochran-Armitage arba Fisher bandymas.

▼M4

Nustatoma inde išsiritusių mašalų suma ne ir dalinama iš įdėtų lervų skaičiaus na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

kur:

ER = išsinėrimo santykis

n_e = iš indo išsinėrusių mašalų skaičius

n_a = į indą įdėtų lervų skaičius

47. Jeigu ėminiai yra dideli ir jeigu nustatoma perteklinė dispersija, šiuo atveju galima rinktis kitą alternatyvą, t. y. išsinėrimo santykį laikyti nenutrūkstamuoju atsaku ir rinktis Williamso bandymą, jeigu daroma prielaida, kad atsakas į dozę būsiąs monotoninis ir atitiksiąs šiuos ER duomenis. Jeigu monotoniškumas nėra užtikrinamas, pirmenybė teiktina Duneto bandymui. Didelio ėminio dydis šiuo atveju apibrėžiamas išsinėrusių mašalų ir neišsinėrusių mašalų skaičiumi, kuris abiem atvejais viršija penkis, atsižvelgiant į kartotinį ėminį (indą).

48. Norint taikyti ANOVA metodų vertes, ER vertės pirmiausiai turėtų būti transformuojamos naudojant arksinuso kvadratinės šaknies transformaciją arba Tukey-Freeman transformaciją siekiant gauti apytikslį įprastą skirstinį ir suvienodinti dispersijas. Leidžiama naudoti Cochran-Armitage, Fisherio (Bonferroni) arba Mantel-Haentzal bandymus, jeigu taikomi absoliutieji dažniai. Arcsin-sqrt transformacija taikoma pasirenkant ER vertės kvadratinės šaknies arksinusą ($\sin^{-1}$).

49. Išsinėrimo santykių EC_x vertės apskaičiuojamos naudojant regresijos analizę (arba, pvz., probit (22), logit, Weitbull, atitinkamą komercinę programinę įrangą ir t. t.). Jeigu regresijos analizė nepavyksta (pvz., jeigu tėra mažiau negu du daliniai atsakai), naudojami kiti neparametriniai metodai, pvz., slankiojo vidurkio metodas ar interpoliacijos metodas.

Vystymosi greitis

50. Vidutinė vystymosi trukmė yra vidutinis laikotarpis nuo lervų įdėjimo (nulinė bandymo diena) ir iki eksperimentinės mašalų kohortos išsinėrimo. (Apskaičiuojant tikrąją vystymosi trukmę turėtų būti atsižvelgiama į lervų amžių, kai jos buvo įdedamos). Vystymosi greitis yra atvirkštinis dydis vystymosi trukmės atžvilgiu (vienetas: 1/diena) ir atitinka tą lervos vystymosi atkarpą, kuris vyksta per vieną dieną. Vystymosi greičiui, palyginti su šių nuosėdų toksiškumo tyrimų įvertinimu, teikiama pirmenybė, nes jo dispersija yra mažesnė, ir jis vienalytiškesnis bei glaudžiau atitinka įprastą pasiskirstymą, jeigu lyginama su vystymosi trukme. Vadinasi, leidžiama veikiau rinktis patikimą parametrinį bandymą su vystymosi greičiu negu su vystymosi trukme. Vystymosi greičio kaip nenutrūkstamo atsako EC_x vertes galima įvertinti naudojant regresijos analizę (pvz., (23), (24)).

51. Atliekant šiuos statistinius tyrimus laikoma, kad tikrinimo x dieną pastebėtas mašalų skaičius išsinėrė per vidutinį laiko intervalą nuo x dienos iki x-1 dienos (l = tikrinimo intervalo trukmė (paprastai viena diena)). Vienam indui taikoma vidutinė vystymosi greičio vertė (x) apskaičiuojama pagal šią lygtį:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

kur:

$\bar{x}$: indui taikoma vidutinė vystymosi greičio vertė

i: tikrinimo intervalo indeksas

m: didžiausias tikrinimo intervalų skaičius

f_i: per tikrinimo intervalą i išsinėrusių mašalų skaičius

n_e: bendras eksperimento pabaigoje išsinėrusių mašalų skaičius ($=\sum f_i$

x_i: per intervalą i išsinėrusių mašalų vystymosi greitis

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{diena}_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

kur:

diena_i: tikrinimo diena (diena po poveikio)

l_i: tikrinimo intervalo i trukmė (dienos, paprastai 1 diena)

Bandymo ataskaita

52. Į bandymo ataskaitą turi būti įtraukiama bent ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— fizinis pobūdis ir, jeigu reikia, fizinės bei cheminės savybės (tirpumas vandenyje, garų slėgis, pasiskirstymo dirvoje koeficientas (ar nuosėdose, jeigu žinomas), stabilumas vandenyje ir t. t.),

— cheminės tapatybės nustatymo duomenys (bendrinis pavadinimas, cheminis pavadinimas, struktūrinė formulė, CAS numeris ir t. t.), įskaitant grynumą ir analinės metodas atliekant bandomosios cheminės medžiagos kiekybinį nustatymą.

Bandomosios rūšys:

— naudojami bandomieji gyvūnai: rūšis, mokslinis pavadinimas, organizmo gavimo šaltinis ir veisimo sąlygos,

— informacija apie kiaušinėlių masės ir lervų tvarkymą,

— gyvūnų amžius, kai jie buvo įdėti į bandymo indus.

Bandymo sąlygos:

— naudotos nuosėdos, t. y. natūralios ar sintetinės nuosėdos,

— jei naudojamos natūralios nuosėdos, nuosėdų ėminių ėmimo vieta ir jos aprašymas, įskaitant, jeigu įmanoma, taršos aprašas; charakteristikos: pH, organinės anglies kiekis, C/N santykis ir granuliometrinė analizė (jeigu reikia),

— sintetinių nuosėdų pasiruošimas: sudedamosios dalys ir charakteristikos (organinės anglies kiekis, pH, drėgmė ir t. t. bandymo pradžioje),

— bandymo vandens pasiruošimas (jeigu naudojamas regeneruotas vanduo) ir charakteristikos (deguonies koncentracija, pH. Laidumas, kietumas ir t. t. bandymo pradžioje),

— nuosėdų ir vandens sluoksnių storis,

— paviršinio vandens ir porų vandens tūris; drėgnųjų nuosėdų masė su porų vandeniu ir be jo,

▼M4

— bandymo indai (medžiaga ir dydis),

— bandomosios cheminės medžiagos įterpimo į nuosėdas metodas: naudotos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, kartotinių ėminių skaičius ir naudoti tirpikliai, jeigu buvo naudoti,

— nuosėdų—vandens sistemos, į kurią įterpta bandomosios cheminės medžiagos, stabilizavimo pusiausvyros fazė: trukmė ir sąlygos,

— inkubacijos sąlygos: temperatūra, šviesos ciklas ir intensyvumas, aeracija (dažnumas ir intensyvumas),

— išsami informacija apie maistą, įskaitant jo tipą, paruošiamą, kiekį ir maitinimo tvarką.

Rezultatai:

— nominaliosios bandomosios koncentracijos, išmatuotos bandomosios koncentracijos ir visų analizių rezultatai siekiant bandymo inde nustatyti bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją,

— vandens kokybė bandymo induose, t. y. pH, temperatūra, ištirpęs deguonis, kietumas ir amoniako kiekis,

— išgaruojančio bandymo vandens papildymas, jeigu taikoma,

— iš kiekvieno indo per dieną išsiritusių mašalų patinų ir patelių skaičius,

— lervų, kurios inde neišsiritė kaip mašalai, skaičius,

— vidutinė pavienė lervų sausoji masė inde ir tam tikros stadijos lervų sausoji masė inde, jeigu reikia,

— išsiritusių mašalų skaičius atliekant tapatų bandymą ir bandomoji koncentracija (mašalų patinėlių ir patelių skaičius sujungtas),

— atliekant tapatų bandymą išsiritusių mašalų vidutinis vystymosi greitis ir apdorojimo norma (mašalų patinėlių ir patelių skaičius sujungtas),

— toksinio poveikio įvertinimai, pvz., ECx (ir susiję pasikliovimo intervalai), NOEC ir (arba) LOEC bei jiems nustatyti naudoti statistikos metodai,

— rezultatų aptarimas, įskaitant bet kokį poveikį bandymo rezultatams, kuris būtų padarytas nukrypus nuo šio bandymo metodo.

LITERATŪRA

1. BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

2. Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

3. SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

4. ASTM International/E1706–00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125–1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

5. Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼M4

6. US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

7. US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

8. US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

9. Milani D, Day KE, McLeay DJ, and Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

10. Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.

11. Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47–57.

12. OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and SAFEty Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

13. Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

14. Šio priedo bandymo metodas C.8. Toksiškumas sliekams.

15. Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.

16. Naylor C and C Rodrigues (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

17. Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096–1121.

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

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

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

21. Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577–585.

22. Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.

23. Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485–1494.

24. Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

▼**M4**

1 priedėlis

SĄVOKŲ APIBRĖŽTYS

Šiame bandymo metode vartojamų terminų apibrėžtys:

Pasiruoštosios nuosėdos ar regeneruotos, dirbtinės arba sintetinės nuosėdos yra natūralių nuosėdų fizines sudedamąsias dalis atitinkančių medžiagų mišinys.

Paviršinis vanduo – bandymo inde ant nuosėdų užpiltas vanduo.

Laisvasis vanduo ar porų vanduo – ertmes tarp nuosėdų ir dirvožemio kietųjų dalelių užpildantis vanduo.

Nuosėdos su įterpta bandomąja chemine medžiaga – nuosėdos, į kurias prileista bandomosios cheminės medžiagos.

Bandomoji cheminė medžiaga – bet kokia naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga ar mišinys.

▼M4

2 priedėlis

Rekomendacijos dėl *Chironomus riparius* auginimo

1. *Chironomus* lervas galima auginti kristalizatoriuose ar didelėse talpyklose. Ant talpyklos dugno plonu sluoksniu (5–10 mm storio) paskleidžiamas smulkus kvarco smėlis. Taip pat įrodyta (pvz., Merck, Art 8117), kad diatomitas yra tinkamas substratas (pakanka plonesnio sluoksnio, vos kelių mm storio). Po to užpilamas kelių centimetrų storio vandens sluoksnis. Jeigu reikia, įpilama papildomo vandens, kad būtų atkuriamas išgaravęs kiekis ir sustabdomas džiūvimas. Jeigu reikia, vandenį leidžiama pakeisti. Turėtų būti užtikrinamas nuosaikus aeravimas. Lervų auginimo indai turėtų būti laikomi tinkamuose narvuose, kad išsinėrę suaugusieji vabzdžiai nepajėgtų pasprukti. Narvas turėtų būti ganėtinai erdvus, kad galėtų spiestis išsinėrę suaugusieji vabzdžiai; antraip populiacija gali nesusiformuoti (mažiausi matmenys yra 30 × 30 × 30 cm).

2. Narvai turėtų būti laikomi kambario temperatūroje arba pastovių aplinkos sąlygų patalpoje 20 ± 2 °C temperatūroje; šviesiojo laikotarpio trukmė 16 val. (šviesos intensyvumas apie 1 000 liuksų), 8 val. tamsos. Parengta ataskaitų, kuriose nurodoma, kad jeigu oro drėgnumas yra mažesnis negu 60 % RH, gali sumažėti reprodukcija).

Skiedimo vanduo

3. Leidžiama naudoti bet kokį tinkamą natūralų ar sintetinį vandenį. Paprastai naudojamas šulinio vanduo, vanduo, iš kurio pašalintas chloras, ir dirbtinės terpės (pvz., Elendt „M4“ arba „M7“ priemonė, žr. toliau). Prieš naudojimą vanduo turi būti aeruojamas. Jeigu būtina, kultūrų auginimo vandenį leidžiama atnaujinti pilant panaudotą vandenį iš kultūrų auginimo indų ar jį leidžiant per sifoną; būtina stengtis nepažeisti lervų vamzdžių.

Lervų šėrimas

4. *Chironomus* lervos turėtų būti šeriamos žuvų maisto dribsniais (Tetra Min®, Tetra Phyll® arba kita panašia patentuota žuvų maisto rūšimi); vienam indui per dieną skiriama apie 250 mg pašaro. Pašarą galima pateikti sausą, sumaltą milteliais arba kaip vandens suspensiją: 1,0 g maisto dribsnių įdedama į 20 ml skiedimo vandens ir išmaišoma, kol gaunamas vienalytis mišinys. Šio ruošinio apie 5 ml per dieną leidžiama įdėti į kiekvieną indą (prieš naudojant būtina pakratyti). Vyresnėms lervoms duodama daugiau pašaro.

5. Šėrimas koreguojamas atsižvelgiant į vandens kokybę. Jeigu auginimo terpė „susidrumsčia“, duodamo pašaro kiekis turėtų būti sumažinamas. Duodamo pašaro kiekiai turi būti kruopščiai stebimi. Jeigu duodamas per mažas pašaro kiekis, lervos persikelia į vandens storymę, o skiriant per daug pašaro suintensyvėja mikroorganizmų veikla ir sumažėja deguonies koncentracija. Abiem minėtomis sąlygomis sumažėja augimo greitis.

6. Ruošiant naujus kultūrų auginimo indus į juos taip pat galima šiek tiek įdėti žaliųjų dumblių (pvz., *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

Išsinėrusių suaugusiųjų mašalų šėrimas

7. Kai kurie tyrinėtojai pasiūlė, kad išsinėrusius suaugusius mašalus būtų galima šerti naudojant prisotintame sacharozė tirpale išmirkytus vilnos tamponus.

▼M4

Lervų išsinėrimas

8. Suaugę mašalai ima rastis iš lervų auginimo indų po 13–15 dienų 20 ± 2 °C temperatūroje. Patinėliai lengviau atpažįstami žiūrint į jų plunksniškus čiuptuvėlius.

Kiaušinėlių masė

9. Kol suaugę mašalai būna veisimo narve, visi lervų auginimo indai turėtų būti tikrinami tris kartus per savaitę, ar juose nėra drebučių pavidalo kiaušinėlių masės. Jeigu randama šios kiaušinėlių masės, ji turėtų būti atsargiai pašalinama. Kiaušinėliai turėtų būti sudedami į mažą indelį su veisimo vandens ėminiu. Kiaušinėlių masė naudojama pradedant inde auginti naują kultūrą (pvz., 2–4 kiaušinėlių masė viename inde) arba atliekant toksiškumo bandymus.

10. Pirmos stadijos lervos turėtų išsiristi po 2–3 dienų.

Naujų kultūrų auginimo indų ruošimas

11. Išauginus kultūras turėtų būti įmanoma kiekvieną savaitę ar rečiau paruošti naują lervų kultūros auginimo indą atsižvelgiant į bandymo atlikimo reikalavimus ir pašalinant senesnius indus, kai išsineria suaugę mašalai. Taikant šią sistemą mažomis pastangomis reguliariai tiekiami suaugę mašalai.

Bandymo tirpalų „M4“ ir „M7“ ruošimas

12. Elendtas (1990) aprašė „M4“ terpę. „M7“ terpė ruošiama kaip „M4“ terpė, išskyrus 1 lentelėje išvardytas chemines medžiagas, kurių koncentracijos „M7“, palyginti su „M4“, yra keturis kartus mažesnės. Leidinys apie „M7“ terpę yra rengiamas (Elendto pateiktas pranešimas). Bandomasis tirpalas neturėtų būti ruošiamas pagal Elendtą ir Bias (1990), jeigu norima gauti $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 ir K_2HPO_4 koncentracijas, nes pradinių tirpalų ruošimas nėra tapati veikla.

„M7“ terpės ruošimas

13. Kiekvienas pradinis tirpalas (I) paruošiamas atskirai ir iš šių pradinių tirpalų (I) paruošiamas kombinuotasis pradinis tirpalas (II) (žr. 1 lentelę). 50 ml kombinuotojo pradinio tirpalo (II) ir 2 lentelėje nurodyti kiekvieno makroelementų pradinio tirpalo kiekiai praskiedžiami iki 1 litro dejonizuoto vandens, kad taip būtų pasiruošta „M7“ terpė. Vitaminų pradinis tirpalas pasiruošiamas į dejonizuotą vandenį įmaišius tris vitaminus kaip nurodyta 3 lentelėje ir 0,1 ml kombinuotojo vitaminų pradinio tirpalo įmaišoma į galutinę „M7“ terpę prieš pat naudojimo pradžią. (Vitaminų pradinis tirpalas laikomas sušaldytas mažomis alikvotinėmis dalimis.) Terpė aeruojama ir stabilizuojama.

LITERATŪRA

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

▼**M4**

1 lentelė

„M4“ ir „M7“ terpei skirtų mikroelementų pradiniai tirpalai

Pradiniai tirpalai (I)	Kiekis (mg), praskiedžiamas iki 1 litro dejonizuoto vandens	Ruošiant kombinuotą pradinį tirpalą (II): maišomi nurodyti pradinių tirpalų (I) kiekiai (mg) ir praskiedžiami iki 1 litro dejonizuoto vandens		Galutinės bandomųjų tirpalų koncentracijos (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Šios medžiagos skiriasi M4 ir M7 kaip pirmiau nurodyta.
(2) Šie tirpalai ruošiami atskirai, tada sumaišomi ir nedelsiant apdorojami autoklave.

2 lentelė

M4 ir M7 terpėms skirti makroelementų pradiniai tirpalai

	Kiekis praskiedžiamas iki 1 litro dejonizuoto vandens (mg)	Ruošiant M4 ir M7 terpę įdedamas makroelementų pradinių tirpalų kiekis (ml/l)	Galutinės bandomųjų tirpalų M4 ir M7 koncentracijos (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

3 lentelė

M4 ir M7 terpei skirtas vitaminų pradinis tirpalas. Visi trys vitaminų tirpalai maišomi siekiant paruošti vieną vitaminų pradinį tirpalą

	Kiekis praskiedžiamas iki 1 litro dejonizuoto vandens (mg)	Ruošiant M4 ir M7 terpę įdedamas vitaminų pradinio tirpalo kiekis (ml/l)	Galutinės bandomųjų tirpalų M4 ir M7 koncentracijos (mg/l)
Tiamino hidrochloridas	750	0,1	0,075
Ciankobalaminas (B12)	10	0,1	0,0010
Biotinas	7,5	0,1	0,00075

LITERATŪRA

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

▼M4

3 priedėlis

SINTETINIŲ NUOSĖDŲ RUOŠIMAS

Nuosėdų sudėtis

Sintetinės nuosėdos turėtų būti sudarytos iš šių sudedamųjų dalių:

Sudedamoji dalis	Charakteristikos	Nuosėdų sausosios procentinė dalis)
Durpės	Naujosios Zelandijos kiminų durpės, jų pH kiek įmanoma atitinka 5,5–6,0, jokių augalų matomų liekanų, smulkiai sumaltos (kietųjų dalelių dydis ≤ 1 mm), džiovintos ore	4–5
Kvarcinis smėlis	Grūdelių dydis: > 50 % dalelių dydžio vertės intervalas turėtų būti 0–200 μm	75–76
Kaolito molis	Kaolinito kiekis ≥ 30 %	20
Organinė anglis	Pakoreguota pridedant durpių ir smėlio	2 (± 0,5)
Kalcio karbonatas	$CaCO_3$, milteliai, cheminiu atžvilgiu grynas	0,05–0,1
Vanduo	Laidumas ≤ 10 μS/cm	30–50

Pasiruošimas

Durpės džiovinamos ore ir malamos tol, kol gaunami smulkūs milteliai. Suspensija iš nustatyto durpių miltelių kiekio ir dejonizuoto vandens pasiruošiama didelio našumo homogenizavimo įrenginiu. Naudojant $CaCO_3$ koreguojama, kad šios suspensijos pH vertė būtų 5,5 ± 0,5. Švelniai maišant suspensija kondicionuojama ne trumpiau negu dvi dienas 20 ± 2 °C temperatūroje siekiant stabilizuoti pH ir paruošti stabilią mikroorganizmų populiaciją. pH matuojama dar kartą ir jo vertė turėtų būti 6,0 ± 0,5. Tada durpių suspensija maišoma su kitomis sudedamosiomis dalimis (smėliu ir kaolino moliu) ir dejonizuotu vandeniu siekiant gauti vienalytes nuosėdas, kuriose vandens kiekis sudaro 30—50 % sausosios masės. Dar kartą matuojama galutinio mišinio pH vertė ir, jeigu reikia, naudojant $CaCO_3$ koreguojama, kol pH vertė ima atitikti 6,5–7,5 vertę. Imami nuosėdų ėminiai siekiant nustatyti sausąją masę ir organinės anglies kiekį. Taip pat rekomenduojama, kad prieš pradedant nuosėdas naudoti chironomidų toksiškumo bandymui, sintetinės nuosėdos būtų kondicionuojamos septynias dienas tomis pačiomis sąlygomis, kurios taikomos kitam bandymui.

Sandėliavimas

Sintetinių nuosėdų ruošimo visas sudedamąsias sausas dalis galima laikyti sausoje ir vėsioje vietoje kambario temperatūroje. Sintetinės (drėgnos) nuosėdos neturėtų būti sandėliuojamos prieš jas imant naudoti atliekamam bandymui. Jos turėtų būti naudojamos iš karto po 7 dienas trukusio kondicionavimo laikotarpio, kuriuo baigiamas ruošimo etapas.

LITERATŪRA

Chapter C.8 of this Annex. Toxicity for Earthworms.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial MEDIA. Ecotox. and Environ. SAFEty 39: 10–20.

▼M4

4 priedėlis

Tinkamo skiedimo vandens cheminės charakteristikos

Cheminė medžiaga	Koncentracijos
Kietosios dalelės	< 20 mg/l
Bendroji organinė anglis	< 2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	< 1 mg/l
Kietumas (kaip $CaCO_3$)	< 400 mg/l (*)
Liekamasis chloras	< 10 mg/l
Suminis organinių fosforo pesticidų kiekis	< 50 ng/l
Suminis organinių chloro pesticidų ir polichlorintų bifenilų kiekis	< 50 ng/l
Suminis organinio chloro kiekis	< 25 ng/l

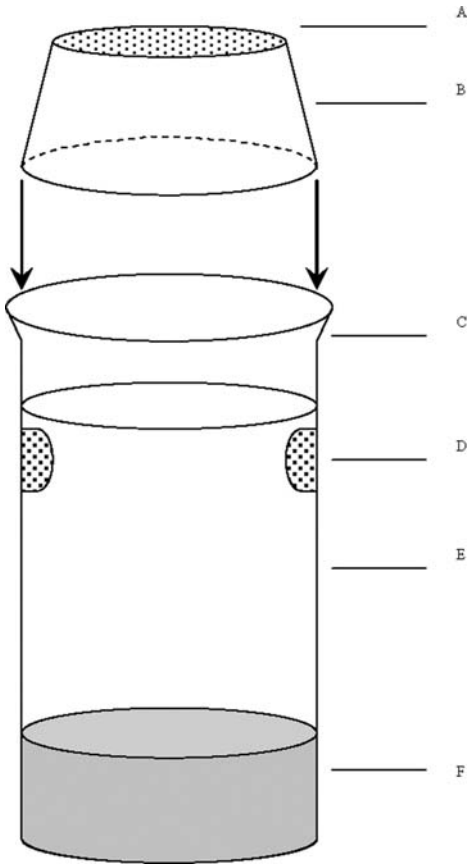
(*) Tačiau jeigu galima daryti prielaidą, kad vandens kietumo jonai gali sąveikauti su bandomąja chemine medžiaga, turėtų būti naudojamas mažesnio kietumo vanduo (vadinasi, šiuo atveju neleidžiama rinktis Elendt Medium M4).

▼M4

5 priedėlis

Chironomidų lervų išsiritimo stebėjimo gairės

Į bandymo stiklines įdedamos išsiritimo gaudyklės. Gaudyklės reikalingos nuo 20 dienos iki bandymo pabaigos. Gaudyklės brėžinio pavyzdys pateiktas toliau:



A: nailono ekranas

B: apversti plastiko gaubtai

C: bebriaunė laboratorinė poveikio stiklinė

D: vandens keitimo ekrano angos

E: vanduo

F: nuosėdos

▼M4

C.28. TOKSIŠKUMO BANDYMAS SU CHIRONOMIDAIS NUOSĖDOSE IR VANDENYJE, NAUDOJANT VANDENĮ SU ĮTERPTA BANDOMĄJA CHEMINE MEDŽIAGA

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka OECD bandymo gaires Nr. 219 (2004). Šiuo bandymo metodu siekiama įvertinti ilgalaikį cheminių medžiagų poveikį nuosėdose gyvenančioms gėlųjų vandenų dvisparnio vabzdžio *Chironomus* sp. lervoms. Šis metodas iš esmės pagrįstas BBA gairėmis; šiuo atveju naudojama nuosėdų—vandens sistema su dirbtiniu dirvožemiu ir vandens storymės poveikio scenarijumi (1). Atliekant šį bandymą taip pat atsižvelgiama į turimus toksiškumo bandymo su *Chironomus riparius* ir *Chironomus tentans* protokolus, kurie parengti Europoje (1) (2) (3) ir Šiaurės Amerikoje (4) (5) (6) (7) (8) ir patikrinti tarplaboratorinio lyginimo bandymais (1) (6) (9). Taip pat leidžiama naudoti kitas dvisparnių vabzdžių rūšis, pvz., *Chironomus yoshimatsui* (10) (11), kurios tinkamai pagrįstos dokumentais.

2. Taikant šį bandymo metodą kaip poveikio scenarijus pasirenkamas bandomosios cheminės medžiagos įterpimas į vandenį. Atitinkamo poveikio scenarijaus pasirinkimas priklauso nuo numatomo bandymo taikymo. Vandens poveikio scenarijumi, kai, be kita ko, į vandens storymę įterpiama bandomoji cheminė medžiaga, ketinama modeliuoti pesticidų sklidimą ir scenarijus apima pradines didžiausias koncentracijas porų vandenyje. Šis scenarijus taip pat taikytinas kitų poveikio tipų atvejais (įskaitant cheminių medžiagų išsiliejimą), išskyrus ilgiau negu bandymo laikotarpis trunkančius kaupimosi procesus.

3. Cheminės medžiagos, kurias būtina ištirti siekiant nustatyti jų poveikį nuosėdose gyvenantiems organizmams, paprastai šiame skyriuje išlieka ilgą laikotarpį. Nuosėdose gyvenančius organizmus galima veikti keliais būdais. Kiekvieno poveikio būdo santykinė svarba ir laikas, sugaištamas, kol taikant kiekvieną būdą užtikrinamas bendrasis toksiškas poveikis, priklauso nuo atitinkamos cheminės medžiagos fizinių ir cheminių savybių. Jei tai lengvai absorbuojamos cheminės medžiagos (pvz., kai $K_{ow} > 5$) ar kovalentiniais saitais su nuosėdomis susijusios cheminės medžiagos, užteršto maisto nurijimas galėtų būti tinkamas poveikio būdas. Siekiant, kad stipriomis lipofilinėmis savybėmis pasižyminčių cheminių medžiagų toksiškus būtų reikiamai vertinamas, galima svarstyti galimybę, ar nereikėtų į nuosėdas įterpti pašaro prieš taikant bandomąją cheminę medžiagą. Norint atsižvelgti į visus galimus poveikio būdus pagrindinis dėmesys taikant šį bandymo metodą skiriamas ilgalaikiam poveikiui. Bandymo trukmė naudojant *C. Riparius* ir *C. Yoshimatsui* yra 20–28 dienos ir 28–65 dienos, jeigu pasirenkama *C. tentans*. Jeigu konkrečiam tikslui, pvz., tiriant nestabilių cheminių medžiagų poveikį, būtini trumpalaikiai duomenys, papildomus kartotinius ėminius galima paimti po dešimties parų laikotarpio.

4. Išmatuotas poveikis yra bendras išsiritusių suaugusiųjų skaičius ir išsiritimo trukmė. Rekomenduojama, kad lervų išgyvenimo ir augimo rodikliai būtų matuojami tik po dešimties parų laikotarpio, jeigu būtini papildomi trumpalaikiai duomenys ir jeigu reikia naudoti papildomus pakartotinius ėminius.

5. Rekomenduojama naudoti sintetines nuosėdas. Sintetinės nuosėdos keliais atžvilgiais yra tinkamesnės negu natūralios nuosėdos:

— kintamumas darant bandymą yra sumažinamas, nes kintamumas sudaro atkuriamą „standartinę matricą“ ir nėra būtina nustatyti neužterštą ir švarų nuosėdų šaltinį,

— bandymus galima pradėti bet kuriuo metu ir nepaisyti bandomųjų nuosėdų sezoninio kintamumo bei šiuo atveju nebūtina iš anksto apdoroti nuosėdų, kad iš jų būtų pašalinta būdingoji fauna; naudojant sintetines nuosėdas taip pat sumažinamos išlaidos, išleidžiamos lauke renkant įprastiems bandymams reikalingą nuosėdų kiekį,

▼M4

— naudojant sintetines nuosėdas galima lyginti toksiškumą ir atitinkamai klasifikuoti chemines medžiagas: toksiškumo bandymų, kuriems naudotos natūralios ir dirbtinės nuosėdos, duomenys buvo lyginami atsižvelgiant į kelias chemines medžiagas (2).

6. Taikomų sąvokų apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMO METODO ESMĖ

7. Pirmos stadijos chironomidų lervos veikiamos tam tikros koncentracijos bandomąja chemine medžiaga nuosėdų-vandens sistemose. Pradėjus bandymą viena pirmosios stadijos lerva įdedama į bandymo stiklinę, kurioje yra nuosėdų–vandens sistema ir į kurios vandenį vėliau įleidžiama bandomosios cheminės medžiagos. Bandymo pabaigoje matuojama chironomidų išsinėrimo ir augimo sparta. Taip pat galima matuoti lervų išgyvenimą ir masę po 10 parų, jeigu reikia (naudojant kartotinius ėminius, kai būtina). Šie duomenys analizuojami taikant regresijos modelį ir siekiant įvertinti koncentraciją, kuri būtų x % sumažinusi lervų išsinėrimą, arba lervų išgyvenimą ar augimą (pvz., EC_{15}, EC_{50} ir t. t.) arba hipotezę tikrinant statistiniais kriterijais siekiant nustatyti NOEC/LOEC (stebimo poveikio nedarančią koncentraciją ir (arba) mažiausią stebimo poveikio koncentraciją). Pastaruoju atveju pasitelkus statistinius kriterijus poveikio vertes būtina lyginti su kontrolinėmis vertėmis.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

8. Turėtų būti žinomas bandomosios cheminės medžiagos tirpumas vandenyje, jos garų slėgis, išmatuotas ar apskaičiuotas nuosėdų susidarymas ir stabilumas vandenyje bei nuosėdose. Turėtų būti prieinamas analizės metodas kiekybiniam bandomosios cheminės medžiagos kiekiui nustatyti paviršiniame vandenyje, porų vandenyje ir nuosėdose su žinomu ir praneštu tikslumu bei aptikimo riba. Naudinga informacija laikytina bandomosios cheminės medžiagos struktūrinė formulė ir grynumas. Bandomosios cheminės medžiagos cheminis išliekamumas (pvz., išsklaidymas, abiotinis ir biotinis suirimas ir t. t.) taip pat laikytinas naudinga informacija. Išsamios bandomųjų cheminių medžiagų, su kurioms dėl jų fizinių ir cheminių savybių sunku daryti bandymą, gairės pateiktos (12).

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

9. Bandymus su etaloninėmis cheminėmis medžiagomis galima atlikti periodiškai ir juos darant būtų užtikrinama, kad bandymo protokolas ir bandymo sąlygos būtų patikimos. Etaloninės toksiškos medžiagos, tinkamos naudoti atliekant tarplaboratorinio lyginimo bandymus ir patvirtinimo tyrimus: lindanas, trifluralinas, pentachlorfenolis, kadmio chloridas ir kalio chloridas (1) (2) (5) (6) (13).

BANDYMO VALIDUMAS

10. Bandymas laikomas validuotu, jeigu taikomos šios sąlygos:

— lervų išsinėrimas kontroliniuose ėminiuose bandymo pabaigoje turi būti ne mažesnis negu 70 %; (1) (6),

— *C. riparius* ir *C. yoshimatsui* iš kontrolinių indų suaugėliais turėtų tapti 12–23 dienomis po lervų įleidimo į indus; *C. tentans*, šis laikotarpis turi būti 20–65 dienos,

— bandymo pabaigoje pH vertė ir ištirpusio deguonies koncentracija turėtų būti matuojama kiekviename inde; deguonies koncentracijos vertė esant naudojamai temperatūrai turėtų būti bent 60 % soties ore vertės ir paviršinio vandens pH vertė visuose bandymo induose turėtų atitikti 6–9 intervalą,

▼M4

— vandens temperatūra neturėtų skirtis daugiau negu ± 1,0 °C. Vandens temperatūrą galima reguliuoti naudojant izoterminę patalpą ir šiuo atveju patalpos temperatūra turėtų būti patvirtinama atitinkamais laiko intervalais.

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Bandymo indai

11. Tyrimas atliekamas naudojant 600 ml laboratorines stiklines (skersmuo 8 cm). Leidžiama rinktis kitus indus, tačiau juos naudojant turėtų būti užtikrinamas tinkamas paviršinio vandens ir nuosėdų storis. Nuosėdų paviršiaus plotas turėtų būti toks, kad vienai lervai tektų 2–3 cm^2. Nuosėdų storio ir paviršinio vandens sluoksnio storio santykis turėtų būti 1:4. Bandymo indai ir kiti įrenginiai, kurie liesis su bandymo sistema, turėtų būti vien iš stiklo ar kitos cheminiu atžvilgiu neutralios medžiagos (pvz., teflono).

Rūšių pasirinkimas

12. Renkantis atliekant bandymą naudojamą rūšį pirmenybė teikiama *Chironomus riparius*. Taip pat leidžiama naudoti *Chironomus tentans*, tačiau juos sunkiau prižiūrėti ir jiems būtinas ilgesnis bandymo laikotarpis. Be to, leidžiama naudoti *Chironomus yohimatsui*. Su *Chironomus riparius* susiję kultūrų auginimo metodai aprašyti 2 priedėlyje. Taip pat pateikiama informacija apie kitų rūšių, t. y. *Chironomus tentans* (4) ir *Chironomus yoshimatsui* (11), kultūrų auginimo sąlygos. Rūšies tapatybės nustatymas turi būti patvirtinamas prieš bandymą, tačiau patvirtinimas nėra būtinas prieš kiekvieną bandymą, jeigu organizmas paimtas iš vietoje išaugintos kultūros.

Nuosėdos

13. Pirmenybė teikiama pasiruoštoms nuosėdoms (jos dar vadinamos pertvarkytomis, dirbtinėmis ar sintetinėmis nuosėdomis). Tačiau jeigu naudojamos natūralios nuosėdos, turėtų būti nurodomos jų charakteristikos (bent pH, organinės anglies kiekis, kitų parametrų apibrėžtis, pvz., C/N santykis, ir taip pat rekomenduojama pateikti granuliometrinę sudėtį) ir nuosėdose neturi būti jokių teršalų ir kitų organizmų, kurie galėtų konkuruoti su chironomidais ar juos vartoti. Taip pat rekomenduojama, kad prieš pradedant nuosėdas naudoti toksiškumo bandymui su chironomidais, natūralios nuosėdos kondicionuojamos septynias dienas tomis pačiomis sąlygomis, kurios taikomos kitam bandymui. Atliekant šį bandymą (1) (15) (16) rekomenduojama naudoti iš dirbtinio dirvožemio, kuris naudojamas taikant bandymo metodą C.8 (14), pasiruoštas sintetines nuosėdas:

a) 4–5 % durpių (sausoji masė): pH vertė kiek įmanoma turi būti 5,5–6,0; privaloma naudoti smulkiai sumaltus (dalelių dydis ≤ 1 mm) durpių miltelius; jos turi būti džiovintos tik ore;

b) 20 % (sausoji masė) kaolino molio (pageidautina, kad kaolinito jame būtų daugiau kaip 30 %);

c) 75–76 % (sausoji masė) kvarcinio smėlio (smulkusis smėlis turėtų sudaryti didžiausią dalį, daugiau negu 50 % dalelių dydis 50–200 μm);

d) įpilama dejonizuoto vandens, kad galutiniame mišinyje drėgnumas sudarytų 30–50 %;

e) įdedama chemijos požiūriu gryno kalcio karbonato ($CaCO_3$), kad galutinio nuosėdų mišinio pH vertė būtų 7,0 ± 0,5;

f) galutinio mišinio sudėtyje turėtų būti be 2 % (± 0,5 %) organinės anglies ir jos kiekis turi būti koreguojamas atitinkamais durpių ir smėlio kiekiais atsižvelgiant į a–c.

▼M4

14. Turėtų būti žinomas durpių, kaolino molio ir smėlio gavimo šaltinis. Nuosėdų sudedamosios dalys turėtų būti patikrinamos, ar jose nėra cheminės taršos pėdsakų (pvz., sunkiųjų metalų, chlororganinių komponentų, fosfororganinių komponentų ir t. t.). Sintetinių nuosėdų pasiruošimo pavyzdys aprašytas 3 priedėlyje. Taip pat leidžiama maišyti sausąsias sudedamąsias dalis, jeigu įmanoma įrodyti, kad užpylus paviršinio vandens nėra atskiriamos nuosėdų sudedamosios dalys (pvz., neima plūduriuoti kietosios durpių dalelės) ir kad durpės ar nuosėdos yra kondicionuotos pagal reikalavimus.

Vanduo

15. Kaip bandymo vandenį leidžiama rinktis bet kokį vandenį, atitinkantį 2 ir 4 priedėliuose išvardytas skiedimui tinkamo vandens chemines savybes. Bet kokį tinkamą vandenį, natūralų vandenį (paviršinį ar gruntinį), regeneruotą vandenį (žr. 2 priedėlį) arba vandentiekio vandenį, iš kurio pašalintas chloras, leidžiama rinktis kaip kultūros auginimo vandenį ir bandymo vandenį, jeigu chironomidai jame be streso požymių išgyvena kultūros veisimo ir bandymo laikotarpiu. Bandymo vandens pH vertė pradedant bandymą turėtų būti 6–9, o bendrasis kietumas ne didesnis negu 400 mg/l kaip $CaCO_3$. Tačiau jeigu galima daryti prielaidą, kad vandens kietumo jonai gali sąveikauti su bandomąja chemine medžiaga, turėtų būti naudojamas mažesnio kietumo vanduo (vadinasi, šiuo atveju neleidžiama rinktis Elendt Medium M4). Atliekant tyrimą turėtų būti naudojamas to paties tipo vanduo. 4 priedėlyje išvardytų vandens kokybės charakteristikų vertės turėtų būti matuojamos ne rečiau negu du kartus per metus arba kilus įtarimui, kad šios charakteristikos yra gerokai pakitusios.

Pradiniai tirpalai. Vanduo su įterpta bandomąja chemine medžiaga

16. Bandymo koncentracijos apskaičiuojamos remiantis vandens storymės koncentracijomis, t. y. paviršiniu nuosėdų vandeniu. Pasirinktų koncentracijų bandomieji tirpalai paprastai pasiruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Pradiniai tirpalai visų pirmiausiai turėtų būti ruošiami bandomąją cheminę medžiagą tirpinant bandymo terpėje. Norint pasiruošti tinkamos koncentracijos pradinio tirpalo tam tikrais atvejais gali tekti naudoti tirpiklius ar dispergatorius. Tinkami tirpikliai – acetonas, etanolis, metanolis, metoksietanolis, etilenglikolio dimetileteris, dimetilformamidas ir trietilenglikolis. Naudotini dispergatoriai – „Cremophor RH40“, „Tween 80“, metilceliuliozė 0,01 % ir HCO-40. Soliubilizavimo priemonės koncentracija galutinėje bandymo terpėje turėtų būti kuo mažesnė (t. y. $\leq$ 0,1 ml/l) ir vienoda kiekvieną kartą veikiant bandomąja chemine medžiaga. Jeigu naudojama soliubilizavimo priemonė, ji neturi daryti jokio didesnio poveikio chironomidų lervų išgyvenimui arba akivaizdaus neigiamo poveikio šioms lervoms, kaip kad nustatoma darant kontrolinį bandymą vien tik su tirpikliu. Tačiau turėtų būti imamasi visų priemonių, kad šios medžiagos nebūtų naudojamos.

BANDYMO PLANAS

17. Sudarant bandymo planą pasirenkamos bandymo koncentracijos ir jų paskirstymas, kiekvienos koncentracijos indų skaičius ir lervų skaičius inde. Pateikiamas EC taško nustatymo, NOEC nustatymo ir ribos bandymo atlikimo aprašymas. Pirmenybė teikiama regresinei analizei, o ne hipotezės tikrinimo metodui.

Regresinės analizės planas

18. Bandymui naudotos koncentracijos būtinai turi aprėpti poveikio koncentraciją (pvz., EC_{15}, EC_{50}) ir dominančio medžiagos poveikio koncentracijos verčių diapazoną. Apskritai tikslumo ir ypač validumo vertes, kurias naudojant galima įvertinti poveikio koncentracijas (EC_X), įmanoma patikslinti, jeigu poveikio koncentracijos vertės atitinka bandymo koncentracijų intervalą. Nereikėtų ekstrapoliuoti gerokai mažesnių negu mažiausioji teigiamoji koncentracija arba didesnių negu didžiausioji koncentracija verčių. Pradinis

▼M4

intervalo nustatymo bandymas praverčia renkantis naudotinų koncentracijų intervalą (žr. 27 pastraipą).

19. Jeigu turi būti nustatomos poveikio koncentracijos (EC_x), turėtų būti atliekami bent penki bandymai naudojant kiekvieną koncentracijos vertę ir trys kartotiniai bandymai. Bet kuriuo atveju rekomenduojama naudoti pakankamą bandymo koncentracijų skaičių, kad būtų užtikrinamas reikiamas modelio įvertinimas. Koncentracijų koeficiento vertė neturėtų būti didesnė negu 2 (išimtį leidžiama taikyti tais atvejais, jeigu dozės ir reakcijos santykio kreivė turi nuolaidų statumą). Kartotinių ėminių skaičių atliekant kiekvieną apdorojimą galima mažinti, jeigu padidėja skirtingą atsaką sukeliančių bandymo koncentracijų skaičius. Didinant kartotinių ėminių skaičių arba mažinant bandymo koncentracijų intervalo ribas būtų taikomi siauresni bandymo pasikliovimo intervalai. Papildomi kartotiniai ėminiai būtini tuo atveju, jeigu būtina įvertinti 10 parų lervų išlikimą ir augimą.

NOEC/LOEC įvertinimo planas

20. Jeigu turi būti vertinama LOEC arba NOEC, turėtų būti naudojamos ne mažiau negu keturių kartotinių bandymų penkios bandomosios koncentracijos ir koncentracijų koeficiento vertė neturėtų viršyti 2. Kartotinių bandymų skaičius turėtų būti pakankamas siekiant užtikrinti reikiamą statistinę galią, kad būtų aptinkamas 20 % skirtumas nuo kontrolinio 5 % reikšmingumo lygmens (p = 0,05). Nustatant vystymosi greitį paprastai naudojama dispersinė analizė (ANOVA), pvz., Dunnett bandymas ir Williams bandymas (17) (18) (19) (20). Nustatant išskridimo normą galima naudoti Cochran-Armitage, Fisher (su Bonferroni pataisa) arba Mantel-Haentzal bandymus.

Ribinis bandymas

21. Ribinį bandymą galima atlikti (viena bandomoji koncentracija ir kontrolinis ėminys), jeigu darant pradinį intervalo nustatymo bandymą nebuvo nustatyta jokių poveikių. Atliekant ribinį bandymą siekiama nurodyti, kad toksinė bandomosios cheminės medžiagos vertė yra didesnė negu darant bandymą nustatyta ribinė koncentracija. Naudojant šį bandymo metodą negalima pateikti jokių pasiūlymų dėl rekomenduojamos koncentracijos; ši teisė suteikta pareigūnui. Paprastai būtini ne mažiau negu šeši pakartotiniai bandymai poveikiui bandomąja medžiaga ir kontroliniai bandymai. Turėtų būti įrodoma pakankama statistinė galia aptikti 20 % skirtumą nuo kontrolinės vertės esant 5 % reikšmingumo lygiui (p = 0,05). Jeigu atsakas nurodomas metriniais vienetais (vystymosi greitis ir masė), t-bandymas yra tinkamas statistinis metodas, jeigu duomenys atitinka šio bandymo reikalavimus (atitiktis, vienalytės dispersijos). Jeigu šių reikalavimų nesilaikoma, leidžiama naudoti nelygiavertės dispersijos t-bandymą arba ne parametrinį bandymą, pvz., Wilcoxon-Mann-Whithey bandymą. Nustatant išsinėrimo normą atliktinas Fisher bandymas.

PROCEDŪRA

Poveikio sąlygos

Vandens–nuosėdų sistemos su įterpta bandomąja chemine medžiaga paruošimas

22. Į bandymo indus įdedami atitinkami sintetinių nuosėdų kiekiai (žr. 13–14 dalis ir 3 priedėlį), kad būtų paruoštas ne plonesnis negu 1,5 cm sluoksnis. Vandens pilama tiek, kol nusistovi 6 cm vandens storymė (žr. 15 pastraipą). Nuosėdų sluoksnio ir vandens storymės santykis neturėtų viršyti 1:4 bei nuosėdų sluoksnio storis neturėtų būti didesnis negu 3 cm. Nuosėdų–vandens sistema prieš įdedant į ją bandomuosius gyvūnus turėtų būti švelniai aeruojama septynias dienas (žr. 14 pastraipą ir 3 priedėlį). Kad į vandens storymę pilant bandymo vandenį nuosėdų sudedamosios dalys neatsiskirtų ir kietosios dalelės vėl nebūtų suspenduojamos skystyje, nuosėdas leidžiama uždengti plastiko disku, kol vanduo pilamas ant nuosėdų, ir vėliau diskas nedelsiant nuimamas. Taip pat leidžiama naudoti kitus įtaisus.

▼M4

23. Bandymo indai turėtų būti uždengiami (pvz., stiklo plokštėmis) Jeigu būtina, atliekant tyrimą leidžiama įpilti vandens, kad būtų užtikrinamas pradinis vandens tūris ir kompensuojama išgaruojanti vandens dalis. Papildomai turėtų būti pilamas distiliuotas ar dejonizuotas vanduo siekiant užkirsti kelią, kad nesusidarytų druskos.

Bandomųjų organizmų įdėjimas

24. Keturias ar penkias dienas prieš bandomuosius organizmus įdedant į bandymo indus, kiaušinėlių masė turėtų būti paimama iš sėjimo kultūrų ir sudedama į mažus indus auginimo terpėje. Leidžiama naudoti iš kamieninės kultūros gautą terpę arba šviežią pasiruoštą terpę. Jeigu naudojama pastaroji, į auginimo terpę turėtų būti įdedamas mažas kiekis pašaro, pvz., žaliųjų dumblių ir (arba) įlašinami keli lašeliai smulkiai sumaltų žuvų maisto gabalėlių suspensijos filtrato (žr. 2 priedėlį). Turėtų būti naudojamos tik neseniai padėtų kiaušinėlių masės. Paprastai lervos ima ristis po kelių dienų nuo kiaušinėlių padėjimo (*Chironomus riparius* 20 °C temperatūroje išsirita per 2–3 dienas, *Chironomus tentans* 23 °C temperatūroje išsirita per 1–4 dienas ir *Chironomus yoshimatui* 25 °C temperatūroje) ir lervos augdamos pereina keturias stadijas, iš kurių kiekviena trunka 4–8 dienas. Atliekant bandymą turėtų būti naudojamos pirmosios stadijos lervos (2–3 arba 1–4 dienų po išsiritimo). Mašalų stadiją įmanoma nustatyti pagal galvutės apvalkalo plotį (6).

25. Pirmos stadijos dvidešimt lervų buka pipete atsitiktinai paskirstoma kiekvienam bandymo indui, kuriame yra nuosėdų su įterpta bandomąja chemine medžiaga ir vandens. Vandens aeravimas turi būti nutraukiamas, kol lervos dedamos į bandymo indą, ir ši būsena išlaikoma dar 24 valandas po lervų įdėjimo (žr. 24 ir 32 pastraipas). Pagal taikomą bandymo planą (žr. 19 ir 20 pastraipas) kiekviena koncentracija veikiama ne mažiau negu 60 lervų, jeigu nustatomas ES taškas, arba 80 lervų, jeigu apibrėžiama NOEC.

26. Po dvidešimt keturių valandų nuo lervų įdėjimo, į paviršinio vandens storymę įleidžiama bandomoji cheminė medžiaga ir vanduo vėl imamas šiek tiek aeruoti. Maži bandomosios cheminės medžiagos tirpalų kiekiai pipete įterpiami po vandens paviršiumi. Tada paviršinis vanduo turėtų būti išmaišomas (stengiamasi nesukelti nuosėdų).

Bandomosios koncentracijos

27. Intervalo nustatymo bandymas gali būti naudingas siekiant apibrėžti darant galutinį bandymą pasirinktinų koncentracijų intervalą. Šiuo tikslu naudojamos labai besiskiriančių bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų serijos. Siekiant užtikrinti galutiniam bandymui naudojamų chironomidų vienodą paviršiaus tankumą, jie veikiami kiekviena bandomosios cheminės medžiagos koncentracija tol, kol įvertinamos atitinkamos bandomosios koncentracijos ir kartotiniai ėminiai nėra reikalingi.

28. Atliekant galutinį bandymą naudojamos bandomosios koncentracijos pasirenkamos atsižvelgiant į intervalo nustatymo bandymo rezultatą. Turėtų būti naudojamos ne mažiau negu penkios koncentracijos kaip aprašyta 18–20 pastraipose.

Kontroliniai ėminiai

29. Kontrolinių ėminių indai be jokios bandomosios cheminės medžiagos, tačiau su nuosėdomis, turėtų būti naudojami atliekant bandymą su atitinkamu skaičiumi kartotinių ėminių (žr. 19–20 pastraipą) Jeigu taikant bandomąją cheminę medžiagą naudotas tirpiklis (žr. 16 pastraipą), turėtų būti įdedama tirpiklio kontrolinis ėminys.

▼M4

Bandymo sistema

30. Naudojama statinė sistema. Išskirtiniais atvejais leidžiama naudoti pusiau statines ar dinamines sistemas su trūkiuoju ar tolygiu paviršinio vandens atnaujinimu, pvz., jeigu vandens kokybės reikalavimai neatitinka taikomų bandomajam organizmui ar daro poveikį cheminei pusiausvyrai (pvz., ištirpusio deguonies lygiai pernelyg sumažėja, labai padidėja šalinimo produktų koncentracija arba iš nuosėdų ima sunktis mineralų skystis ir daro poveikį pH ir (arba) vandens kietumo vertėms. Tačiau paprastai pakanka kitų paviršinio vandens kokybės gerinimo metodų, pvz., aeracijos, ir jiems teiktina pirmenybė.

Pašaras

31. Lervas būtina šert; pageidautina kiekvieną dieną ar bent tris kartus per savaitę. Per pirmąsias 10 parų jaunoms lervoms per dieną turėtų pakakti 0,25–0,5 mg (*C. yoshimatui* lervoms 0,35–0,5 mg) žuvų maisto (vandens suspensija arba smulkiai sumaltas maistas, pvz., Tetra-Min arba Tetra-Phyll, išsami informacija pateikta 2 priedėlyje). Senesnėms lervoms reikia šiek tiek daugiau pašaro: likusiai bandymo daliai kiekvieną dieną lervoms turėtų pakakti 0,5–1 mg. Pašaro kiekis turėtų būti mažinamas visų poveikių bandomąja chemine medžiaga atvejais ir kontroliuojamas, jeigu nustatomas grybelio atsiradimas arba jeigu aptinkama, kad gaišta kontrolinės grupės gyvūnai. Jeigu grybelio augimo nepavyksta sustabdyti, bandymas turi būti pakartotas. Jeigu bandymai atliekami su lengvai absorbuojamomis cheminėmis medžiagomis (pvz., kai $K_{ow} > 5$) ar kovalentiniais saitais su nuosėdomis susijusiomis cheminėmis medžiagomis, išgyvenimui ir natūraliam augimui būtiną pašaro kiekį galima įterpti į sintetines nuosėdas prieš stabilizavimo laikotarpį. Šiuo tikslu turi būti naudojamas ne žuvų maistas, o augalinis pašaras, pvz., pridedama 0,5 % (sausoji masė) smulkiai sumaltų lapų, pvz., didžiosios dilgėlės (*Urtica dioeca*), baltojo šilkmedžio (*Morus alba*), persinio dobilo (*Trifolium repens*), daržinio špinato (*Spinacia oleracea*) arba galima naudoti kitą augalinę medžiagą (*Cerophyl* arba alfa celiuliozę).

Inkubacijos sąlygos

32. Rekomenduojama visų pirma 24 valandas po lervų įdėjimo nestipriai aeruoti bandymo indų paviršinį vandenį ir vėliau aeruojama per visą bandymo atlikimo trukmę (privaloma stebėti, ar ištirpusio deguonies koncentracijos vertė nėra mažesnė negu 60 % soties ore vertės (ASV)). Aeruojant naudojama stiklinė Pastero pipetė, pritvirtinta 2–3 cm virš nuosėdų sluoksnio (t. y. vienas ar keli burbulai per sek.). Darant bandymus su lakiosiomis cheminėmis medžiagomis galima apsispręsti ir neaeruoti nuosėdų–vandens sistemos.

33. Atliekant bandymą išlaikoma pastovi 20 °C (± 2 °C) temperatūra. Atliekant bandymą su *C. tentans* ir *C. yoshimatui* atitinkamai rekomenduojama pasirinkti 23 °C(± 2 °C) temperatūrą. Naudojamas 16 val. apšvietimo laikotarpis; šviesos intensyvumo vertės turėtų būti 500–1 000 liuksų.

Poveikio trukmė

34. Poveikis prasideda lervas įdėjus į indus su bandomąją chemine medžiaga ir kontrolinių ėminių indus. Jeigu naudojami *C. riparius* ir *C. yoshimatsui*, poveikio trukmė yra 28 dienos, o kai pasirenkama *C. tentans* – 65 dienos. Jeigu mašalai atsiranda anksčiau, bandymą galima nutraukti ne anksčiau negu po penkių dienų atsiradus paskutiniam kontrolinės grupės suaugusiajam.

STEBĖJIMAI

Lervų išsinėrimas

35. Nustatoma vystymosi trukmė ir bendras visų iki galo išsinėrusių mašalų patinų ir patelių skaičius. Patinėliai lengviau atpažįstami žiūrint į jų plunksniškus čiuptuvėlius.

▼M4

36. Bandymo indai turėtų būti stebimi bent tris kartus per savaitę siekiant nustatyti bet kokią neįprastą veikseną (pvz., nuosėdų susidarymą, neįprastą plūduriavimą) palyginti su kontroliniais indais. Numatomo lervų išsinėrimo laikotarpiu būtina skaičiuoti kasdieną atsirandančius mašalus. Kiekvieną dieną registruojami visi atsiradę mašalai ir nurodoma jų lytis. Nustačius tapatybę mašalai pašalinami iš indų. Turėtų būti registruojamos visos prieš užbaigiant bandymą padėtos kiaušinėlių masės ir po to pašalinamos, kad lervos pakartotinai nebūtų įdėtos į nuosėdas. Taip pat registruojamas matomų lėliukų skaičius, kurios nėra išsiritusios. Išsineriančių lervų skaičiavimo gairės pateiktos 5 priedėlyje.

Augimas ir išgyvenimas

37. Jeigu privaloma pateikti duomenis apie 10 parų lervų išlikimą ir augimą, iš pradžių turi būti įtraukiami papildomi bandymo indai, kad juos būtų galima naudoti vėliau. Šių papildomų indų nuosėdos sijojamos 250 μm sietu siekiant surinkti lervas. Gaišimo kriterijai yra nejudumas ar nepakankamas atsakas į mechaninius dirgiklius. Neatsigavusios lervos taip pat turėtų būti laikomos nugaišusiomis (bandymo pradžioje nugaišusios lervos galėjo būti žuvusios nuo mikrobų). Nustatoma bandymo inde išgyvenusių lervų sausoji masė (be pelenų) ir apskaičiuojama vidutinė pavienio indo sausoji masė. Tikslinga nustatyti, kurios stadijos yra išgyvenusi lerva; šiuo tikslu galima matuoti kiekvieno individo galvos apvalkalo plotį.

Analiziniai matavimai

Bandomosios cheminės medžiagos koncentracija

38. Bandymo pradžioje (geriausiai būtų vieną valandą po bandomosios cheminės medžiagos įterpimo) ir jo pabaigoje rekomenduojama analizuoti bent paviršinio vandens, porų vandens ir nuosėdų ėminius esant didžiausiai koncentracijai ir mažesnei koncentracijai. Nustačius bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją gaunama informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos elgseną ir (arba) pasiskirstymą vandens–nuosėdų sistemoje. Bandymo pradžioje imant nuosėdų ėminius gali būti padarytas poveikis bandymo sistemai (pvz., pašalinamos bandomosios lervos); vadinasi, turėtų būti naudojami papildomi bandymo indai siekiant bandymo pradžioje ir jį atliekant, jeigu reikia, atlikti analizinius nustatymus (žr. 39 pastraipą). Nuosėdų matavimų gali nereikėti atlikti, jeigu bandomosios cheminės medžiagos pasiskirstymas tarp vandens ir nuosėdų buvo aiškiai apibrėžtas atlikus vandens ir (arba) nuosėdų tyrimą palyginamomis sąlygomis (pvz., nuosėdų ir vandens santykis, poveikio tipas, organinės anglies kiekis nuosėdose).

39. Jeigu atliekami tarpiniai matavimai (pvz., 7 dieną) ir jeigu analizei atlikti reikalingi dideli ėminiai, kuriuos paėmus bandymo sistemai būtų padarytas poveikis, analiziniai nustatymai turėtų būti atliekami naudojant iš panašiai apdorotų papildomų bandymo indų paimtus ėminius (įskaitant bandomųjų organizmų buvimą), tačiau biologiniam stebėjimui nenaudotų indų.

40. Siekiant izoliuoti laisvąjį vandenį rekomenduojama 30 min. taikyti centrifugavimą, pvz., 10 000 g ir 4 °C. Tačiau jeigu įrodoma, kad bandomosios cheminės medžiagos filtrai neadsorbuoja, taip pat galima rinktis filtravimą. Tam tikrais atvejais gali nebūti įmanoma analizuoti porų vandens koncentracijų, nes ėminys yra pernelyg mažas.

▼M4

Fiziniai ir cheminiai parametrai

41. Tinkamu būdu turėtų būti matuojama bandymo induose esančio bandymo vandens pH, ištirpusio deguonies ir temperatūros vertės (žr. 10 pastraipą). Bandymo pradžioje ir jo pabaigoje turėtų būti matuojama kontrolinių ėminių ir vieno bandymo indo kietumo ir amoniako vertės esant didžiausiai koncentracijai.

DUOMENYS IR ATASKAITŲ TEIKIMAS

Rezultatų apdorojimas

42. Šio bandymo tikslas – nustatyti bandomosios cheminės medžiagos poveikį mašalų patelių ir patinėlių vystymosi greičiui ir bendram jų skaičiui, arba, jeigu atliekamas 10 parų bandymas, poveikį lervų išgyvenimui ir jų masei. Jeigu neturima duomenų apie statistiniu požiūriu skirtingą lyčių jautrumą, atliekant statistinę analizę patinėlių ir patelių rezultatus galima sujungti. Apie lyčių jautrumo skirtumus galima spręsti naudojant statistines priemones, pvz., atliekant χ^2-r × 2 lentelės bandymą. Jeigu reikia, po 10 parų turi būti nustatomas lervų išgyvenimas ir vidutinė kiekvieno indo sausoji masė.

43. Paviršinio vandens koncentracijomis išreikštos poveikio koncentracijos visų pirmiausiai apskaičiuojamos remiantis bandymo pradžioje išmatuotomis koncentracijomis (žr. 38 pastraipą).

44. Norint apskaičiuoti EC_{50} arba bet kokio kito EC_x taškinį įvertį indo statistinius duomenis leidžiama naudoti kaip patikimus kartotinius duomenis. Apskaičiuojant kiekvieno EC_x pasikliovimo intervalą turėtų būti atsižvelgiama į kiekvieno indo skirtingumą arba būti įrodoma, kad šis kintamumas yra toks mažas, kad jo galima nepaisyti. Jeigu modeliui taikomas mažiausiųjų kvadratų metodas, kiekvieno indo statistikos duomenims taikoma transformacija siekiant pagerinti dispersijos vienalytiškumą. Tačiau EC_x vertės turėtų būti apskaičiuojamos atsaką transformavus į pradinę vertę.

45. Jeigu taikant statistinę analizę siekiama apibrėžti NOEC/LOEC ir šiuo tikslu tikrinama hipotezė, turi būti atsižvelgiama į su indais susijusį skirtingumą, pvz., įterpiant ANOVA. Antraip jeigu susiklosto situacijos, kad įprastos ANOVA prielaidos gali būti pažeidžiamos, galima naudoti išsamesnius bandymus (21).

Išsinėrimo santykis

46. Išsinėrimo santykiai yra kiekybiniai duomenys ir juos galima analizuoti atliekant Cochran-Armitage bandymą, taikomą mažėjimo tvarka, jeigu laikoma, kad dozės ir atsakos santykis būsiąs monotoniškas ir šie duomenys atitinka minėtą prielaidą. Jeigu ne, šiuo atveju leidžiama rinktis Fisher arba Mantel-Haentzal bandymą su pakoreguotomis pagal Bonferroni-Holm p vertėmis. Jeigu turima įrodymų, kad naudojant tą pačią koncentraciją kartotinių ėminių kintamumas yra didesnis negu būtų galima nustatyti atsižvelgiant į binominį skirstinį (dažnai vadinamą „pertekline dispersija“), šiuo atveju turėtų būti pasirenkamas (21) pasiūlytas išsamus Cochran-Armitage arba Fisher bandymas.

47. Viename inde išsiritusių mašalų skaičius ne nustatomas ir dalinamas iš įdėtų lervų skaičiaus n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼M4

kur:

ER = išsinėrimo santykis

n_e = viename inde išsinėrusių mašalų skaičius

n_a = į indą įdėtų lervų skaičius

48. Jeigu ėminiai yra dideli ir jeigu nustatoma perteklinė dispersija, šiuo atveju galima rinktis kitą alternatyvą, t. y. išsinėrimo santykį laikyti nenutrūkstamuoju atsaku ir rinktis Williamso bandymą, jeigu daroma prielaida, kad atsakas į dozę būsiąs monotoninis ir atitiksiąs šiuos ER duomenis. Jeigu monotoniškumas nėra užtikrinamas, pirmenybė teiktina Duneto bandymui. Didelio ėminio dydis šiuo atveju apibrėžiamas išsinėrusių mašalų ir neišsinėrusių mašalų skaičiumi, kuris abiem atvejais viršija penkis, atsižvelgiant į kartotinį ėminį (indą).

49. Norint taikyti ANOVA metodų vertes, ER vertės pirmiausiai turėtų būti transformuojamos naudojant arksinuso kvadratinės šaknies transformaciją arba Tukey-Freeman transformaciją siekiant gauti apytikslį įprastą skirstinį ir suvienodinti dispersijas. Leidžiama naudoti Cochran-Armitage, Fisherio (Bonferroni) arba Mantel-Haentzal bandymus, jeigu taikomi absoliutieji dažniai. Arksinuso kvadratinės šaknies transformacija taikoma pasirenkant ER vertės kvadratinės šaknies arksinusą ($\sin^{-1}$).

50. Išsinėrimo santykių EC_x vertės apskaičiuojamos naudojant regresijos analizę (arba, pvz., probit (22), logit, Weitbull, atitinkamą komercinę programinę įrangą ir t. t.). Jeigu regresijos analizė nepavyksta (pvz., jeigu tėra mažiau negu du daliniai atsakai), naudojami kiti ne parametriniai metodai, pvz., slankiojo vidurkio metodas ar interpoliacijos metodas.

Vystymosi greitis

51. Vidutinė vystymosi trukmė yra vidutinis laikotarpis nuo lervų įdėjimo (nulinė bandymo diena) ir iki eksperimentinės mašalų kohortos išsinėrimo. (Apskaičiuojant tikrąją vystymosi trukmę turėtų būti atsižvelgiama į lervų amžių, kai jos buvo įdedamos). Vystymosi greitis yra atvirkštinis dydis vystymosi trukmės atžvilgiu (vienetas: 1/diena) ir atitinka tą lervos vystymosi atkarpą, kuris vyksta per vieną dieną. Vystymosi greičiui, palyginti su šių nuosėdų toksiškumo tyrimų įvertinimu, teikiama pirmenybė, nes jo dispersija yra mažesnė, ir jis vienalytiškesnis bei glaudžiau atitinka įprastą pasiskirstymą, jeigu lyginama su vystymosi trukme. Vadinasi, leidžiama veikiau rinktis patikimą parametrinį bandymą su vystymosi greičiu negu su vystymosi trukme. Vystymosi greičio kaip nenutrūkstamo atsako EC_x vertes galima įvertinti naudojant regresijos analizę (pvz., (23), (24)).

52. Atliekant šiuos statistinius tyrimus laikoma, kad tikrinimo x dieną pastebėtas mašalų skaičius išsinėrė per vidutinį laiko intervalą nuo x dienos iki x-1 dienos (l = tikrinimo intervalo trukmė (paprastai viena diena)). Vienam indui taikoma vidutinė vystymosi greičio vertė (x) apskaičiuojama pagal šią lygtį:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

kur:

$\bar{x}$: indui taikoma vidutinė vystymosi greičio vertė

i: tikrinimo intervalo indeksas

m: didžiausias tikrinimo intervalų skaičius

▼M4

f_i: per tikrinimo intervalą i išsinėrusių mašalų skaičius

n_e: bendras eksperimento pabaigoje išsinėrusių mašalų skaičius ($=\sum f_i$)

x_i: per intervalą i išsinėrusių mašalų vystymosi greitis

$$x_i = 1/\left(\text{diena}_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

kur:

diena_i: tikrinimo diena (diena po poveikio)

l_i: tikrinimo intervalo i trukmė (dienos, paprastai 1 diena)

Bandymo ataskaita

53. Į bandymo ataskaitą turi būti įtraukiama bent ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— fizinis pobūdis ir, jeigu reikia, fizinės bei cheminės savybės (tirpumas vandenyje, garų slėgis, pasiskirstymo dirvoje koeficientas (ar nuosėdose, jeigu žinomas), stabilumas vandenyje ir t. t.),

— cheminės tapatybės nustatymo duomenys (bendrinis pavadinimas, cheminis pavadinimas, struktūrinė formulė, CAS numeris ir t. t.), įskaitant grynumą ir analinės metodas atliekant bandomosios cheminės medžiagos kiekybinį nustatymą.

Bandomosios rūšys:

— naudojami bandomieji gyvūnai: rūšis, mokslinis pavadinimas, organizmo gavimo šaltinis ir veisimo sąlygos,

— informacija apie kiaušinėlių masės ir lervų tvarkymą,

— gyvūnų amžius, kai jie buvo įdėti į bandymo indus.

Bandymo sąlygos:

— naudotos nuosėdos, t. y. natūralios ar sintetinės nuosėdos,

— jei naudojamos natūralios nuosėdos, nuosėdų ėminių ėmimo vieta ir jos aprašymas, įskaitant, jeigu įmanoma, taršos aprašas; charakteristikos: pH, organinės anglies kiekis, C/N santykis ir granuliometrinė analizė (jeigu reikia),

— sintetinių nuosėdų pasiruošimas: sudedamosios dalys ir charakteristikos (organinės anglies kiekis, pH, drėgmė ir t. t. bandymo pradžioje),

— bandymo vandens pasiruošimas (jeigu naudojamas regeneruotas vanduo) ir charakteristikos (deguonies koncentracija, pH. Laidumas, kietumas ir t. t. bandymo pradžioje),

— nuosėdų ir vandens sluoksnių storis,

— paviršinio vandens ir porų vandens tūris; drėgnųjų nuosėdų masė su porų vandeniu ir be jo,

— bandymo indai (medžiaga ir dydis),

— pradinių tirpalų ruošimo metodai ir bandomosios koncentracijos,

▼M4

— bandomosios cheminės medžiagos taikymas: naudotos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, kartotinių ėminių skaičius ir naudoti tirpikliai, jeigu buvo naudoti,

— inkubacijos sąlygos: temperatūra, šviesos ciklas ir intensyvumas, aeracija (dažnumas ir intensyvumas),

— išsami informacija apie pašarą, įskaitant jo tipą, paruošimą, kiekį ir maitinimo tvarką.

Rezultatai:

— nominaliosios bandomosios koncentracijos, išmatuotos bandomosios koncentracijos ir visų analizių rezultatai siekiant bandymo inde nustatyti bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją,

— vandens kokybė bandymo induose, t. y. pH, temperatūra, ištirpęs deguonis, kietumas ir amoniako kiekis,

— išgaruojančio bandymo vandens papildymas, jeigu taikoma,

— iš kiekvieno indo per dieną išsinėrusių mašalų patinų ir patelių skaičius,

— lervų, kurios iš indo neišsinėrė kaip mašalai, skaičius,

— vidutinė pavienė lervų sausoji masė inde ir tam tikros stadijos lervų sausoji masė inde, jeigu reikia,

— išsinėrusių mašalų skaičius atliekant tapatų bandymą ir bandomoji koncentracija (mašalų patinėlių ir patelių skaičius sujungtas),

— atliekant tapatų bandymą išsinėrusių mašalų vidutinis vystymosi greitis ir apdorojimo norma (mašalų patinėlių ir patelių skaičius sujungtas),

— toksinio poveikio įvertinimai, pvz., EC_x (ir susiję pasikliovimo intervalai), NOEC ir (arba) LOEC bei jiems nustatyti naudoti statistikos metodai,

— rezultatų aptarimas, įskaitant bet kokį poveikį bandymo rezultatams, kuris būtų padarytas nukrypus nuo šio bandymo metodo.

LITERATŪRA

1. BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

2. Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

3. SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

4. ASTM International/E1706–00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125–1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

5. Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

6. US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼M4

7. US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

8. US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

9. Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS (1996). Recent intra- and interlaboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

10. Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.

11. Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47–57.

12. OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and SAFEty Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

13. Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

14. Šio priedo C.8 skyrius. Toksiškumas sliekams.

15. Suedel BC and Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.

16. Naylor C and Rodrigues C (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

17. Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096–1121.

18. Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482–491.

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

20. Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510–531.

21. Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48:577–585.

22. Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.

23. Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485–1494.

24. Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

▼**M4**

1 priedėlis

SĄVOKŲ APIBRĖŽTYS

Šiame metode vartojamų terminų apibrėžtys:

Pasiruoštosios nuosėdos ar regeneruotos, dirbtinės arba sintetinės nuosėdos yra natūralių nuosėdų fizines sudedamąsias dalis atitinkančių medžiagų mišinys.

Paviršinis vanduo – bandymo inde ant nuosėdų užpiltas vanduo.

Laisvasis vanduo ar porų vanduo – ertmes tarp nuosėdų ir dirvožemio kietųjų dalelių užpildantis vanduo.

Vanduo su įterpta bandomąja chemine medžiaga – bandymo vanduo, į kurias prileista bandomosios cheminės medžiagos.

Bandomoji cheminė medžiaga – bet kokia naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga ar mišinys.

▼M4

2 priedėlis

Rekomendacijos dėl *Chironomus riparius* auginimo

1. *Chironomus* lervas galima auginti kristalizatoriuose ar didelėse talpyklose. Ant talpyklos dugno plonu sluoksniu (5–10 mm storio) paskleidžiamas smulkus kvarco smėlis. Taip pat įrodyta (pvz., Merck, Art 8117), kad diatomitas yra tinkamas substratas (pakanka plonesnio sluoksnio, vos kelių mm storio). Po to įpilamas kelių centimetrų storio vandens sluoksnis. Jeigu reikia, įpilama papildomo vandens, kad būtų atkuriamas išgaravęs kiekis ir užkertamas kelias džiuvimui. Jeigu reikia, vandenį leidžiama pakeisti. Turėtų būti užtikrinamas nuosaikus aeravimas. Lervų auginimo indai turėtų būti laikomi tinkamuose narvuose, kad išsinėrę suaugusieji vabzdžiai nepajėgtų pasprukti. Narvas turėtų būti ganėtinai erdvus, kad galėtų spiestis išsinėrę suaugusieji vabzdžiai; antraip populiacija gali nesusiformuoti (mažiausi matmenys yra 30 × 30 × 30 cm).

2. Narvai turėtų būti laikomi kambario temperatūroje arba pastovių aplinkos sąlygų patalpoje 20 ± 2 °C temperatūroje; šviesiojo laikotarpio trukmė 16 val. (šviesos intensyvumas apie 1 000 liuksų), 8 val. tamsos. Parengta ataskaitų, kuriose nurodoma, kad jeigu oro drėgnumas yra mažesnis negu 60 % RH, gali sumažėti reprodukcija).

Skiedimo vanduo

3. Leidžiama naudoti bet kokį tinkamą natūralų ar sintetinį vandenį. Paprastai naudojamas šulinio vanduo, vanduo, iš kurio pašalintas chloras, ir dirbtinės terpės (pvz., Elendt „M4“ arba „M7“ priemonė, žr. toliau). Prieš naudojant vanduo turi būti aeruojamas. Jeigu būtina, kultūrų auginimo vandenį leidžiama atnaujinti pilant panaudotą vandenį iš kultūrų auginimo indų ar jį leidžiant per sifoną; būtina stengtis nepažeisti lervų vamzdžių.

Lervų šėrimas

4. *Chironomus* lervos turėtų būti šeriamos žuvų maisto dribsniais (Tetra Min®, Tetra Phyll® arba kita panašia patentuota žuvų maisto rūšimi); vienam indui per dieną skiriama apie 250 mg pašaro. Maistą galima pateikti sausą, sumaltą milteliais arba kaip vandens suspensiją: 1,0 g maisto dribsnių įdedama į 20 ml skiedimo vandens ir išmaišoma, kol gaunamas vienalytis mišinys. Šio ruošinio apie 5 ml per dieną leidžiama įdėti į kiekvieną indą (prieš naudojant būtina pakratyti). Vyresnėms lervoms būtina duoti daugiau pašaro.

5. Šėrimas koreguojamas atsižvelgiant į vandens kokybę. Jeigu auginimo terpė „susidrumsčia“, duodamo pašaro kiekis turėtų būti sumažinamas. Duodamo pašaro kiekiai turi būti kruopščiai stebimi. Jeigu duodamas per mažas pašaro kiekis, lervos persikelia į vandens storymę, o skiriant per daug pašaro suintensyvėja mikroorganizmų veikla ir sumažėja deguonies koncentracija. Abiejų tipų sąlygomis gali sumažėti augimo greitis.

6. Ruošiant naujus kultūrų auginimo indus į juos taip pat galima šiek tiek įdėti žaliųjų dumblių (pvz., *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

Išsinėrusių suaugusiųjų mašalų šėrimas

7. Kai kurie tyrinėtojai pasiūlė, kad išsinėrusius suaugusius mašalus būtų galima šerti naudojant prisotintame sacharozė tirpale išmirkytus vilnos tamponus.

▼M4

Lervų išsinėrimas

8. Suaugę mašalai ima rastis iš lervų auginimo indų po 13–15 dienų 20 ± 2 °C temperatūroje. Patinėliai lengviau atpažįstami žiūrint į jų plunksniškus čiuptuvėlius.

Kiaušinėlių masė

9. Kol suaugę mašalai būna veisimo narve, visi lervų auginimo indai turėtų būti tikrinami tris kartus per savaitę, ar juose nėra drebučių pavidalo kiaušinėlių masės. Jeigu randama šios kiaušinėlių masės, ji turėtų būti atsargiai pašalinta. Kiaušinėliai turėtų būti sudedami į mažą indelį su veisimo vandens ėminiu. Kiaušinėlių masė naudojama pradedant inde auginti naują kultūrą (pvz., 2–4 kiaušinėlių masė viename inde) arba atliekant toksiškumo bandymus.

10. Pirmos stadijos lervos turėtų išsiristi po 2–3 dienų.

Naujų kultūrų auginimo indų ruošimas

11. Išauginus kultūras turėtų būti įmanoma kiekvieną savaitę ar rečiau paruošti naują lervų kultūros auginimo indą atsižvelgiant į bandymo atlikimo reikalavimus ir pašalinant senesnius indus, kai išsineria suaugę mašalai. Taikant šią sistemą mažomis pastangomis reguliariai tiekiami suaugę mašalai.

Bandymo tirpalų „M4“ ir „M7“ ruošimas

12. Elendtas (1990) aprašė „M4“ terpę. „M7“ terpė ruošiama kaip „M4“ terpė, išskyrus 1 lentelėje išvardytas chemines medžiagas, kurių koncentracijos „M7“, palyginti su „M4“, yra keturis kartus mažesnės. Leidinys apie „M7“ terpę yra rengiamas (Elendto pateiktas pranešimas). Bandomasis tirpalas neturėtų būti ruošiamas pagal Elendtą ir Bias (1990), jeigu norima gauti $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 ir K_2HPO_4 koncentracijas, nes pradinių tirpalų ruošimas nėra tapati veikla.

Terpės „M7“ ruošimas

13. Kiekvienas pradinis tirpalas (I) paruošiamas atskirai ir iš šių pradinių tirpalų (I) paruošiamas kombinuotasis pradinis tirpalas (II) (žr. 1 lentelę). 50 ml kombinuotojo pradinio tirpalo (II) ir 2 lentelėje nurodyti kiekvieno makroelementų pradinio tirpalo kiekiai skiedžiami iki 1 litro dejonizuoto vandens, kad taip būtų pasiruošta „M7“ terpė. Vitaminų pradinis tirpalas pasiruošiamas į dejonizuotą vandenį įmaišius tris vitaminus kaip nurodyta 3 lentelėje ir 0,1 ml kombinuotojo vitaminų pradinio tirpalo įmaišoma į galutinę „M7“ terpę prieš pat naudojimo pradžią. (Vitaminų pradinis tirpalas laikomas sušaldytas mažomis alikvotinėmis dalimis). Terpė aeruojama ir stabilizuojama.

1 lentelė

M4 ir M7 terpei skirtų mikroelementų pradiniai tirpalai

Pradiniai tirpalai (I)	Kiekis (mg), praskiedžiamas iki 1 litro dejonizuoto vandens	Ruošiant kombinuotą pradinį tirpalą (II): maišomi nurodyti pradinių tirpalų (I) kiekiai (mg) ir praskiedžiami iki 1 litro dejonizuoto vandens		Galutinės bandomųjų tirpalų koncentracijos (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Pradiniai tirpalai (I)	Kiekis (mg), praskiedžiamas iki 1 litro dejonizuoto vandens	Ruošiant kombinuotą pradinį tirpalą (II): maišomi nurodyti pradinių tirpalų (I) kiekiai (mg) ir praskiedžiami iki 1 litro dejonizuoto vandens		Galutinės bandomųjų tirpalų koncentracijos (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Šios medžiagos skiriasi M4 ir M7 kaip pirmiau nurodyta.
(2) Šie tirpalai ruošiami atskirai, tada sumaišomi ir nedelsiant apdorojami autoklave.

2 lentelė

M4 ir M7 terpėms skirti makroelementų pradiniai tirpalai

	Kiekis praskiedžiamas iki 1 litro dejonizuoto vandens (mg)	Ruošiant M4 ir M7 terpę įdedamas makroelementų pradinių tirpalų kiekis (ml/l)	Galutinės bandomųjų tirpalų M4 ir M7 koncentracijos (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

3 lentelė

M4 ir M7 terpei skirtas vitaminų pradinis tirpalas

Visi trys vitaminų tirpalai maišomi siekiant paruošti vieną vitaminų pradinį tirpalą.

	Kiekis praskiedžiamas iki 1 litro dejonizuoto vandens (mg)	Ruošiant M4 ir M7 terpę įdedamas vitaminų pradinio tirpalo kiekis (ml/l)	Galutinės bandomųjų tirpalų M4 ir M7 koncentracijos (mg/l)
Tiamino hidrochloridas	750	0,1	0,075
Ciankobalaminas (B12)	10	0,1	0,0010
Biotinas	7,5	0,1	0,00075

LITERATŪRA

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Elendt BP and Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

▼M4

3 priedėlis

SINTETINIŲ NUOSĖDŲ RUOŠIMAS

Nuosėdų sudėtis

Sintetinės nuosėdos turėtų būti sudarytos iš šių sudedamųjų dalių:

Sudedamoji dalis	Charakteristikos	nuosėdų sausosios procentinė dalis)
Durpės	Naujosios Zelandijos kiminų durpės, jų pH kiek įmanoma atitinka 5,5–6,0, jokių augalų matomų liekanų, smulkiai sumaltos (kietųjų dalelių dydis ≤ 1 mm), džiovintos ore	4–5
Kvarcinis smėlis	Grūdelių dydis: > 50 % dalelių dydžio vertės intervalas turėtų būti 0–200 μm	75–76
Kaolito molis	Kaolinito kiekis ≥ 30 %	20
Organinė anglis	Pakoreguota pridedant durpių ir smėlio	2 (±0,5)
Kalcio karbonatas	$CaCO_3$, milteliai, cheminiu atžvilgiu grynas	0,05–0,1
Vanduo	Laidumas ≤ 10 μS/cm	30–50

Pasiruošimas

Durpės džiovinamos ore ir malamos tol, kol gaunami smulkūs milteliai. Suspensija iš nustatyto durpių miltelių kiekio ir dejonizuoto vandens pasiruošiama didelio našumo homogenizavimo įrenginiu. Naudojant $CaCO_3$ koreguojama, kad šios suspensijos pH vertė būtų 5,5 ± 0,5. Švelniai maišant suspensija kondicionuojama ne trumpiau negu dvi dienas 20 ± 2 °C temperatūroje siekiant stabilizuoti pH ir paruošti stabilią mikroorganizmų populiaciją. pH matuojama dar kartą ir jo vertė turėtų būti 6,0 ± 0,5. Tada durpių suspensija maišoma su kitomis sudedamosiomis dalimis (smėliu ir kaolino moliu) ir dejonizuotu vandeniu siekiant gauti vienalytes nuosėdas, kuriose vandens kiekis sudaro 30—50 % sausosios masės. Dar kartą matuojama galutinio mišinio pH vertė ir, jeigu reikia, naudojant $CaCO_3$ koreguojama, kol pH vertė ima atitikti 6,5–7,5 vertę. Imami nuosėdų ėminiai siekiant nustatyti sausąją masę ir organinės anglies kiekį. Taip pat rekomenduojama, kad prieš pradedant nuosėdas naudoti chironomidų toksiškumo bandymui, sintetinės nuosėdos būtų kondicionuojamos septynias dienas tomis pačiomis sąlygomis, kurios taikomos kitam bandymui.

Sandėliavimas

Sintetinių nuosėdų ruošimo visas sudedamąsias sausas dalis galima laikyti sausoje ir vėsioje vietoje kambario temperatūroje. Sintetinės (drėgnos) nuosėdos neturėtų būti sandėliuojamos prieš jas imant naudoti atliekamam bandymui. Jos turėtų būti naudojamos iš karto po 7 dienas trukusio kondicionavimo laikotarpio, kuriuo baigiamas ruošimo etapas.

LITERATŪRA

Chapter C.8 of this Annex. Toxicity for Earthworms.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial MEDIA. Ecotox. and Environ. SAFEty 39: 10–20.

▼M4

4 priedėlis

Tinkamo skiedimo vandens cheminės charakteristikos

Cheminė medžiaga	Koncentracijos
Kietosios dalelės	< 20 mg/l
Bendroji organinė anglis	< 2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	< 1 mg/l
Kietumas (kaip $CaCO_3$)	< 400 mg/l (*)
Liekamasis chloras	< 10 mg/l
Suminis organinių fosforo pesticidų kiekis	< 50 ng/l
Suminis organinių chloro pesticidų ir polichlorintų bifenilų kiekis	< 50 ng/l
Suminis organinio chloro kiekis	< 25 ng/l

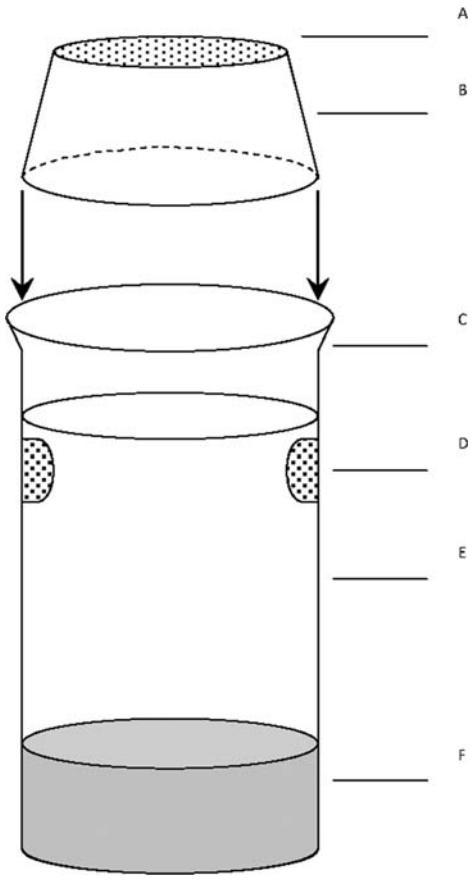
(*) Tačiau jeigu galima daryti prielaidą, kad vandens kietumo jonai gali sąveikauti su bandomąja chemine medžiaga, turėtų būti naudojamas mažesnio kietumo vanduo (vadinasi, šiuo atveju neleidžiama rinktis Elendt Medium M4).

▼M4

5 priedėlis

Chironomidų lervų išsiritimo stebėjimo gairės

Į bandymo stiklines įdedamos išsiritimo gaudyklės. Gaudyklės reikalingos nuo 20 dienos iki bandymo pabaigos. Gaudyklės brėžinio pavyzdys pateiktas toliau:



A: nailono ekranas

B: apversti plastiko gaubtai

C: bebriaunė laboratorinė poveikio stiklinė

D: vandens keitimo ekrano angos

E: vanduo

F: nuosėdos

▼M4

C.29. LENGVAS BIOLOGINIS SKAIDUMAS. CO_2 SANDARIUOSE INDUOSE (VIRŠUTINĖS ERDVĖS TYRIMAS)

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka OECD bandymo gaires (TG) Nr. 310 (2006). Šis metodas yra atrankos metodas, kurį naudojant įvertinamas lengvas biologinis cheminių medžiagų skaidumas, ir pateikiama panaši informacija šešiems bandymo metodams, aprašytiems šio priedo C.4 skirsnyje A–F dalyse. Todėl cheminę medžiagą, kurios rezultatai pagal šį bandymo metodą yra teigiami, galima laikyti lengvai biologiškai skaidoma ir, vadinasi, sparčiai suyrančia aplinkoje.

2. Bandant mažai tirpias chemines medžiagas ir gerai adsorbuojamas medžiagas, pirmiausiai būtų pasirenkamas gerai paruoštas anglies dioksido (CO_2) metodas (1), pagrįstas Sturmo originaliu bandymu (2), kuriuo organinių cheminių medžiagų biologinis skaidumas vertinamas matuojant anglies dioksidą, kurį išskiria mikroorganizmai. Šis metodas taip pat pasirenkamas tiriant tirpiąsias (tačiau ne lakiąsias) chemines medžiagas, nes anglies dioksido išsiskyrimą daugelis specialistų laiko vieninteliu akivaizdžiu mikroorganizmų veiklos įrodymu. Ištirpusią organinę anglį galima šalinti taikant fizinius–cheminius procesus – adsorbciją, lakiųjų junginių šalinimą, nusodinimą, hidrolizę – bei naudojant mikroorganizmų veiklą ir daugelį ne biologinių reakcijų, kurioms vykstant naudojamas deguonis; retais atvejais CO_2 iš organinių cheminių medžiagų išsiskiria vykstant abiotiniams procesams. Naudojant originalų ir modifikuotą Sturmo bandymą (1) (2) CO_2 į absorbuojantį indą iš skystosios fazės pašalinamas naudojant borbatavimą (t. y. pučiant oro burbulus, kad CO_2 būtų šalinamas per skystą terpę), o pasirinkus Larsono (3) (4) CO_2 versiją CO_2 iš reakcijos indo į absorberius perkeliamas per viršutinės erdvės orą, kuriame nėra CO_2, ir, be to, nenutrūkstamai kratant bandymo indą. Reakcijos indas yra kratomas tik naudojant Larsono modifikaciją; maišymas nurodomas tik netirpiosioms cheminėms medžiagoms (žr. standartą ISO 9439 (5)) ir originalioje JAV versijoje (6); abiejuose nurodomas veikiau borbatavimas negu viršutinės erdvės pakeitimas. Kitame oficialiame JAV EPA metode (7), pagrįstame Gledhillo metodu (8), kratomas reakcijos indas užsandarinamas nuo atmosferos ir išsiskyręs CO_2 surenkamas vidinėje šarminėje gaudyklėje tiesiogiai iš dujinės fazės, kaip įprastose Warburg/Barcroft respiratorinėse kolbose.

3. Tačiau įrodyta, kad įprastą, modifikuotą Sturmo bandymą atliekant su tam tikromis cheminėmis medžiagomis (9), neorganinė anglis (IC) kaupiasi terpėje. Skaidant 20 mg C/l anilino nustatyta, kad IC koncentracija buvo gana didelė, t. y. 8 mg/l. Vadinasi, šarminėse gaudyklėse surenkamas CO_2, iš tikrųjų neatitina viso to CO_2 kiekio, kuris mikrobiologiškai išskiriamas tarpiniais laikotarpiais, kai vyksta skaidymas. Todėl reikalavimas, kad > 60 % teorinio didžiausio CO_2 išsiskiriančio $ThCO_2$) kiekio turi būti surenkama per „10 parų langą“ (10 parų iš karto po to, kai užtikrinamas 10 % biologinis skaidymas), jeigu bandomąją cheminę medžiagą ketinama laikyti lengvai biologiškai skaidoma, nebūtų taikomas tam tikroms cheminėms medžiagoms, kurios būtų klasifikuojamos atsižvelgiant į šalinamą ištirpusios organinės anglies (DOC) kiekį.

4. Jeigu procentinė skaidymo dalis yra mažesnė negu tikėtasi, IC, ko gero, kaupiasi bandomajame tirpale. Vadinasi, skaidomumą galima nustatyti taikant kitus lengvo biologinio skaidumo bandymus.

▼M4

5. Kiti Sturmo metodikos trūkumai (nepatogi, reikia gaišti daug laiko, lengvai įmanoma padaryti eksperimentinę klaidą ir netaikoma lakiosioms cheminėms medžiagoms) jau anksčiau paskatino kurti sandariųjų indų metodiką, tačiau ne Gledhillo, o veikiau pratekančių dujų (10) (11). Boatman ir kt. (12) apžvelgė ankstesnius metodus ir priėmė uždarosios viršutinės erdvės sistemą, kurią taikant inkubacijos pabaigoje terpė parūgštinama ir CO_2 išleidžiamas į viršutinę erdvę. CO_2 kiekis matuotas naudojant dujų chromatografijos (GC)/IC analizę; ėminiai automatiškai imti iš viršutinės erdvės, tačiau nebuvo atsižvelgiama į skystosios fazės ištirpusią neorganinę anglį (DIC). Be to, buvo naudoti labai maži indai (20 ml), į kuriuos tilpdavo tik 10 ml terpės, todėl sunkiai sekdavosi, pvz., įterpti reikiamus labai mažus netirpių bandomųjų cheminių medžiagų kiekius, ir (arba) terpėje su sėjimo kultūra galėdavo būti nepakankamas bandomąsias chemines medžiagas galinčių suskaidyti mikroorganizmų kiekis arba galėdavo jų apskritai nebūti.

6. Šie trūkumai pašalinti ėmus naudoti nepriklausomus Struijs ir Stoltenkamp (13) bei Birch ir Fletcher tyrimus; pastarieji tyrėjai visų pirmiausiai rėmėsi savo patirtimi naudojant aparatą, būtiną atliekant anaerobinį biologinio skaidymo bandymą (15). Taikant ankstesnį metodą (13) CO_2 kiekis matuojamas viršutinėje erdvėje, kai užtikrinamas parūgštinimas ir pusiausvyra, o pasirinkus pastarąjį (14) matuojamas dujinės ir skystosios fazės DIC kiekis be apdorojimo; daugiau negu 90 % susiformavusio IC buvo skystosios fazės. Abu metodai pranašesni už Sturmo bandymą, nes pirmųjų atveju bandymo sistema yra mažesnė ir lengvai tvarkoma bei pritaikyti tirti lakiąsias chemines medžiagas ir nenumatyta galimybė atidėti susiformavusio CO_2 kiekio matavimą.

7. Abu metodai įtraukti į ISO Viršutinės erdvės CO_2 standartą (16), kuris patikrintas atliekant tarplaboratorinio lyginimo bandymą (17), ir būtent šiuo standartu grindžiamas šis bandymo metodas. Šie du metodai taip pat įtraukti į JAV EPA metodą (18). Rekomenduojama taikyti du CO_2 kiekio matavimo metodus, būtent CO_2 viršutinėje erdvėje po rūgštinimo (13) ir IC skystojoje fazėje, kai pridedama perteklinio šarmo. Pastarąjį metodą pasiūlė Petersonas atliekant CONCAWE tarplaboratorinio lyginimo bandymą (19), kai šis viršutinės erdvės metodas buvo modifikuotas siekiant matuoti savitąjį biologinį skaidumą. Pakeitimai, padaryti šio priedo dėl lengvo biologinio skaidumo C.4 skyriuje 1992 m. (20) persvarstant metodus, įtraukti į šį bandymo metodą, kad sąlygos (terpė, trukmė ir t. t.) kitais atžvilgiais būtų tapačios persvarstyto Strumo bandymo (20) sąlygoms. Birch ir Fletcher (14) įrodė, kad atliekant šį viršutinės erdvės bandymą buvo gauti labai panašūs rezultatai kaip kad su tomis pačioms cheminėmis medžiagomis darant persvarstytų bandymo metodų OECD tarplaboratorinio lyginimo bandymą (21).

BANDYMO METODO ESMĖ

8. Bandomoji cheminė medžiaga (paprastai 20 mg/l) – vienintelis anglies ir energijos šaltinis – inkubuojama į buferinę mineralinių druskų terpę, į kurią įsėjama įvairių mikroorganizmų populiacija. Bandymas atliekamas sandariose kolbose su viršutine oro erdve, kuri yra deguonies šaltinis aerobiniam biologiniam skaidymui. CO_2 išsiskyrimas vykstant visiškam bandomosios cheminės medžiagos biologiniam skaidymui nustatomas matuojant IC kiekį, išsiskyrusį bandymo kolbose ir viršijantį tuščiojo bandinio kolbose, į kurias įdėta tik terpės su sėjimo kultūra, išsiskiriantį IC kiekį. Biologinio skaidymo apimtis išreiškiama kaip teorinio didžiausio IC išsiskyrimo (ThIC) procentinė dalis atsižvelgiant į iš pradžių įdėtą bandomosios cheminės medžiagos kiekį (kaip organinės anglies).

9. Taip pat galima matuoti pašalinamą DOC kiekį ir (arba) bandomosios cheminės medžiagos pirminio biologinio skaidymo apimtį (20).

▼M4

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

10. Bandomosios cheminės medžiagos organinės anglies kiekis (% w/w) turi būti žinomas arba atsižvelgiant į jos cheminę struktūrą, arba nustatomas matuojant, kad būtų galima apskaičiuoti procentinę skaidymo dalį. Jei tai lakiosios bandomosios cheminės medžiagos, išmatuota ar apskaičiuota Henrio dėsnio konstanta naudinga apibrėžiant tinkamą viršutinės erdvės skysčio tūrio santykį. Informacija apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą mikroorganizmams praverčia pasirenkant tinkamą tiriamąją koncentraciją ir aiškinant mažą biologinį skaidymą patvirtinančius rezultatus: rekomenduojama įtraukti slopinimo nustatymo bandymą, jeigu nėra žinoma, ar bandomoji cheminė medžiaga slopina mikroorganizmų veiklą (žr. 24 pastraipą).

METODO PRITAIKOMUMAS

11. Šiuo bandymu tiriamos vandenyje tirpios ir netirpios bandomosios cheminės medžiagos, todėl turėtų būti užtikrinama reikiama bandomosios cheminės medžiagos dispersija. Pasirinkus viršutinėje erdvėje rekomenduojamą taikyti skysčio tūrio santykį 1:2, galima bandyti lakiąsias chemines medžiagas, kurių Henrio dėsnio konstanta yra 50 $Pa.m^3$ mol^{-1}, nes šių bandomųjų cheminių medžiagų proporcija viršutinėje erdvėje neviršys 1 % (13). Atliekant bandymus su lakesnėmis cheminėmis medžiagomis galima rinktis mažesnę viršutinę erdvę, tačiau šių medžiagų biologinis pasisavinamumas gali būti apribotas tuo atveju, jeigu jos mažai tirpsta vandenyje. Tačiau vartotojai turi užtikrinti, kad viršutinės erdvės santykis su skysčio tūriu ir bandomosios cheminės koncentracija būtų toks, jog užtektų deguonies visiško biologinio skaidymo procesui (pvz., nenaudoti didelės substrato koncentracijos ir mažo viršutinės erdvės tūrio). Gairės dėl šio klausimo pateiktos (13) (23).

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

12. Siekiant patikrinti bandymo procedūrą tuo pačiu metu turėtų būti daromas bandymas naudojant etaloninę cheminę medžiagą, kurios biologinis skaidomumas yra žinomas. Šiuo tikslu galima naudoti aniliną, natrio benzoatą ar etilenglikolį, jeigu tiriamos vandenyje tirpios bandomosios cheminės medžiagos, ir 1-oktanolį tiriant mažai tirpias bandomąsias chemines medžiagas (13). Šių cheminių medžiagų biologinio skaidomumo vertė per 14 dienų turi atitikti > 60 % teorinio didžiausio neorganinės anglies (IC) išsiskyrimo.

ATKURIAMUMAS

13. Atliekant ISO metodo (17) tarplaboratorinio lyginimo bandymą nustatyti toliau pateikti rezultatai; jį atliekant taikytos rekomenduotos sąlygos, įskaitant 20 mg anglies bandomosios cheminės medžiagos litre.

Bandomoji cheminė medžiaga	Vidutinė biologinio skaidymo procentinė dalis (28d)	Variacijos koeficientas (%)	Laboratorijų skaičius
Anilinas	90	16	17
1-oktanolis	85	12	14

Kintamumo (atkartojamumo) vertė atliekant bandymą su anilinu buvo maža ir variacijos koeficientai atliekant beveik visus bandymus nebuvo didesni negu 5 %. Šiais dviem atvejais, kai atkartojamumas buvo mažas, didesnį kintamumą, ko gero, sukėlė didesnis išsiskiriantis IC kiekis tuščiojo bandinio kolbose. Atkartojamumo vertė buvo mažesnė darant bandymus su 1-oktanoliu, tačiau vis dėlto mažesnė negu 10 % iš atliktų 79 % bandymų. Didesnį kintamumą atliekant bandymus galėjo sukelti dozavimo paklaidos, nes į sandarias bandymo kolbas reikėdavę įterpti mažus 1-oktanolio kiekius (3–4 µl). Didesni variacijos koeficientai galėjo būti nustatomi todėl, kad buvo naudojama mažesnės koncentracijos bandomoji cheminė medžiaga, visų pirma tuo atveju, kai koncentracijos buvo mažesnės negu 10 mg C/l. Šią priklausomybę iš dalies įmanoma panaikint sėjimo kultūroje sumažinant bendrosios neorganinės anglies (TIC) koncentraciją.

▼M4

14. ES atlikus tarplaboratorinio lyginimo bandymus (24) su penkiomis paviršinio aktyvumo medžiagomis (10 mg/C/l) nustatyti šie rezultatai:

Bandomoji cheminė medžiaga	Vidutinė procentinė biologinio skaidymo dalis (28d)	Variacijos koeficientas (%)	Laboratorijų skaičius
Tetrapropilenas Benzensulfonatas	17	45	10
Diizooktilsulfo-sukcinatas (anijoninė)	72	22	9
Heksadeciltrimetil (*) amonio chloridas chloride (katijoninė)	75	13	10
Izo-nonilfenolis-(etoksilatas)$_9$ (nejoninis)	41	32	10
Kokamidopropil dimetilhidroksi sulfobetainas (amfoterinė)	60	23	11

(*) SiO_2 buvo įdėta siekiant neutralizuoti toksiškumą.

Nustatytais rezultatais įrodoma, kad apskritai kintamumas buvo didesnis mažesniosios gerai skaidomų paviršinių medžiagų dalies. Atliekant bandymus mažesnis negu 15 % kintamumas nustatytas daugiau negu 90 % atvejų, o didžiausia kintamumo vertė buvo 30–40 %.

PASTABA: Daugelis paviršinių medžiagų nėra sudarytos iš vieno dydžio molekulių, nes jas sudaro izomerfai, homologai ir t. t., kurie suskyla po skirtingos charakteristikos vėlinimo laikotarpių ir veikiant skirtingoms kinetinėms greičio konstantoms, todėl randasi „neryškios“ sumažėjusios kreivės ir 60 % atitikties vertė gali nebūti užtikrinama per „10 parų langą“ net tuo atveju, kai kiekvieno pavienio dydžio molekulės sudarys > 60 % per 10 dienų, jeigu bandymas atliekamas su vieno dydžio molekulėmis. Šio reikalavimo laikymąsi taip pat įmanoma užtikrinti naudojant kitus sudėtingus mišinius.

METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

15. Įprasta laboratorinė įranga:

a) stiklinės serumo kolbos, užkimštos butilkaučiuko kamščiais ir apspaudžiamaisiais aliuminio sandarikliais; rekomenduojamas „125 ml“ dydis; šiuo atveju bendras tūris būtų apie 160 ml (Vadinasi, turėtų būti žinoma, kad kiekvienos kolbos tūris yra 160 ± 1 ml); leidžiama naudoti mažesnę kolbą, jeigu rezultatai atitinka 66 ir 67 pastraipose aprašytas sąlygas;

b) anglies analizatorius arba kitas įtaisas (pvz., dujų chromatografas) neorganinei angliai išmatuoti;

▼M4

c) didelio tikslumo švirkštai dujų ir skysčio ėminiams imti;

d) rotacinis kratytuvas reguliuojamos temperatūros aplinkoje;

e) oro be CO_2 dujų tiekimas – šio oro tiekimą galima užtikrinti leidžiant orą per natrio kalkes arba naudojant 80 % N_2/20 % 0_2 dujų mišinį (pasirinktinas) (žr. 28 pastraipą);

f) membraninis filtravimo įtaisas (porų dydis 0,20–0,45 μm) (pasirenkamas);

g) organinės anglies analizatorius (pasirenkamas).

Cheminiai reagentai

16. Naudojami visais atžvilgiais analiziškai gryni cheminiai reagentai.

Vanduo

17. Turėtų būti naudojamas distiliuotas arba dejonizuotas vanduo, kuriame yra ≤ 1 mg/l bendros organinės anglies. Šis kiekis sudaro ≤ 5 % pradinio organinės anglies kiekio, įterpto rekomenduojama bandomosios cheminės medžiagos doze.

Mineralinių druskų terpės pradiniai tirpalai

18. Pradiniai tirpalai ir mineralinių druskų terpė yra tapatūs nurodytiesiems ISO standarte 14 593 (16) ir C.4 „lengvo biologinio skaidumo“ bandymuose (20). Didesnės koncentracijos amonio chloridą (2,0 g/l vietoj 0,5 g/l) turėtų būti privaloma naudoti tik labai išskirtiniais atvejais, pvz., kai bandomosios cheminės medžiagos koncentracija yra > 40 mg C/l. Pradiniai tirpalai turėtų būti laikomi šaldytuve ir šalinami po šešių mėnesiu arba anksčiau, jeigu aptinkama įrodymų, kad yra padidėjęs mikrobų augimas. Pasiruošiami šie pradiniai tirpalai:

a) kalio dihidrofosfato (KH_2PO_4), 8,50 g

bevandenio kalio dihidrofosfato (K_2HPO_4) 21,75 g

dinatrio vandenilio fosfato dihidrato ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g

amonio chlorido (NH_4Cl) 0,50 g

Ištirpinama vandenyje ir praskiedžiama iki 1 litro. Šio tirpalo pH vertė turėtų būti 7,4 (± 0,2). Jeigu ši vertė neužtikrinama, pasiruošiamas naujas tirpalas.

b) kalcio chlorido dihidrato ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g

Ištirpinama vandenyje ir praskiedžiama iki 1 litro.

c) magnio sulfato heptahidrato ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g

Ištirpinama vandenyje ir praskiedžiama iki 1 litro.

d) geležies (III) chlorido ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g

Ištirpinama vandenyje ir praskiedžiama iki 1 litro bei įlašinamas vienas lašas koncentruoto HCl.

Mineralinės terpės pasiruošimas

19. 10 ml a tirpalo maišoma su maždaug 800 ml vandens (17 pastraipa), tada įpilama po 1 ml b, c ir d tirpalų ir su vandeniu praskiedžiama iki 1 litro (17 pastraipa).

Kiti cheminiai reagentai

20. Koncentruota ortofosforo rūgštis (H_3PO_4) (> 85 % masė tūrio vienetui).

▼M4

Natrio hidroksido tirpalas 7M

21. 280 g natrio hidroksido (NaOH) ištirpinama 1 litre vandens (17 pastraipa). Nustatoma ištirpusios neorganinės anglies koncentracija šiame tirpale ir ši vertė taikoma apskaičiuojant bandymo rezultatą (žr. 55 ir 61 pastraipas), ypač atsižvelgiant į 66 pastraipos b punkto pagrįstumo kriterijų. Paruošiamas šviežias tirpalas, jeigu ištirpusios neorganinės anglies (DC) koncentracija yra per didelė.

Bandomoji cheminė medžiaga

22. Iš ganėtinai vandenyje tirpios bandomosios cheminės medžiagos (17 pastraipa) ar iš bandomojoje terpėje tirpios bandomosios cheminės medžiagos (19 pastraipa) pasiruošiamas pradinis tirpalas, kurio koncentracija turi būti 100 kartų didesnė negu atliekant bandymą naudotina galutinė koncentracija; gali tekti koreguoti pradinio tirpalo pH vertę. Pradinis tirpalas turėtų būti įterpiamas į mineralinę terpę siekiant užtikrinti 2–40 mg C/l galutinę organinės anglies koncentraciją (tinkamiausia koncentracija būtų 20 mg/l). Jeigu naudojamos mažesnės koncentracijos negu nurodytosios, gali būti neužtikrinamas reikiamas tikslumas. Į kolbas galima įšvirkšti aukštaslėgiais švirkštais tirpių ir netirpių skystųjų cheminių medžiagų. Mažai tirpias ir netirpias bandomąsias chemines medžiagas gali tekti specialiai apdoroti (25). Galima rinktis:

a) tiesioginį žinomos masės kiekio įdėjimą;

b) dispergavimą ultragarsu prieš įdėjimą;

c) privalomą dispergavimą emulsikliais siekiant nustatyti, ar jie sukelia kokį nors slopinamąjį ar skatinamąjį poveikį mikroorganizmų veiklai prieš pridėjimą;

d) skystųjų bandomųjų cheminių medžiagų arba tirpalo adsorbciją į tinkamą lakųjį tirpiklį, į inertinę terpę ar inertinę medžiagą (pvz., stiklo pluošto filtrą) ir tolesnį tirpiklio garinimą, jeigu naudojamas, ir tiesioginį žinomo kiekio įdėjimą;

e) bandomosios cheminės medžiagos tirpalo lakiame tirpiklyje žinomo kiekio įdėjimą į tuščią bandymo indą ir vėlesnį tirpiklio išgarinimą.

C, d ir e punktuose nurodytos medžiagos arba tirpikliai turi būti išbandyti siekiant nustatyti, ar jie sukelia kokį nors skatinamąjį arba slopinamąjį poveikį mikroorganizmų veiklai (žr. 42 pastraipos b punktą).

Etaloninė cheminės medžiaga

23. Iš (tirpios) etaloninės cheminės medžiagos vandenyje pasiruošiamas pradinis tirpalas (17 pastraipa), kurio koncentracija būtų 100 kartų didesnė negu naudotina atliekant bandymą galutinė koncentracija (20 mg/l).

Slopinimo poveikio tikrinimas

24. Jeigu taikomos lengvo biologinio skaidymo vertinimo sąlygos, šiuo atveju bandomosios cheminės medžiagos dažnai nėra kiek nors labiau suskaidomos. Viena iš galimų priežasčių – bandomoji cheminė medžiaga slopina sėjimo kultūrą būdama tokios koncentracijos, kokios ši medžiaga naudojama atliekant bandymą. Slopinimo poveikio tikrinimą galima įtraukti į bandymo planą siekiant palengvinti slopinimo nustatymą (nukreiptą atgal), nes šis slopinimas gali būti tikėtina priežastis arba skatinimo veiksnys. Antraip atlikus slopinimo poveikio tikrinimą galima atmesti minėtus trukdžius ir įrodyti, kad nulinis ar nedidelis skaidymas priskirtinas tik atsparumui mikroorganizmų poveikiui laikantis bandymo sąlygų. Siekiant gauti informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą (aerobiniams) mikroorganizmams bandomojoje terpėje pasiruošiamas tirpalas, į kurį įtraukiama bandomoji cheminė medžiaga ir etaloninė cheminė medžiaga (19 pastraipa), atitinkamai kiekvienos įdedama vienodos koncentracijos (žr. 22 ir 23 pastraipas).

▼M4

Sėjimo kultūra

25. Sėjimo kultūrą galima gauti iš įvairių šaltinių: veikliojo dumblo; nuotekų ištakio (neapdoroto chloru); paviršinių vandenų ir dirvožemių; ar iš pastarųjų mišinio (20). Naudojant etaloninę cheminę medžiagą turėtų būti nustatomas šaltinio biologinio skaidymo veiksmingumas. Kad ir koks būtų šaltinis, bandomąja chemine medžiaga anksčiau paveikti mikroorganizmai neturėtų būti naudojami, jeigu procedūra turi būti taikoma kaip lengvo biologinio skaidumo bandymas.

Įspėjimas. Veikliajame dumble, nuotekose ir nuotekų ištakyje yra patogeninių organizmų, todėl turi būti dirbama laikantis atsargumo priemonių.

26. Remiantis patirtimi optimalus sėjimo kultūros kiekis:

— kurio pakanka reikiamai biologinio skaidymo veiklai užtikrinti,

— kuris suskaido nustatytą procentinę etaloninės cheminės medžiagos dalį (žr. 66 pastraipą),

— kurį naudojant išauga 10^2–10^5 koloniją sudarančių vienetų milimetre galutinio mišinio,

— kurį naudojant galutiniame mišinyje paprastai užtikrinama 4 mg/l suspenduotų medžiagų koncentracija, jeigu pasirenkamas veiklusis dumblas; leidžiama naudoti ne didesnes negu 30 mg/l koncentracijas, tačiau tuščiojo bandinio kolbose (26) gali išsiskirti gerokai daugiau CO_2,

— kurio indėlis į pradinę organinės anglies, įterptos naudojant bandomąją cheminę medžiagą, koncentraciją yra mažesnis negu 10 %,

— paprastai yra 1–10 ml sėjimo kultūros 1 litrui bandomojo tirpalo.

Veiklusis dumblas

27. Veiklusis dumblas surenkamas šviežias iš nuotekų valymo įrenginio aeracijos rezervuaro ar laboratorinio įrenginio, kuriuo valomos visų pirma buitinės nuotekos. Jeigu reikia, stambiosios dalelės turėtų būti pašalinamos per sietą (pvz., naudojant sietą, kurio akutės dydis 1 mm^2) ir dumblas turi būti laikomas aerobinėmis sąlygomis, kol jį bus imta naudoti.

28. Antraip pašalinus visas stambiąsias daleles, dumblas nusodinamas ar centrifuguojamas (pvz., 1 100 × g, 10 minučių). Nupilamas nusistojęs skystis. Dumblą galima nuplauti į mineralinį tirpalą. Koncentruotas dumblas suspenduojamas mineralinėje terpėje, kad būtų gautos 3–5 g koncentracijos suspenduotos medžiagos. Po to jis aeruojamas atsižvelgiant į nustatytus reikalavimus.

29. Dumblas turėtų būti imamas iš tinkamai veikiančio įprasto valymo įrenginio. Jeigu dumblas turi būti imamas iš didelio našumo valymo įrenginio arba jeigu manoma, kad dumble yra inhibitorių, šis dumblas turi būti plaunamas. Gerai sumaišytas, pakartotinai suspenduotas dumblas paliekamas nusistoti arba centrifuguojamas, nupilamas nuo jo skystis ir išplautas dumblas dar kartą suspenduojamas kitame mineralinės terpės tūryje. Šie veiksmai kartojami tol, kol galima manyti, kad substrato pertekliaus arba inhibitorių neliko.

30. Visiškai užbaigus pakartotinį suspendavimą arba iš neapdoroto dumblo prieš pradedant naudoti imamas ėminys, kad būtų nustatyta suspenduotų medžiagų sausoji masė.

31. Pagal kitą būdą homogenizuojamas aktyvusis dumblas (3–5 g/l suspenduotų medžiagų.) Dumblas maišomas 2 min. vidutiniu greičiu mechaniniame maišiklyje. Sumaišytas dumblas paliekamas 30 min. arba ilgiau, jei to reikia, ir dekantuojamas skystis, kuris naudojamas kaip sėjimo kultūra, pagal normą 10 ml/l mineralinės terpės

▼M4

32. Iš tuščiojo bandinio kolbos išsiskiriantį CO_2 kiekį galima dar labiau sumažinti, jeigu dumblas per naktį būtų aeruojamas CO_2 neturinčiu oru. Atliekant šį bandymą (13) 4 mg/l veikliojo dumblio kietųjų medžiagų naudojama kaip sėjimo kultūros koncentracija.

Biologinio nuotekų valymo ištakis

33. Antraip sėjimo kultūrą galima paimti iš biologinio nuotekų valymo įrenginio ištakio arba laboratorinio įrenginio, kuriam tiekiamos vien buitinės nuotekos. Ėminys laikomas aerobinėmis sąlygomis ir naudojamas paėmimo dieną arba, jeigu reikia, iš anksto kondicionuojamas. Ištakis turėtų būti filtruojamas per stambų filtrą siekiant pašalinti dideles kietąsias daleles ir tada išmatuojama pH vertė.

34. Norint jame sumažinti IC kiekį, filtratas 1 val. borbatuojamas CO_2 neturinčiu oru (15-e pastraipa), ir naudojant ortofosforo rūgštį (20 pastraipa) kartu išlaikoma pH vertė 6,5. Naudojant natrio hidroksidą atkuriama pradinė pH vertė ir po maždaug 1 val. trukmės nusodinimo iš sėjimo kultūros paimamas reikiamas kiekis nusistojusio skysčio. Taikant šią borbatavimo procedūrą sėjimo kultūroje sumažinamas IC kiekis. Pvz., jeigu didžiausias rekomenduotas filtruoto ir borbatuoto ištakio kiekis (100 ml) litrui buvo naudotas kaip sėjimo kultūra, IC kiekis tuščiojo bandinio kolbose atitiko 0,4–1,3 mg/l (14), t. y. atitiko bandomosios cheminės medžiagos 2–6,5 % C esant 20 mg C/l koncentracijai ir 4–13 % esant 10 mg C/l koncentracijai.

Paviršiniai vandenys

35. Ėminys imamas iš atitinkamo paviršinio vandens. Jis turėtų būti laikomas aerobinėmis sąlygomis ir naudojamas paėmimo dieną. Jeigu reikia, ėminio koncentracija turėtų būti didinama filtruojant arba centrifuguojant. Kiekviename bandymo inde naudotinos sėjimo kultūros kiekis turėtų atitikti 26 pastraipoje nustatytus kriterijus.

Dirvožemiai

36. Paimamas tinkamo dirvožemio ėminys; jis imamas iš ne didesnio negu 20 cm gylio nuo dirvožemio paviršiaus. Prieš imantis sietu, kurio akučių dydis 2 mm, sijoti dirvožemio ėminį iš jo turėtų būti išrenkami akmenys, augalų liekanos ir bestuburiai (jeigu ėminys yra pernelyg drėgnas, kad būtų galima jį sijoti nedelsiant, šiuo atveju ėminys iš dalies džiovinamas oru – tokį ėminį sijoti būtų lengviau). Ėminys turėtų būti laikomas aeravimo sąlygomis ir naudojamas paėmimo dieną (jeigu ėminys turi būti gabenamas nesandariai užrištame juodos spalvos polietileno maiše, ėminį galima laikyti ne ilgiau negu vieną mėnesį 2–4 °C temperatūroje).

Pradinis sėjimo kultūros kondicionavimas

37. Sėjimo kultūrai leidžiama taikyti pradinį kondicionavimą, kad ji atitiktų bandymo sąlygas, tačiau ėminio neleidžiama iš naujo pritaikyti prie bandomosios cheminės medžiagos. Taikant pradinį kondicionavimą gali būtų sumažinamas CO_2 išsiskyrimas iš tuščiojo bandinio kolbų. Pradinis kondicionavimas – tai 30 mg/l bandymo terpe atskiesto veikliojo dumblo aeravimas 5–7 dienas bandymo temperatūroje CO_2 neturinčiu oru.

BANDYMO ATLIKIMO TVARKA

Kolbų skaičius

38. Bandymui reikalingų kolbų skaičius (15-a pastraipa) priklauso nuo analizės atlikimo dažnumo ir bandymo trukmės.

39. Rekomenduojama, kad po pakankamo laiko intervalų skaičiaus, pvz., tokio, kad būtų galima identifikuoti 10 parų langą, būtų atliekama trijų kolbų analizė. Bandymo pabaigoje taip pat analizuojamos ne mažiau negu penkios kolbos (15-a pastraipa) iš a, b ir c rinkinių (žr. 42 pastraipą) siekiant užtikrinti 95 % pasikliovimo intervalus, kad būtų apskaičiuota vidutinė biologinio skaidymo procentinė vertė.

▼M4

Terpė su sėjimo kultūra

40. Naudojamos sėjimo kultūros koncentracija turi būti 4 mg/l veikliojo dumblo sausosios masės. Nedelsiant prieš naudojimą pasiruošiamas pakankamas kiekis terpės su sėjimo kultūra, pvz., šiuo atveju 2 ml tinkamai apdoroto veikliojo dumblo (27–32 pastraipos) įdedama į 2 000 mg/l–1 litrą mineralinių druskų terpės (19 pastraipa). Jeigu turi būti naudojamas biologinio valymo įrenginio ištakis, ne daugiau negu 100 ml ištakio (33 pastraipa) įdedama į 900 ml mineralinių druskų terpės (19 pastraipa) ir terpe atskiedžiama iki 1 litro.

Kolbų paruošimas

41. Alikvotinės terpės su sėjimo kultūra dalys paskleidžiamos kolbose, kad viršutinės erdvės ir skysčio santykis būtų 1:2 (pvz., įdedama į 107–160 ml talpos kolbas). Leidžiama pasirinkti kitus santykius, tačiau šiuo atveju atsižvelgtina į 11 pastraipoje išdėstytą įspėjimą. Naudojant bet kurio iš šių dviejų tipų sėjimo kultūrą turi būti siekiama užtikrinti, kad terpė su įmaišyta sėjimo kultūra būtų reikiamai išmaišyta, nes tik šitaip įmanoma garantuoti tolygų terpės pasiskirstymą bandymo kolbose.

42. Kolbų rinkiniai (15a pastraipa) paruošiami taip, kad juose būtų:

a) bandymo indai (žymimi F_T) su bandomąja chemine medžiaga;

b) tuščiojo bandinio kolbos (žymimos F_B), kuriose yra tik bandomoji terpė ir sėjimo kultūra; taip pat turi būti pridedamos visos cheminės medžiagos, tirpikliai, priemonės ar stiklo pluošto filtrai, naudojami bandomąją cheminę medžiagą įterpiant į bandymo indus;

c) procedūros tikrinimo indai (žymimi F_C), kuriuose yra etaloninė cheminė medžiaga;

d) jeigu reikia, tikrinant galimą slopinimo poveikį naudojami indai (žymimi F_I) su bandomąja chemine medžiaga ir tokios pačios koncentracijos etalonine chemine medžiaga (24 pastraipa) kaip atitinkamai kolbose F_T ir F_C;

e) tikrinant galimą abiotinį skaidymą naudojami indai (žymimi F_S) kaip a + 50 mg/l $HgCl_2$ arba sterilizuoti kitomis priemonėmis (pvz., naudojant autoklavą).

43. Siekiant užtikrinti 10–20 mg C/l koncentraciją kaip vandeniniai pradiniai tirpalai (22, 23 ir 24 pastraipos) įterpiamos vandenyje tirpios bandomosios cheminės medžiagos ir etaloninės cheminės medžiagos.

44. Netirpios bandomosios cheminės medžiagos ir netirpios etaloninės cheminės medžiagos atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos pobūdį įvairiais būdais įdedamos į kolbas (žr. 22a-e pastraipas); šiuo atveju prieš įdedant terpę su sėjimo kultūra ar terpę įdėjus (šiuo atveju paisoma bandomosios cheminės medžiagos poveikio metodo). Jeigu naudojama viena iš 22a-e pastraipoje nurodytų procedūrų, šiuo atveju tuščiojo bandinio kolbos F_B (42b pastraipa) turėtų būti tvarkomos panašiu būdu, tačiau išskyrus bandomąją cheminę medžiagą arba etaloninę cheminę medžiagą.

45. Lakios bandomosios cheminės medžiagos į sandarias kolbas (47 pastraipa) turėtų būti įšvirkščiamos mažais švirkštais. Dozė apskaičiuojama atsižvelgiant į įšvirkštą tūrį ir bandomosios cheminės medžiagos tankį.

46. Jeigu reikia, turėtų būti įpilama vandens, kad kiekviename inde būtų vienodas skysčio tūris. Privaloma užtikrinti, kad viršutinės erdvės ir skysčio santykis (paprastai 1:2) ir bandomosios cheminės medžiagos koncentracija būtų tokia, kad viršutinėje erdvėje būtų pakankamas visiškam biologiniams suskaidymui reikalingas deguonies kiekis.

▼M4

47. Tada visos kolbos sandarinamos, pvz., butilkaučiuko sandarikliais ir aliuminio gaubteliais. Šiame etape (45 pastraipa) turėtų būti įterpiamos lakios bandomosios cheminės medžiagos. Jeigu turi būti stebimas DOC koncentracijos bandomajame tirpale sumažėjimas ir laiko atskaitos pradžioje atliekama pradinės IC koncentracijos analizė (sterilūs kontroliniai bandiniai, 42e pastraipa) ar analizuojamos kitos tiriamosios medžiagos, iš bandymo indo paimamas atitinkamas ėminys. Po to bandymo indas ir jo turinys yra šalinamas.

48. Užkimštos kolbos dedamos į rotacinį kratytuvą (15d pastraipa); kratymo dažnis turi būti toks, kad kolbų turinys būtų tinkamai maišomas ir suspenduojamas (pvz., 150–200 sūk./min.) ir inkubuojama tamsoje 20 °C temperatūroje (± 1 °C).

Ėminių ėmimas

49. Ėminių ėmimo tvarka priklauso nuo vėlavimo fazės ir nuo bandomosios cheminės medžiagos biologinio skaidymo kinetinio greičio. Kolbos paaukojamos, kad ėminių ėmimo dieną būtų galima atlikti analizę; ėminiai imami bent kartą per savaitę ar dažniau (pvz., du kartus per savaitę), jeigu būtina nubrėžti visiško suskaidymo kreivę. Reikiamas lygiagrečiai paruoštų kolbų skaičius paimamas iš kratytuvo, t. y. F_T, F_B ir F_C ir, jeigu naudojama, F_I ir F_S (žr. 42 pastraipą). Bandymas paprastai daromas 28 dienas. Jeigu atsižvelgiant į biologinį skaidymą daroma išvada, kad kreivės plokščioji dalis užtikrinama anksčiau negu per 28 dienas, bandymą galima užbaigti anksčiau negu per 28 dienas. Ėminiai imami iš penkių kolbų, paliktų atlikti analizę 28-ąją bandymo dieną, ir rezultatai naudojami apskaičiuojant procentinės biologinio skaidymo dalies pasikliautinuosius rėžius ar variacijos koeficientus. Iš kolbų, kurios naudojamos nustatant slopinimo poveikį ar abiotinį skaidymą, ėminių nebūtina imti taip dažnai kaip iš kitų kolbų; pakanka juos imti 1 ir 28 dieną.

Neorganinės anglies (IC) analizė

50. CO_2 išsiskyrimas kolbose nustatomas inkubacijos laikotarpiu matuojant neorganinės anglies (IC) koncentracijos padidėjimą. Rekomenduojami atliekant bandymą išsiskyrusios IC anglies kiekio matavimo du metodai ir jie aprašyti toliau. Naudojant šiuos metodus gali būti nustatomi šiek tiek besiskiriantys rezultatai, todėl atliekant bandymą turėtų būti naudojamas tik vienas metodas.

51. *A* Metodas rekomenduojamas tuo atveju, jeigu terpėje galėtų būti, pvz., stiklo filtro popieriaus ir (arba) netirpios bandomosios cheminės medžiagos likučių. Šią analizę galima atlikti naudojant dujų chromatografą, jeigu neturimas anglies analizatorius. Privaloma pasirūpinti, kad analizuojant viršutinės erdvės dujas kolbų temperatūros vertė atitiktų ar beveik atitiktų bandymo temperatūros vertę. *B* metodas gali būti patogesnis taikyti laboratorijose, kuriose IC kiekis matuojamas anglies analizatoriais. Svarbu, kad natrio hidroksido tirpalas (21 pastraipa), kurį naudojant CO_2 verčiamas karbonatu, būtų šviežiai pasiruoštas arba jo kiekis žinomas, kad į jį būtų galima atsižvelgti apskaičiuojant bandymo rezultatus (66-b pastraipa).

A metodas: rūgštinimas iki pH < 3

52. Prieš pradedant kiekvieną analizės dalį IC analizatorius kalibruojamas naudojant atitinkamą IC standartą (pvz., 1 % w/w CO_2 mišinyje su N_2 dujomis). Koncentruota ortofosforo rūgštis (20 pastraipa) įšvirkščiama per kiekvienos kolbos sandariklį; kolbos pasirenkamos siekiant sumažinti terpės pH vertę iki < 3 (pvz., įšvirkščiama 1 ml į 107 ml bandomosios terpės). Kolbos vėl sudedamos į kratytuvą. Kolbas vieną valandą pakračius kratytuvu esant bandymo temperatūrai, jos išimamos iš kratytuvo; alikvotinės dujų dalys (pvz., 1 ml) paimamos iš kiekvienos kolbos viršutinės erdvės ir įleidžiamos į IC analizatorių. Išmatuotos IC koncentracijos registruojamos kaip mg C/l.

▼M4

53. Šio metodo esmė – užbaigus rūgštinti, kai pH < 3 ir užtikrinus pusiausvyrą 20 °C, CO_2 pasiskirstymo tarp skystosios ir dujinės fazės bandymo kolbose pusiausvyros konstantos vertė yra 1,0, jeigu matuojama kaip koncentracija. Šis dalykas bandymo sistemos atžvilgiu bent vieną kartą turėtų būti įrodomas taip:

Naudojant bevandenio natrio karbonato ($Na_2 CO_3$) tirpalą, pasiruoštą iš CO_2 neturinčio vandens, koncentruota ortofosforo rūgštimi (20 pastraipa) rūgštinant vandenį, kol pH vertė pasidaro 6,5, borbatuojant CO_2 neturinčiu oru ir naudojamu šarmu užtikrinus neutralų pH, pasiruošiamos kolbos su 5 ir 10 mg/l IC koncentracija. Užtikrinama, kad viršutinės erdvės tūrio santykis su skysčio tūriu būtų toks pats kaip atliekant bandymus (pvz., 1:2). Rūgštinama ir užtikrinama pusiausvyra kaip aprašyta 52 pastraipoje bei matuojama IC koncentracijos viršutinės erdvės ir skystosiose fazėse. Patikrinama, ar dvi koncentracijos atitinka tokias pačias paklaidas. Jeigu paklaidos nėra tapačios, operatorius turėtų persvarstyti procedūras. Šis IC pasiskirstymas tarp skystosios ir dujinės fazės neturi būti tikrinimas kiekvieną kartą atliekant bandymą; jį galima atlikti kartu su kalibravimu.

54. Jeigu turi būti matuojamas pašalinamas DOC kiekis (tik vandenyje tirpių bandomųjų cheminių medžiagų), turėtų būti imami skystos fazės ėminiai iš atskirų kolbų (neparūgštintų), filtruojami membraniniu filtru ir įleidžiami į DOC analizatorių. Šias kolbas galima naudoti atliekant kitas analizes, jeigu reikia, siekiant nustatyti pirminį biologinį skaidumą.

B metodas: CO_2 perskaičiavimas į karbonatą

55. Prieš pradedant kiekvienos partijos analizes, IC analizatorius kalibruojamas naudojant atitinkamą standartą, pvz., 0–20 mg/l koncentracijos, išreikštos IC, natrio vandenilio karbonato ($NaHCO_3$) tirpalą CO_2 neturinčiame vandenyje (žr. 53 pastraipą). Natrio hidroksido tirpalo (7M, 21 pastraipa) (pvz., 1 ml į 107 ml terpės) įšvirkščiama per kiekvienos pasirinktos kolbos sandariklį ir kolbos kratomos 1 val. esant bandymo temperatūrai. Visose kolbose, panaudotose konkrečią dieną, tačiau nebūtinai kiekvieno ėminio ėmimo atveju per visą bandymą, naudojamas tas pats NaOH tirpalas. Jeigu visų ėminių ėmimo atvejais būtinos absoliučios tuščiosios IC vertės, kiekvieną kartą naudojant NaOH tirpalą privaloma nustatyti IC. Kolbos išimamos iš kratytuvo ir paliekamos nusistoti. Pakankamas kiekis (pvz., 50–1000 µl) skystosios fazės iš kiekvienos kolbos ištraukiama švirkštu. Ėminiai įleidžiami į IC analizatorių ir užrašomos IC koncentracijos. Turėtų būti užtikrinama, kad naudojamas analizatorius būtų tinkamai pritaikytas analizuoti pagal minėtą metodą paruoštus šarminius ėminius.

56. Šio metodo esmė – įdėjus šarmo ir užbaigus kratymą, IC koncentracija viršutinėje erdvėje nėra reikšminga. Šį bandymo sistemos parametrą galima patikrinti naudojant IC standartus, pridedant šarmo ir užtikrinant pusiausvyrą bei IC koncentraciją matuojant viršutinėje erdvėje ir skystosios fazės (žr. 53 pastraipą). Koncentracijos vertė viršutinėje erdvėje turėtų būti beveik lygi nuliui. Šio patikrinimo dėl beveik visiškos CO_2 absorbcijos nebūtina atlikti kiekvieną kartą darant bandymą.

57. Jeigu turi būti matuojamas šalinamas DOC kiekis (tik vandenyje tirpios bandomosios cheminės medžiagos), skystosios fazės ėminiai turėtų būti imami iš atskirų kolbų (į kurias nebuvo dėta šarmo), filtruojami membraniniu filtru ir įleidžiami į DOC analizatorių. Šias kolbas galima naudoti atliekant kitas analizes, jeigu reikia, kad būtų išmatuotas pirminis biologinis skaidumas

▼M4

DUOMENYS IR ATASKAITŲ TEIKIMAS

Rezultatų apskaičiavimas

58. Darant prielaidą, kad bandomoji cheminė medžiaga 100 % skyla į CO_2, teorinis didžiausias išsiskyręs neorganinės anglies (IC) kiekis, viršijantis išsiskiriantį tuščiuose kontroliniuose bandiniuose, yra lygus TOC, kuri įdedama į kiekvieną kolbą bandymo pradžioje, t. y.:

$$ThIC = TOC.$$

Bendroji neorganinės anglies (TIC) masė (mg) kiekvienoje kolboje yra:

$$TIC = (\text{mg C skystyje} + \text{mg C viršutinėjeerdvėje}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \qquad \text{1 lygtis}$$

kur:

V_L = skysčio kolboje tūris (litrais)

CL = IC koncentracija skystyje (kaip anglies mg/l)

VH = viršutinės erdvės tūris (litrais)

CH = IC koncentracija viršutinėje erdvėje (kaip anglies mg/l)

TIC apskaičiavimai taikant du analizės metodus, naudojamus išmatuoti IC, kai atliekamas šis bandymas, aprašyti toliau 60 ir 61 pastraipose. Procentinė biologinio skaidymo dalis (*% D*) kiekvienu atveju apskaičiuojama pagal šią lygtį:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \qquad \text{2 lygtis}$$

kur:

TIC_t = bendroji neorganinė anglis (TIC) mg bandymo kolboje t laiko momentu

TIC_b = vidutinė bendroji neorganinė anglis (TIC) mg tuščiojo bandinio kolbose t laiko momentu

TOC = į bandymo indą iš pradžių įdėta TOC (mg).

Procentinė biologinio skaidymo dalis % D apskaičiuojama bandymo (F_T), etaloninės (F_C) ir, jeigu įtraukta, slopinimo stebėjimo kontrolinės (F_I) kolbų atsižvelgiant į atitinkamus TIC kiekius, išsiskyrusius iki kiekvieno ėminio ėmimo laiko.

59. Jeigu bandymo laikotarpiu gerokai padidėja TIC kiekis steriliuose kontroliniuose bandiniuose (F_S), šiuo atveju galima daryti išvadą, kad bandomoji cheminė medžiaga buvo abiotinėmis sąlygomis suskaidyta, ir šį procesą turi būti atsižvelgiama apskaičiuojant 2 lygties D vertę.

Rūgštinimas iki pH < 3

60. Rūgštinimu užtikrinus pH < 3 ir pusiausvyrą, suvienodėja TIC koncentracija skystojoje ir dujinėje fazėse; IC koncentraciją būtina matuoti tik dujinėje fazėje. Vadinasi, naudojantis 1 lygtimi $TIC = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, kur V_B = serumo kolbos tūris.

CO_2 perskaičiavimas į karbonatą

61. Pasirinkus šį metodą apskaičiavimai atliekami pagal 1 lygtį, tačiau mažo IC kiekio dujinėje fazėje nepaisoma, t. y $V_H \times C_H = 0$, ir $TIC = V_L \times C_L$.

▼M4

Rezultatų išraiška

62. Biologinio skaidymo kreivė gaunama procentinę biologinio skaidymo dalį D, kaip liniją brėžiant atsižvelgiant į inkubacijos trukmę, jeigu įmanoma, vėlavimo fazę, biologinio skaidymo fazę, 10 parų langą ir kreivės plokščiosios dalies fazę, t. y. fazę, kai nurodoma užtikrinama didžiausia skaidymo vertė ir biologinio skaidymo kreivė išsilygina. Jeigu panašių bandymo indų F_T (< 20 % skirtumas) nustatomi palyginamieji rezultatai, brėžiama vidutinė kreivė (žr. 2 priedėlio 1 pav.); jeigu jie nenustatomi, brėžiama kiekvieno indo atskira kreivė. Kreivės plokščiosios dalies tarpsnio biologinio skaidymo procentinės dalies vidutinė vertė apibrėžiama arba įvertinama didžiausia vertė (pvz., kai kreivė leidžiasi kreivės plokščiosios dalies fazėje), tačiau svarbu įvertinti, ar pastaruoju atveju vertė nėra išskirtis. Šis didžiausias biologinio skaidymo lygis bandymo ataskaitoje pavadinamas „bandomosios cheminės medžiagos biologinio skaidymo laipsniu“. Jeigu bandymo indų skaičius buvo nepakankamas, kad būtų galima nurodyti kreivės plokščiąją dalies tarpsnį, apskaičiuojant vidutinę vertę naudojami paskutinę bandymo dieną išmatuoti duomenys. Ši paskutinė vertė, vidutinė penkių tapačių indų vertė, naudojama nurodant procentinės biologinio skaidymo dalies nustatymo glaudumą. Taip pat nurodoma 10 parų lango pabaigoje nustatyta vertė.

63. Tuo pačiu būdu brėžiama etaloninės cheminės medžiagos kreivė F_C, ir, jeigu įtraukta, abiotinio šalinimo patikrinimo F_s ir slopinimo kontrolės F_I kreivės.

64. Tuščiuose kontroliniuose bandiniuose (F_B) esantys TIC kiekiai užrašomi; taip pat užrašomi F_s kolbose (abiotinių sąlygų tikrinimas) esantys kiekiai, jeigu šie indai buvo naudojami atliekant bandymą.

65. Apskaičiuojama F_I indų D vertė remiantis teorine IC išeiga, numatoma tik pagal etaloninio mišinio komponentą. Jeigu 28 dieną $[[(D_{FC}\,(^1) - D_{FI}\,(^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, galima daryti prielaidą, kad bandomoji cheminė medžiaga slopina sėjimo kultūrą, ir todėl šiuo poveikiu galima pagrįsti mažas D_{FT} vertes, nustatytas taikant bandymo sąlygas. Šiuo atveju bandymą galima pakartoti naudojant mažesnę bandymo koncentraciją ir verčiau sumažinant DIC sėjimo kultūroje ir tuščiuose kontroliniuose bandiniuose susiformavusią bendrąją neorganinę anglį, nes naudojant mažesnę koncentraciją vis tiek sumažinamas metodo tikslumas. Antraip galima naudoti kitą sėjimo kultūrą. Jeigu bandymo kolboje Fs (abiotinėmis sąlygomis) nustatomas gerokas (> 10 %) TIC kiekio padidėjimas, šiuo atveju gali būti įvykę abiotinio skaidymo procesai.

Rezultatų validumas

▼M7

66. Bandymas laikomas tinkamu, jei:

a) vidutinė skaidymo procentinė dalis induose F_C su etalonine chemine medžiaga yra > 60 % iki 14 inkubavimo paros; ir

b) tuščių kontrolinių ėminių F_B vidutinis TIC kiekis bandymo pabaigoje yra < 3 mg C/l.

Jei šios ribinės vertės nėra gautos, bandymą reikėtų pakartoti naudojant iš kito šaltinio paimtą sėjimo kultūrą ir (arba) reikėtų peržiūrėti procedūras. Pvz., jei problema yra didelis IC kiekis tuščiuosiuose ėminiuose, turėtų būti taikoma 27–32 pastraipose nurodyta procedūra.

(1) Skaidymo F_C induose, kuriuose yra etaloninė cheminė medžiaga, procentinė dalis.
(2) Procentinė skaidymo dalis F_I induose.

▼M4

67. Jeigu bandomosios cheminės medžiagos kiekis nesudaro 60 % ThIC ir jeigu įrodoma, kad ši medžiaga nėra inhibitorius (65 pastraipa), bandymas turėtų būti kartojamas pasirinkus didesnę sėjimo kultūros koncentraciją (ne daugiau negu 30 mg/l veikliojo dumblo ir 100 ml/l ištakio) arba sėjimo kultūrą iš kitų šaltinių, ypač tuo atveju, jeigu skaidymo vertė 20–60 %.

Rezultatų interpretavimas

68. Biologinio skaidymo per 10 parų langą vertė > 60 % ThIC atliekant bandymą įrodo, kad aerobinėmis sąlygomis bandomoji cheminė medžiaga yra lengvai biologiškai skaidoma.

69. Jeigu 60 % ThIC vertė nėra užtikrinama, nustatoma terpės pH vertė kolbose, kurios nebuvo paveiktos rūgštimi arba šarmu; mažesnė negu 6,5 vertė galėtų būti laikoma įrodymu, kad vyko nitrifikacijos procesas. Šiuo atveju kartojamas bandymas su didesnės koncentracijos buferiniu tirpalu.

Bandymo ataskaita

70. Paruošiama kiekvieno bandymo (F_T) % D, etaloninės (F_C) ir, jeigu įtraukta, kiekvienos ėminių ėmimo dienos slopinimo kontrolinės kolbos (F_C) verčių lentelė. Jeigu gaunami lygiagrečiai paruoštų kolbų palyginamieji rezultatai, brėžiama vidutinės % D vertės kreivė atsižvelgiant į laiką. Registruojamas TIC kiekis tuščiojo bandinio kolbose (FB) ir DOC vertė steriliuose kontroliniuose bandiniuose (FS) ir (arba) kitos tiriamosios medžiagos bei procentinė jų šalinimo dalis.

71. Nustatoma vidutinė kreivės plokščiosios dalies tarpsnio vertė % D arba naudojama didžiausia vertė, jeigu biologinio skaidymo kreivė leidžiasi kreivės plokščiosios dalies tarpsnyje, ir šis dalykas pranešamas kaip „bandomosios cheminės medžiagos biologinio skaidymo laipsnis“. Būtina užtikrinti, kad pastaruoju atveju didžiausia vertė nebūtų išskirtis.

72. Į bandymo ataskaitą turi būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— bendrasis pavadinimas, cheminis pavadinimas, CAS numeris, struktūrinė formulė ir atitinkamos fizinės-cheminės savybės,

— bandomosios cheminės medžiagos grynumas (priemaišos).

Bandymo sąlygos:

— nuoroda į šį bandymo metodą,

— naudotos bandymo sistemos aprašymas (pvz., indo tūris, viršutinės erdvės ir skysčio santykis, maišymo metodas ir t. t.),

— bandomosios cheminės medžiagos ir etaloninės cheminės medžiagos taikymo bandymo sistemoje: naudotos bandomosios koncentracijos ir anglies kiekis, įdėtas į kiekvieną bandymo kolbą, bet koks tirpiklių naudojimas,

— išsami informacija apie naudotą sėjimo kultūrą, bet koks išankstinis apdorojimas ir išankstinis kondicionavimas,

— inkubacijos temperatūra,

— IC analizės principo pagrindimas,

— pagrindinės naudotų IC analizatorių charakteristikos (ir bet kokie kiti naudoti analizės metodai),

— pakartotinių bandymų skaičius.

Rezultatai:

— lentelėje pateikti neapdoroti duomenys ir apskaičiuotos biologinio skaidymo vertės,

▼M4

— bandomųjų ir etaloninių cheminių medžiagų skaidymo procentinės dalies grafikas atsižvelgiant į laiką, vėlavimo fazė, skaidymo fazė, 10 parų langas ir statumas,

— procentinė šalinimo dalis kreivės plokščiosios dalies fazėje, bandymo pabaigoje ir po 10 parų lango,

— bet kokio bandymo rezultatų atmetimo priežastys,

— bet kokie kiti faktai, susiję su taikyta procedūra,

— rezultatų aptarimas.

LITERATŪRA

1. Šio priedo C.4 skyrius. Lengvo biologinio skaidumo nustatymas. CO_2 išsiskyrimo tyrimo metodas (Metodas C.4-C).

2. Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,.Oil Chem Soc. 50: 159–167.

3. Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153–1161.

4. Larson RJ, Hansmann MA and Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195–1210.

5. ISO 9439 (1990; revised 1999). Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - Carbon dioxide evolution Test (Sturm).

6. US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

7. US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

8. Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922–929.

9. Weytjens D, Van Ginneken I and Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801–812.

10. Ennis DM and Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181–185.

11. Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH and Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51–53.

12. Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233–243.

13. Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. SAFEty 19: 204–211.

14. Birch RR and Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507–524.

15. Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527–1550.

▼**M4**

16. ISO 14593, (1999) Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels ($C0_2$ headspace test).

17. Battersby NS (1997). The ISO headspace $C0_2$ biodegradation test, Chemosphere 34: 1813–1822.

18. US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

19. Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR and Starkey M (1999). An „inherent“ biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219–3235.

20. Šio priedo C.4 skyrius. Lengvo biologinio skaidumo nustatymas.

21. OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.

22. Šio priedo C.11 skyrius. Veikliojo dumblo respiracijos slopinimo bandymas.

23. Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319–327.

24. ES (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

25. ISO 10634 (1996) 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.

▼M4

1 priedėlis

SANTRUMPOS IR SĄVOKŲ APIBRĖŽTYS

IC – neorganinė anglis.

$ThCO_2$ – teorinis anglies dioksidas (mg) yra anglies dioksido kiekis, apskaičiuotas kaip išsiskiriantis iš žinomo ar išmatuoto anglies kiekio bandomojoje cheminėje medžiagoje, visiškai ją suskaidžius; taip pat išreikštas kaip mg anglies dioksido, išsiskyrusio iš bandomosios cheminės medžiagos mg.

DOC – ištirpusi organinė anglis – tirpale esanti organinė anglis arba perleidžiama per 0,45 mikrometro filtrą ar liekanti nusistojusiame skystyje anglis užbaigus 15 minučių centrifugavimą taikant maždaug 4 000 g vertę (apie 40 000 m sek^{-2}).

DIC – ištirpusi neorganinė anglis.

ThIC – teorinė neorganinė anglis.

TIC – bendroji neorganinė anglis.

Lengvai biologiškai skaidoma – siekiant nustatyti visišką biologinį skaidymą atliekamų tam tikrų specialių atrankos bandymų reikalavimus atitinkančių cheminių medžiagų sutartinis klasifikavimas; atliekant šiuos bandymus laikomasi labai griežtų reikalavimų, todėl daroma prielaida, kad šios cheminės medžiagos turi būti greitai ir visiškai skaidomos vandens aplinkoje aerobinėmis sąlygomis.

10 parų langas – 10 parų iš karto po 10 % biologinio skaidymo užtikrinimo.

Būdingasis biologinis skaitomumas – cheminių medžiagų klasifikavimas remiantis neabejojamais biologinio skaidymo (pirminio ar visiško) įrodymais atliekant bet kokį biologinio skaidomumo bandymą.

Visiškas biologinis skaidymas – užtikrinamas skaidymo lygis, kai bandomąją cheminę medžiagą visiškai sunaudoja mikroorganizmai ir kai išskiriamas anglies dioksidas, vanduo, mineralinės druskos ir naujos mikrobiologinės ląstelinės sudedamosios dalys (biomasė).

Mineralizacija – visiškas organinio junginio skilimas į CO_2 ir H_2O aerobinėmis sąlygomis, ir į CH_4, CO_2 bei H_2O anaerobinėmis sąlygomis.

Vėlavimo tarpsnis – trukmė nuo bandymo pradžios iki skaidančiųjų mikroorganizmų aklimatizavimo ir (arba) prisitaikymo ir bandomosios cheminės medžiagos arba organinės medžiagos biologinio skaidymo padidėjimo tiek, kad jį įmanoma nustatyti (pvz., 10 % didžiausio teorinio biologinio skaidymo ar mažesnio atsižvelgiant į matavimo metodikos tikslumą).

Skaidymo tarpsnis – trukmė nuo vėlavimo fazės pabaigos iki tos akimirkos, kai užtikrinamas 90 % aukščiausio skaidymo lygio.

Kreivės plokščiosios dalies tarpsnis – kreivės plokščiosios dalies fazė – tokia fazė, kai užtikrinamas didžiausias skaidymas ir biologinio skaidymo kreivė išsitiesina.

Bandomoji cheminė medžiaga – bet kokia naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga ar mišinys.

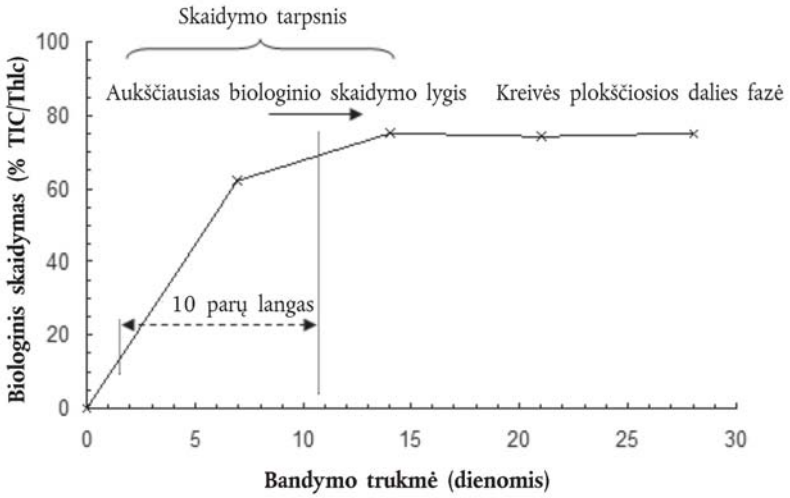
▼M4

2 priedėlis

Biologinio skaidymo kreivės pavyzdys

1 paveikslas

CO_2 esančio 1-oktanolio biologinis skaidymas viršutinėje erdvėje



Žodynėlis

biologinis skaidymas

skaidymo tarpsnis

aukščiausias biologinio skaidymo lygis

kreivės plokščiosios dalies fazė

10 parų langas

bandymo trukmė (dienomis)

▼M4

C.30. **BIOLOGINIS KAUPIMASIS DUGNO MAŽAŠERĖSE KIRMĖLĖSE**

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka OECD bandymo gaires (TG) Nr. 317 (2010). Iš bandymo metodų, susijusių su išliekamumu aplinkoje, atitinkamai 1996 m. ir 2008 m. buvo paskelbta – Biologinio kaupimosi koncentracijos didėjimas: bandymas su žuvimis pratekėjimo sąlygomis (šio priedo 49 pastraipa, C.13 skyrius) ir Biologinis kaupimasis nuosėdose gyvenančiose *Oligochaetes* (53). Vandens aplinkos biologinio kaupimosi duomenų ekstrapoliavimas sausumos organizmams, pvz., sliekams, sunkiai įvykdomas, jeigu apskritai įmanomas. Vertinant biologinį cheminių medžiagų kaupimąsi dirvožemyje šiuo metu naudojami bandomosios cheminės medžiagos lipofilinėmis savybėmis, pvz., (14) (37), pagrįsti skaičiavimo modeliai, pvz., ES Techninių gairių dokumente (19). Poreikis parengti su terpe susijusį specialų bandymo metodą jau yra patenkintas, pvz., (55). Šis metodas yra ypač svarbus įvertinant antrinį apsinuodijimą sausumos mitybos grandinėse (4). Keli nacionaliniai bandymų metodai yra skirti biologiniam kaupimuisi organizmuose, išskyrus žuvis, pvz. (2) ir (72). Biologinio kaupimosi sliekuose ((*Eisenia fetida*, Savigny) *ir* enchitrėjuose iš užterštų dirvožemių matavimo metodą parengė Amerikos bandymų ir medžiagų draugija (ASTM) (3). Tarptautiniu mastu priimtas biologinio kaupimosi dirvožemyje su bandomąja medžiaga įvertinimo metodas padėtų geriau įvertinti cheminių medžiagų keliamą riziką sausumos ekologinėms sistemoms, pvz., (25) (29).

2. Dirvožemį vartojančius bestuburius veikia dirvožemyje esančios cheminės medžiagos. Be visų kitų gyvūnų, dugno mažašerės kirmėlės yra svarbios išlaikant dirvožemių struktūrą ir jų veiksmingumą (15) (20). Mažašerės kirmėlės gyvena dirvožemyje ir iš dalies dirvožemio paviršiuje (ypač miško paklotėje); biomasės atžvilgiu jos dažnai būna gausiausia rūšis (54). Permaišydami dirvožemio sudedamąsias dalis ir būdami kitų gyvūnų grobiu minėti gyvūnai gali daryti didelį poveikį chemines medžiagas pasisavinantiems kitiems gyvūnams, kaip antai, bestuburiams (pvz., plėšriosioms erkėms ir vabalams, pvz., (64)) arba stuburiniams (pvz., lapėms ir kirams). Kai kurios dugno mažašerių kirmėlių rūšys, dabartiniu metu naudojamos atliekant ekotoksikologinius bandymus, aprašytos 5 priedėlyje.

3. ASTM Pavyzdinėse gairėse dėl dirvožemio toksiškumo arba biologinio kaupimosi laboratorinių bandymų atlikimo naudojant *Lumbricid* sliekus *Eisenia fetida* ir enchitrėjus *Enchytraeus albidus* (3) pateikta daug esminių ir naudingų nurodymų taikant esamą biologinio kaupimosi dirvožemyje bandymo metodą. Kiti dokumentai, į kuriuos daroma nuoroda šiame bandymo metode, yra šio priedo C.13 skyrius, Biologinio kaupimosi koncentracijos didėjimas: bandymas su žuvimis pratekėjimo sąlygomis (49) ir OECD TG 315: Biologinis kaupimasis nuosėdose gyvenančiuose *Oligochates* (53). Praktinė patirtis atliekant biologinio kaupimosi dirvožemyje tyrimus ir leidiniai, pvz., (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79), taip pat yra svarbūs šio bandymo metodo informacijos šaltiniai.

4. Šis bandymo metodas daugiausiai taikomas tiriant stabilias, neutralias organines chemines medžiagas, kurias paprastai adsorbuoja dirvožemiai. Naudojant šį metodą galima tirti biologinį stabilių metaloorganinių medžiagų kaupimąsi dirvožemyje. Jį taip pat galima taikyti tiriant metalus ir kitus mikroelementus.

BŪTINOS SĄLYGOS

5. Cheminės medžiagos biologinio kaupimosi dugno mažašerėse kirmėlėse bandymai buvo atlikti naudojant sunkiuosius metalus (žr., pvz., (63)) ir patvarias organines medžiagas (jų log Kow vertės 3,0–6,0 (40)). Šie bandymai taip pat taikomi:

— cheminėms medžiagoms, kurių log K_{ow} vertė didesnė negu 6,0 (ypač hidrofobinės cheminės medžiagos),

▼M4

— cheminėms medžiagoms, laikomoms organinėmis cheminėmis medžiagomis, kurioms būdinga savybė biologiškai kauptis gyvuose organizmuose, pvz., aktyviosios paviršiaus cheminės medžiagos arba didelės sugerties cheminės medžiagos,

— cheminėms medžiagoms, kurioms savybė biologiškai kauptis būdinga atsižvelgiant į jų struktūros ypatybes, pvz., analoginės cheminės medžiagos, kurių žinomas biologinio kaupimosi potencialas, ir

— metalams.

6. Prieš pradedant tyrimą turėtų būti žinoma informacija apie bandomąją cheminę medžiagą, pvz., bendrasis pavadinimas, cheminis pavadinimas (geriausiai nurodyti IUPAC pavadinimą), struktūrinė formulė, CAS registracijos numeris, grynumas, atsargumo priemonės, privalomosios sandėliavimo sąlygos ir analizės metodai. Be to, turėtų būti žinoma ši informacija:

a) tirpumas vandenyje;

b) oktanalio ir vandens pasiskirstymo koeficientas K_{ow};

c) dirvožemio ir vandens pasiskirstymo koeficientas, išreikštas K_{oc};

d) garų slėgis;

e) skaidomumas (pvz., dirvožemyje, vandenyje);

f) žinomi metabolitai.

7. Galima naudoti žymėtąsias ir nežymėtąsias bandomąsias chemines medžiagas. Tačiau siekiant palengvinti analizę rekomenduojama naudoti žymėtąsias bandomąsias chemines medžiagas. Sprendimas priimamas atsižvelgiant į aptikimo ribas arba pradinės bandomosios cheminės medžiagos ir metabolitų matavimo reikalavimą. Jeigu naudojama žymėtoji bandomoji cheminė medžiaga ir matuojamas bendrasis radioaktyviųjų liekanų kiekis, svarbu užtikrinti, kad žymėtosios liekanos dirvožemyje ir bandomuosiuose organizmuose būtų apibūdinamos procentine pradinės cheminės medžiagos ir žymėtosios nepradinės cheminės medžiagos dalimi, pvz., stabilioje būsenoje paimtuose ėminiuose ar ėmimo tarpsnio pabaigoje siekiant sudaryti galimybę apskaičiuoti atitinkamos pradinės bandomosios cheminės medžiagos ir dirvožemio metabolitų (žr. 50 pastraipą) biologinio kaupimosi kriterijų. Šį aprašytąjį metodą gali tekti modifikuoti, pvz., pateikti pakankamą kiekį biomasės siekiant išmatuoti nežymėtosios organinės bandomosios cheminės medžiagos arba metalų kiekį. Matuojant bendrąjį radioaktyviųjų liekanų kiekį (skystiniu blyksimuoju skaitikliu, kai užbaigiama ekstrakcija, deginimas ar audinio soliubilizavimas) biologinio kaupimosi kriterijus (toliau – BAF) yra grindžiamas pradine bandomąja chemine medžiaga ir metabolitais. Apskaičiuojant BAF visų pirmiausiai turėtų būti atsižvelgiama į pradinės bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją organizmuose ir bendrąsias radioaktyviąsias liekanas. Vėliau biotos-sedimentų akumuliacijos faktorius (toliau – BSAF), perskaičiuotas į kirmėlių lipidų kiekį ir dirvožemio organinės anglies (OC) kiekį, turėtų būti apskaičiuotas naudojantis BAF, kad būtų užtikrintas skirtingų biologinio kaupimosi bandymų rezultatų palyginamumas.

8. Turėtų būti žinomas bandomosios cheminės medžiagos toksiškumas bandomųjų rūšių gyvūnams, pvz., poveikio koncentracija (ECx) ar mirtinoji koncentracija (LCx) sugerties tarpsnio laikotarpiu (pvz., (19)). Visų pirmiausiai turėtų būti pasirenkama tokia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kad šios medžiagos aštrios asimptotinės LC_{50} ji sudarytų apie 1 % ir būtų bent dešimt kartų didesnė negu jos aptikimo riba dirvožemyje naudojant analizės metodą. Jeigu turima, pirmenybė turėtų būti teikiama toksiškumo vertėms, nustatytoms atliktais ilgalaikės trukmės tyrimais apie subletalinius poveikius (51) (52). Jeigu šie duomenys neprieinami, naudinga informacija būtų gaunama atlikus ūmaus toksiškumo bandymą (žr. pvz., 23 pastraipą).

▼M4

9. Turėtų būti naudojamas žinomo tikslumo, glaudumo ir jautrumo analizės metodas kiekybiškai nustatyti cheminę medžiagą bandomuosiuose tirpaluose, dirvožemyje ir biologinėse medžiagose bei žinoma išsami informacija apie ėminio ruošimą ir sandėliavimą bei medžiagų saugos duomenų lapai. Taip pat turėtų būti žinomos bandomosios medžiagos aptikimo ribos dirvožemyje ir kirmėlės audinyje. Jeigu naudojama 14C pažymėta bandomoji cheminė medžiaga, turėtų būti žinomas savitasis radioaktyvumas (t. y. Bq mol-1) ir procentinė su priemaišomis susijusi radioaktyvumo dalis. Bandomosios cheminės medžiagos savitasis radioaktyvumas turėtų būti ganėtinai didelis siekiant palengvinti analizę ir pasirinktos bandomosios koncentracijos neturėtų sukelti toksiško poveikio.

10. Bandymą leidžiama atlikti su dirbtiniu dirvožemiu arba su natūraliu dirvožemiu. Prieš pradedant bandymą turėtų būti žinoma informacija apie naudojamo natūralaus dirvožemio charakteristikas, pvz., dirvožemio kilmė arba jo sudedamosios dalys, pH, organinės anglies kiekis, granuliometrinė sudėtis (procentinė smėlio, nuosėdų ir molio dalis) ir vandens sulaikymo geba (3) (48).

BANDYMO METODO ESMĖ

11. Bandomosios cheminės medžiagos biologinį kaupimąsi apibūdinantys parametrai – biologinio kaupimosi kriterijus (BAF), sugerties greičio konstanta (k_s) ir šalinimo greičio konstanta (k_e). Sąvokų apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

12. Bandymą sudaro dvi dalys: sugerties (poveikio) tarpsnis ir šalinimo tarpsnis (tarpsnis po poveikio). Sugerties tarpsnyje tapačios kirmėlių grupės suleidžiamos į dirvožemį, į kurį yra įterpta bandomoji cheminė medžiaga. Be bandomųjų gyvūnų, kontrolinių kirmėlių grupės laikomos tomis pačiomis sąlygomis, tačiau be bandomosios cheminės medžiagos. Išmatuojama bandomųjų organizmų sausoji masė ir lipidų kiekis. Šį matavimą galima atlikti naudojant kontrolinės grupės kirmėles. Analizės fono vertes (tuščiąsias vertes) galima gauti analizuojant kontrolinių kirmėlių ėminius ir dirvožemį. Šalinimo tarpsniui kirmėlės perkeliamos į dirvožemį be bandomosios cheminės medžiagos. Šalinimo tarpsnis visada būtinas, nebent bandomosios cheminės medžiagos įsisavinimas sugerties etape būtų gana nedidelis. Pasirinkus šalinimo tarpsnį gaunama informacija apie greitį, kuriuo bandomieji organizmai (pvz., 27)) šalina bandomąją cheminę medžiagą. Jeigu per sugerties tarpsnį stabili būsena nėra užtikrinama, nustatant kinetinius parametrus – biologinio kaupimosi kinetinį kriterijų BAFk, sugerties ir šalinimo greičio konstantą (-as) – visų pirmiausiai turėtų būti remiamasi vienalaikiu sugerties ir šalinimo tarpsnių rezultatų pritaikymu. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracija kirmėlėse ir jas veikiančios medžiagos koncentracija stebima per abu bandymo etapus.

13. Sugerties tarpsniu atliekami matavimai; ėminiai imami ne daugiau negu 14 dienų (*enchytraeids*) arba 21 dieną (sliekų atveju), kol užtikrinama nuostovi būsena (11) (12) (67). Nuostovi būsena užtikrinama tuo atveju, kai kirmėlių koncentracija atsižvelgiant į laiką yra lygiagreti laiko ašiai ir atlikus paimtų ne trumpesniais negu dviejų dienų intervalais ėminių tris einančias viena po kitos koncentracijos analizes jų tarpusavio rezultatai skiriasi ne daugiau negu ± 20 % (remiamasi statistiniais palyginimais, pvz., dispersine analize, regresijos analize).

14. Per šalinimo tarpsnį bandomieji organizmai perkeliami į indus su tuo pačiu substratu, tačiau be bandomosios cheminės medžiagos. Per šalinimo tarpsnį atliekami matavimai imant ėminius 14 dienų (*enchytraeids*) arba 21 dieną (sliekų atveju), jeigu po ankstesnio analizinio nustatymo neužregistruojama, kad bandomosios cheminės medžiagos likučių kiekis kirmėlėse sumažėjo 90 %. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracija kirmėlėse šalinimo tarpsnio pabaigoje registruojama kaip nepašalintieji likučiai. Biologinio

▼M4

kaupimosi kriterijus esant nuostoviajai būsenai (BAFss) visų pirmiausiai apskaičiuojamas ir kaip koncentracijos kirmėlėse (Ca) bei dirvožemyje (Cs) santykis akivaizdžiai nuostovioje būsenoje, ir kaip kinetinis biologinio kaupimosi kriterijus (BAFK), t. y. kaip sugerties iš dirvožemio greičio konstantos (ks) ir šalinimo greičio konstantos (ke) santykis (žr. 1 priedėlyje pateiktas sąvokų apibrėžtis); šiuo atveju daroma prielaida dėl pirmojo laipsnio kinetikos (apskaičiavimai nurodyti 2 priedėlyje). Jeigu yra akivaizdu, kad pirmojo laipsnio kinetika nėra taikoma, turėtų būti pasirenkami kiti modeliai.

15. Naudojant kompiuterizuotas modelines lygtis (gairės pateiktos 2 priedėlyje) apskaičiuojama sugerties greičio konstanta, šalinimo greičio konstanta (ar konstantos, jeigu naudojami kiti modeliai), kinetinis biologinio kaupimosi kriterijus (BAFK) ir, jeigu įmanoma, kiekvieno iš šių parametrų pasikliautinieji rėžiai. Bet kokio modelio atitiktį galima nustatyti taikant koreliacijos koeficientą arba mišrios koreliacijos koeficientą (jeigu koeficientų vertė yra beveik lygi vienetui, šiuo atveju atitiktis yra pakankama) ar taikant chi kvadrato kriterijų. Be to, įvertintųjų parametrų standartinės paklaidos ar pasikliautinojo rėžio dydžiu galima remtis apsisprendžiant dėl modelio atitikties.

16. Siekiant sumažinti lipofiliškų bandomųjų cheminių medžiagų rezultatų kintamumą biologinio kaupimosi kriterijai turėtų būti išreiškiami atsižvelgiant į lipidų kiekį ir organinės anglies kiekį (dirvožemio kg organinės anglies (OC) kg-1 kirmėlių lipidų kiekis). Šis metodas grindžiamas tuo, kad cheminių medžiagų tam tikrų klasių atžvilgiu galima nurodyti aiškų jų biologinio kaupimosi gebos ir lipofiliškumo sąryšį; šis santykis gerai pagrįstas tiriant žuvis (47). Nustatytas lipidų kiekio žuvyje ir šių cheminių medžiagų biologinio kaupimosi sąryšis. Panašus tarpusavio ryšys nustatytas bentosiniams organizmams, pvz., (30) (44). Panašiai šis tarpusavio ryšys įrodytas dugno mažašerėms kirmėlėms, pvz., (5) (6) (7) (14). Jeigu turimas pakankamas kiekis kirmėlės audinio, bandomųjų gyvūnų lipidų kiekį galima nustatyti naudojant tą pačią biologinę medžiagą, kuri buvo pasirinkta apibrėžiant bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją. Matuojant lipidų kiekį antraip galima naudoti kontroliniu gyvūnus.

BANDYMO VALIDUMAS

17. Bandymas laikomas validuotu, jeigu laikomasi šių kriterijų:

— bandymo pabaigoje bendrasis gaištamumas sugerties tarpsniu ir šalinimo tarpsniu neturėtų viršyti 10 % (sliekai) arba 20 % (*enchytraeids*) viso naudotų kirmėlių skaičiaus,

— jei tai *Eisenia fetida* ir *Eisenia andrei*, sugerties tarpsnio ir šalinimo tarpsnio pabaigoje išmatuota vidutinė sumažėjusi masė neturėtų būti didesnė negu 20 %, palyginti su pradine šviežių gyvūnų mase (š. m.) kiekvieno tarpsnio pradžioje.

METODO APRAŠYMAS

Bandomųjų gyvūnų rūšys

18. Atliekant biologinio kaupimosi bandymą rekomenduojama pasirinkti kelių rūšių dugno mažašeres kirmėles. Dažniausiai naudojamos *Eisenia fetida* arba *Eisenia andrei* (*Lumbricidae*), arba *Enchytraeus albidus, Enchytraeus crypticus*, ar *Enchytraeus luxuriosus* (*Enchytraeidae*)) rūšys aprašytos 5 priedėlyje.

▼M4

Aparatūra

19. Būtina pasirūpinti, kad nebūtų naudojamos medžiagos, įrangos bet kokios dalys, galinčios tirpdyti, adsorbuoti bandomąją cheminę medžiagą ar pašalinti kitas chemines medžiagas ir neigiamai paveikti bandomuosius gyvūnus. Atsižvelgiant į apkrovos dydį, t. y. bandomųjų dugno mažašerių kirmėlių skaičių, leidžiama naudoti iš cheminiu atžvilgiu inertiškos medžiagos pagamintus ir tinkamos talpos įprastus keturkampio arba cilindro formos indus. Su bandymo terpe besiliečianti bet kokia įranga gali būti iš nerūdijančio plieno, plastiko ar stiklo. Bandymo indai turėtų būti tinkamai uždengti, kad iš jų neištrūktų mažašerės kirmėlės, tačiau taip pat užtikrinamas reikiamas oro tiekimas. Naudojant chemines medžiagas, kurioms būdingas didelis sugerties koeficientas, pvz., sintetinius piretroidus, gali tekti rinktis silanizuotą stiklą. Susiklosčius aprašytosioms situacijoms įrangą tenka šalinti, kai ji baigiama naudoti (49). Privaloma pasirūpinti, kad atliekant bandymus naudotos žymėtosios priemonės ir lakiosios cheminės medžiagos nepatektų į aplinką. Gaudyklės (pvz., stiklinės dujų plovimo kolbos) turėtų būti naudojamos su tinkamais adsorbentais, galinčiais sulaikyti bet kokias iš bandymo indų garuojančias liekanas.

Dirvožemis

20. Atliekant bandymą naudojamas tokios kokybės dirvožemis, kad būtų užtikrinamas bandomųjų organizmų išgyvenimas ir ypač dauginimasis aklimatizavimo laikotarpiu bei bandymo laikotarpiais ir kad šie gyvūnai neįgautų neįprastos išvaizdos ar nepradėtų keistai elgtis. Mažašerės kirmėlės turėtų įsirausti į dirvožemį.

21. Atliekant bandymus kaip substratą rekomenduojama naudoti šio priedo (48) C.8 skyriuje aprašytą dirbtinį dirvožemį. Atliekant biologinio kaupimosi bandymus naudotino dirbtinio dirvožemio pasiruošimo ir dirbtino dirvožemio sandėliavimo rekomendacijos pateiktos 4 priedėlyje. Ore džiovintą dirbtinį dirvožemį, kol jis bus pradėtas naudoti, galima sandėliuoti kambario temperatūros sąlygomis.

22. Tačiau iš neužterštų vietovių paimtus natūralius dirvožemius galima naudoti kaip bandymo ir (arba) kirmėlių auginimo dirvožemį. Natūralūs dirvožemiai turėtų būti apibūdinami bent savo kilme (paėmimo vieta), pH, organinės anglies kiekiu, granuliometrine sudėtimi (procentinė smėlio, nuosėdų ir molio dalis), vandens sulaikymo geba ir procentine vandens kiekio dalimi (3). Prieš pradedant naudoti, jeigu atliekama dirvožemio arba jo sudedamųjų dalių mikroteršalų analizė, šiuo atveju būtų gaunama naudingos informacijos. Jeigu naudojamas žemės ūkio paskirties žemės lauko dirvožemis, prieš imant ėminius (50) jis neturėtų būti buvęs apdorotas javų apsaugos produktais ar ne trumpiau negu vienerius metus netręštas gyvulių mėšlu ir ne trumpiau negu šešis mėnesius netręštas organinėmis trąšomis. Natūralių dirvožemių tvarkymo procedūros prieš imantis juos naudoti ekotoksikologiniams bandymams su mažašerėmis kirmėlėmis aprašyti (3). Natūralių dirvožemių laikymo trukmė laboratorijoje turėtų būti kiek įmanoma trumpesnė.

Bandomosios cheminės medžiagos taikymas

23. Bandomoji cheminė medžiaga įterpiama į dirvožemį. Turėtų būti atsižvelgiama į bandomosios cheminės medžiagos fizines ir chemines savybes. Vandenyje tirpi bandomoji cheminė medžiaga prieš įmaišant ją į dirvožemį turėtų būti visiškai ištirpinama vandenyje. Įterpiant mažai vandenyje tirpią bandomąją cheminę medžiagą rekomenduojama taikyti tokią įterpimo procedūrą, kai viena ar daugiau (dirbtinio) dirvožemio sudedamųjų dalių dengiama bandomąja chemine medžiaga. Pvz., kvarcinį smėlį ar jo dalį galima mirkyti tinkamame organiniame tirpiklyje ištirpytos bandomosios cheminės medžiagos tirpale; vėliau šis tirpiklis yra iš lėto išgarinamas. Padengtą sudedamąją dalį vėliau galima įmaišyti į dirvožemį. Pagrindinis šios procedūros pranašumas – į dirvožemį nepakliūna tirpiklio. Jeigu naudojamas natūralus dirvožemis, bandomoji cheminė medžiaga įterpiama į ore džiovintą dirvožemio dalį kaip aprašyta pirmiau (ruošiantis dirbtinį dirvožemį) arba bandomoji cheminė medžiaga įmaišoma į drėgną dirvožemį ir vėliau taikoma garinimo procedūra, jeigu buvo naudota stabilizavimo priemonė. Apskritai

▼M4

kiek įmanoma turėtų būti stengiamasi, kad drėgnas dirvožemis susiliestų su tirpikliu. Turėtų būti atsižvelgiama į šiuos dalykus (3):

— jeigu naudojamas ne vanduo, o kitas tirpiklis, pastarasis turi būti tinkamas maišyti su vandeniu ir (arba) jį turi būti įmanoma pašalinti (pvz., išgarinti), kad dirvožemyje liktų tik bandomoji cheminė medžiaga,

— jeigu naudojamas tirpiklio kontrolinis ėminys, neigiamo kontrolinio mėginio naudoti nebūtina. tirpiklio kontrolinio ėminio koncentracija turėtų būti didžiausia į dirvožemį įterpto tirpiklio koncentracija ir turėtų būti naudojamas tos pačios partijos tirpiklis, kuris buvo pasirinktas ruošiantis pradinį tirpalą; renkantis tinkamą soliubilizavimo priemonę pagrindiniai kriterijai turėtų būti tirpiklio toksiškumas ir lakumas bei bandomosios cheminės medžiagos tirpumas pasirinktame tirpiklyje.

24. Pasirinkus vandenyje ir organiniuose tirpikliuose mažai tirpias chemines medžiagas, 2,0–2,5 g smulkiai malto kvarcinio smėlio grūstuvėje ar piestoje galima sumaišyti vienam bandymo indui su tam tikru bandomosios cheminės medžiagos kiekiu, kad būtų pasiruošta reikiama bandomoji koncentracija. Šis kvarcinio smėlio ir bandomosios cheminės medžiagos mišinys įterpiamas į iš anksto sudrėkintą dirvožemį ir kruopščiai sumaišomas su reikiamu dejonizuoto vandens kiekiu siekiant užtikrinti būtiną drėgmės kiekį. Galutinis mišinys paskirstomas po bandymo indus. Procedūra kartojama pasirinkus kiekvieną bandomąją procedūrą ir taip pat pasiruošiami atitinkami kiekvieno bandymo indo kontroliniai bandiniai su 2,0–2,5 g smulkiai sumalto kvarcinio smėlio.

25. Bandomąją cheminę medžiagą įterpus į dirvožemį turėtų būti nustatyta jos koncentracija. Bandomosios cheminės medžiagos tolydus pasiskirstymas dirvožemyje turi būti patikrintas prieš į dirvožemį įdedant bandomuosius gyvūnus. Į ataskaitą turėtų būti įtrauktas pasirinkto bandomosios cheminės medžiagos įterpimo metodo apibūdinimas ir nurodomos jo pasirinkimo priežastys.

26. Dirvožemio ir porų vandens fazės pusiausvyrą geriausiai būtų užtikrinti prieš įdedant organizmus; rekomenduojama pasirinkti keturių dienų laikotarpį su 20 °C temperatūra. Daugelio mažai vandenyje tirpstančių organinių cheminių medžiagų laikotarpis, kol nusistovi tikroji pusiausvyra tarp adsorbuojamų ir ištirpusių frakcijų, gali trukti kelias dienas ar mėnesius. Atsižvelgiant į tyrimo tikslą, pvz., jeigu turi būti modeliuojamos aplinkos sąlygos, dirvožemį su įterpta bandomąja chemine medžiaga galima „brandinti“ ilgesnį laikotarpį, pvz., metalų šis laikotarpis gali trukti tris savaites 20 °C temperatūroje (22).

Bandomųjų organizmų auginimas

27. Mažašerės kirmėlės visų pirmiausiai turėtų būti laikomos skaidrioje laboratorinėje kultūroje. Laboratorinės kultūros, skirtos *Eisenia fetida, Eisenia andrei,* ir *Enchytraeid* rūšims, metodų gairės pateiktos 5 priedėlyje (žr. taip pat (48) (51) (52)).

28. Atliekant bandymus naudojamos mažašerės kirmėlės neturėtų sirgti jokiomis įmanomomis nustatyti ligomis, nebūtų kokiu nors atžvilgiu neįprastos ar apniktos parazitų.

BANDYMO ATLIKIMAS

29. Bandomuosius organizmus sugerties tarpsnio laikotarpiu veikia bandomoji cheminė medžiaga. Sugerties tarpsnio trukmė turėtų būti 14 dienų (*enchytraeids*) arba 21 diena (sliekai), jeigu nėra įrodoma, kad nebuvo užtikrinta nuostovi būsena.

▼M4

30. Šalinimo tarpsniui mažašerės kirmėlės perkeliamos į dirvožemį be bandomosios cheminės medžiagos. Pirmasis ėminys turėtų būti imamas 4–24 val. po šalinimo tarpsnio pradžios. Ėminių ėmimo pavyzdžiai pasirinkus 21 dienos sugerties tarpsnį ir 21 dienos šalinimo tarpsnį yra pateikti 3 priedėlyje.

Bandomieji organizmai

31. Daugelio rūšių dirvožemio enchitrėjų masė yra labai maža (pvz., 5–10 mg *Enchytraeus albidus* individo šlapioji masė ir dar mažesnė *Enchytraeus crypticus* ir *Enchytraeus luxuriosus* masė); norint išmatuoti masę ir atlikti cheminę analizę gali tekti sujungti tapačių bandymo indų mažašeres kirmėles (t. y. siekiant gauti vieną audinio analizės rezultatą turėtų būti naudojamos visos tapataus indo mažašerės kirmėlės). Į kiekvieną tapatų indą įleidžiama po 20 enchitrėjų individų ir turėtų būti naudojami bent trys tapatūs indai. Jeigu bandomosios cheminės medžiagos analizinio nustatymo riba yra didelė, gali tekti naudoti daugiau mažašerių kirmėlių. Jeigu pasirenkami tų rūšių gyvūnai, kurių individo masė yra didesnė (*Eisenia fetida* ir *Eisenia andrei*), galima naudoti vieną individą iš tapačių indų.

32. Atliekant bandymą naudojami sliekai turėtų būti panašios masės (pvz., *Eisenia fetida* ir *Eisenia andrei* individų masė turėtų būti 250–600 mg). Enchitrėjų (pvz., *Enchytraeus albidus*) ilgis turėtų būti maždaug 1 cm. Visos mažašerės kirmėlės, naudojamos specialiam bandymui, turėtų būti gautos iš to paties šaltinio ir būti suaugę gyvūnai su kliteliumu (*clitellum*) (žr. 5 priedėlį). Gyvūno amžius ir masė gali daryti įtaką BAF vertėms (pvz., atsižvelgiant į skirtingą lipidų kiekį ir (arba) kiaušinėlių turėjimą), todėl šiuos parametrus privalomas tiksliai užrašyti ir į juos atsižvelgtina aiškinant rezultatus. Be to, kokonus galima padėti per sugerties tarpsnį, kuris taip pat darys poveikį BAF vertėms. Rekomenduojama, kad bandomųjų mažašerių kirmėlių ėminio dalis būtų pasveriama prieš bandymą siekiant įvertinti vidutinę sausąją ir šlapiąja masę.

33. Turėtų būti pasirinkamas didelis dirvožemio ir mažašerių kirmėlių santykis siekiant užtikrinti, kad sugerties tarpsniu bandomosios cheminės medžiagos koncentracija dirvožemyje sumažėtų kuo mažiau. Rekomenduojama, kad bandymo inde, jeigu pasirinkta *Eisenia fetida* ir *Eisenia andrei*, vienai mažašerei kirmėlei tektų ne mažiau negu 50 g sausosios masės (s. m.), o enchitrėjams būtų skirta ne mažiau negu 10–20 g sausosios masės. Šiuose induose turėtų būti 2–3 cm dirvožemio sluoksnis (enchitrėjams) arba 4–5 cm sluoksnis sliekams.

34. Atliekant bandymą naudojamos mažašerės kirmėlės išimamos iš auginimo kultūros (pvz., enchitrėjai išimami juvelyro žnyplelėmis). Suaugę gyvūnai perkeliami į bandymo dirvožemį be bandomosios cheminės medžiagos, kur jie aklimatizuojami ir šeriami (žr. 36 pastraipą). Jeigu bandymo sąlygos skiriasi nuo auginimo sąlygų, 24–72 val. aklimatizavimo tarpsnio turėtų pakakti, kad mažašerės kirmėlės prisitaikytų prie bandymo sąlygų. Po aklimatizavimo sliekai nuplaunami juos perkeliant į stiklinius indus (pvz., Petrio lėkšteles) su švariu vandeniu, tada pasveriami ir suleidžiami į bandymo dirvožemį. Prieš pasveriant mažašerės kirmėlės atsargiai prispaudžiamos prie lėkštelės krašto, kad nuo jų nutekėtų perteklinis vanduo, arba kruopščiai ir sausai nušluostomos šiek tiek suvilgyta popierine servetėle.

35. Bandomųjų gyvūnų įsirausimas į dirvožemį turėtų būti stebimas ir aprašomas. Atliekant bandymus su sliekais, gyvūnai (kontroliniai ir poveikį patyrę gyvūnai) į dirvožemį įsirausia per kelias valandas; ši trukmė turėtų būti tikrinama ne vėliau negu po 24 valandų nuo sliekų suleidimo į bandymo indus. Jeigu sliekai neįsirausia į dirvožemį (pvz., daugiau negu 10 % per ilgesnį laikotarpį negu pusė sugerties tarpsnio), vadinasi, bandymo sąlygos nėra tinkamos ar bandomieji organizmai nėra sveiki. Šiuo atveju bandymas

▼M4

turėtų būti nutraukiamas ir kartojamas iš naujo. Enchitrėjai daugiausiai gyvena plyšiuose tarp dirvožemio porų ir dažnai su aplinkiniu substratu gali liestis tik jų apvalkalas; laikoma, kad poveikis besirausiantiems ir nesirausiantiems enchitrėjams yra vienodas ir su nesirausiančiais enchitrėjais nėra būtina pakartoti bandymą.

Šėrimas

36. Šėrimas turėtų būti numatomas tuo atveju, jeigu pasirenkamas dirvožemis su mažu bendru organinės anglies kiekiu. Jeigu naudojamas dirbtinis dirvožemis, rekomenduojama savaitinė šėrimo norma (t. y. mažašerės kirmėlės turėtų būti šeriamos kartą per savaitę) yra 7 mg sauso mėšlo vienam dirvožemio sausosios masės gramui, kai šeriami sliekai, ir rekomenduojama savaitinė 2–2,5 mg maltų avižų dribsnių norma vienam dirvožemio sausosios masės gramui, kai šeriami enchitrėjai (11). Pirmoji pašaro dalis į dirvožemį turėtų būti įmaišoma iš karto prieš į jį įleidžiant bandomuosius organizmus. Tikslinga rinktis to paties tipo pašarą, kuris naudotas auginant (žr. 5 priedėlį).

Šviesa ir temperatūra

37. Bandymai turėtų būti atliekami pasirinkus reguliuojamą 16/8 valandų šviesos ir tamsos ciklą bei bandymo indų vietoje užtikrinant 400–800 lx apšvietimą. Atliekant bandymą visą laiką turėtų būti naudojama 20 ± 2 °C temperatūra.

Bandomosios koncentracijos

38. Naudojama pavienė koncentracija. Atvejai, kai būtina taikyti papildomą (-as) koncentraciją (-as), turėtų būti pagrindžiami. Jeigu bandomosios cheminės medžiagos toksiškumas (ECx) beveik tapatus analizinei aptikimo ribai, rekomenduojama naudoti žymėtąją bandomąją cheminę medžiagą (didelio savitojo radioaktyvumo žymeklį). Jeigu naudojami metalai, koncentracijos audinyje ir dirvožemyje turėtų būti didesnės negu fono lygis.

Tapatūs indai

39. Norint atlikti kinetinius matavimus (sugerties ir šalinimo tarpsnis), vienoje ėminių ėmimo vietoje turėtų būti ne mažiau negu trys tapatūs indai. Bendro pasiruoštų tapačių indų skaičiaus turėtų pakakti, kad būtų aprėpiama visa ėminių ėmimo trukmė per sugerties ir šalinimo tarpsnius.

40. Biologiniams stebėjimams ir matavimams atlikti (pvz., sausosios ir šlapiosios masės santykis, lipidų kiekis) ir fono koncentracijoms mažašerėse kirmėlėse ir dirvožemyje analizuoti turėtų būti paruošta ne mažiau negu 12 tapačių indų neigiamai kontrolei (iš keturių indų ėminiai imami pradžioje, keturi – sugerties pabaigoje ir dar keturi – šalinimo pabaigoje), jeigu kaip tirpiklis naudojamas tik vanduo. Jeigu taikant bandomąją cheminę medžiagą naudojama kokia nors soliubilizavimo priemonė, be paveiktų tapačių indų, turėtų būti paruošti tirpiklio kontroliniai ėminiai (ėminiai imami iš keturių tapačių indų sugerties tarpsnio pradžioje ir jo pabaigoje ir ėminiai imami iš keturių indų šalinimo tarpsnio pabaigoje) su visomis sudedamosiomis dalimis, išskyrus bandomąjį objektą. Šiuo atveju taip pat galima pateikti keturis papildomus neigiamos kontrolės (be tirpiklio) tapačius indus siekiant užtikrinti pasirenkamąjį ėminių ėmimą sugerties tarpsnio pabaigoje. Šiuos tapačius indus biologiniu atžvilgiu galima lyginti su tirpiklio kontroliniais ėminiais siekiant gauti informacijos apie galimą tirpiklio poveikį bandymo organizmams. Rekomenduojama paruošti pakankamą papildomų rezervinių tapačių indų skaičių (pvz., aštuonis) poveikiui ir kontroliniam (-iams) ėminiui (-iams).

▼M4

Dirvožemio kokybės matavimo dažnumas

41. Dirvožemio pH, dirvožemio drėgnumas ir temperatūra (nuolat) bandymo patalpoje turėtų būti matuojama sugerties ir šalinimo tarpsnių pradžioje ir pabaigoje. Dirvožemio drėgnumas vieną kartą per savaitę turėtų būti koreguojamas pasveriant bandymo indus ir tikrąsias mases palyginant su pradinėmis masėmis bandymo pradžioje. Sumažėjęs vandens kiekis turėtų būti kompensuojamas pripilant dejonizuoto vandens.

Mažašerių kirmėlių ir dirvožemio ėminių ėmimas bei analizė

42. Sugerties ir šalinimo tarpsnių tvarkaraščio pavyzdys atliekant biologinio kaupimosi bandymus su mažašerėmis kirmėlėmis ir enchitrėjais pateiktas 3 priedėlyje.

43. Dirvožemio ėminys imamas iš bandymo indų, kad pirmiau negu į juos įleidžiami sliekai, ir sugerties bei šalinimo tarpsniais būtų nustatyta bandomosios cheminės medžiagos koncentracija. Atliekant bandymą bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos nustatomos sliekuose ir dirvožemyje. Apskritai matuojamos bendrosios dirvožemio koncentracijos. Antraip galima matuoti koncentracijas porų vandenyje; šiuo atveju prieš pradedant tyrimą numatomas atitinkamas pagrindimas ir būtini metodai, kurie įtraukiami į ataskaitą.

44. Sugerties ir šalinimo tarpsniais sliekų bei dirvožemio ėminiai imami ne mažiau negu šešis kartus. Jeigu įrodoma, kad bandomoji cheminė medžiaga yra stabili, imamų dirvožemio ėminių skaičių galima sumažinti. Rekomenduojama, kad sugerties tarpsnio pradžioje ir pabaigoje būtų analizuojami ne mažiau negu trys kartotiniai ėminiai. Jeigu sugerties tarpsnio pabaigoje išmatuota dirvožemio koncentracija nuo pradinės koncentracijos skiriasi daugiau negu 30 %, taip pat turėtų būti analizuojami kitomis dienomis paimti dirvožemio ėminiai.

45. Iš nustatyto tapataus indo dirvožemio sliekai išimami kiekvienu ėminių ėmimo metu (pvz., tapataus indo dirvožemį paskleidus plokščiame padėkle ir lanksčiomis juvelyro žnyplelėmis išrinkus sliekus), neatidėliotinai nuplaunami vandeniu negilioje stiklinėje ar plieniniame padėkle. Pašalinamas perteklinis vanduo (žr. 34 pastraipą). Sliekai atsargiai sudedami į iš anksto pasvertą indą, nedelsiant pasveriami, įskaitant jų virškinimo trakto turinį.

46. Tada sliekams (*Eisenia sp.*) turėtų būti leidžiama valytis savo virškinamąjį traktą visą naktį, pvz., ant drėgno filtravimo popieriaus, uždengtoje Pietrio lėkštutėje (žr. 34 pastraipą). Po virškinamojo trakto valymo turėtų būti nustatoma sliekų masė siekiant įvertinti galimą biomasės sumažėjimą atliekant bandymą (žr. validumo kriterijus 17 pastraipoje), Enchitrėjai sveriami ir jų audinio analizė atliekama be jų virškinamojo trakto valymo, nes šią valymo procedūrą sunku atlikti atsižvelgiant į mažą šių sliekų dydį. Nustačius galutinę masę sliekai turėtų būti nedelsiant nudobiami naudojant patį tinkamiausią metodą (pvz., skystuoju azotu ar sušaldomi –18 °C temperatūroje).

47. Užterštą virškinamojo trakto turinį sliekai per šalinimo tarpsnį pakeičia švariu dirvožemiu. Vadinasi, matuojant iš karto prieš šalinimo tarpsnį paimto ėminio sliekus su nevalytu virškinamuoju traktu (šiuo atveju enchitrėjus) yra įtraukiamas užterštas virškinamojo trakto dirvožemis. Daroma prielaida, kad didesnioji dalis gėlavandenių mažašerių kirmėlių virškinamojo trakto turinio po 4–24 val. trukmės šalinimo tarpsnio pakeičiama švariomis nuosėdomis, pvz., (46). Panašios išvados buvo pateiktos dėl sliekų atlikus tyrimus apie žymėtojo kadmio ir cinko kaupimąsi (78). Atliekant bandymą su enchitrėjais šio šalinimo tarpsnio pirmojo ėminio koncentraciją galima laikyti audinio koncentracija pašalinus virškinamojo trakto turinį. Siekiant atsižvelgti į tiriamo objekto koncentracijos skiedimą, kuris neužterštu dirvožemiu atliekamas per sugerties tarpsnį, virškinamojo trakto turinio masę galima vertinti remiantis šlapiąja sliekų mase ir sliekų pelenų mase arba sliekų sausąja mase ir sliekų pelenų masės santykiais.

▼M4

48. Dirvožemio ir sliekų ėminiai visų pirma turėtų būti analizuojami iš karto po pašalinimo (t. y. per 1–2 dienas) siekiant užkirsti kelią skaidymuisi ar kitiems nuostoliams ir rekomenduojama apskaičiuoti apytikslį sugerties ir šalinimo greitį vykdant bandymą. Jeigu analizė atidedama, ėminiai turėtų būti laikomi reikiamomis sąlygomis, pvz., užšaldyti (≤ –18 °C).

49. Turėtų būti patikrinama, ar cheminės analizės glaudumas ir atkuriamumas bei bandomosios cheminės medžiagos regeneracija iš dirvožemio ir sliekų ėminiai atitinka nustatytam metodui taikomus reikalavimus; ataskaitoje turėtų būti nurodomas šalinimo veiksmingumas, aptikimo riba (LOD) ir kiekybinio nustatymo riba (LOQ). Taip pat turėtų būti patikrinama, ar kontroliniuose induose nėra nustatomos tokios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, kurios viršytų fono koncentraciją. Jeigu kontrolinės grupės sliekuose bandomosios cheminės medžiagos koncentracija bandomajame organizme Ca yra > 0, šis veiksnys įtraukiamas apskaičiuojant kinetinius parametrus (žr. 2 priedėlį). Atliekant bandymą visi ėminiai turėtų būti tvarkomi taip, kad tarša ir nuostoliai būtų kuo mažesni (pvz., dėl bandomosios cheminės medžiagos įgerties į ėminių ėmimo įtaisą).

50. Dirbant su žymėtosiomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis, įmanoma analizuoti pradinę medžiagą ir metabolitus. Po to ėminiai turėtų būti „išvalomi“, kad pradinę bandomąją cheminę medžiagą atskirai būtų įmanoma įvertinti kiekybiškai. Jeigu pavieniai metabolitai analizuojamame (-uose) ėminyje (-iuose) viršija 10 % bendrojo radioaktyvumo, rekomenduojama nustatyti šių metabolitų tapatybę.

51. Turėtų būti registruojamas ir įtraukiamas į ataskaitą bendrasis regeneravimas ir bandomosios cheminės medžiagos regeneravimas iš sliekų, dirvožemio ir, jeigu naudojamos, gaudyklių su adsorbentais, siekiant sulaikyti išgaravusią bandomąja medžiagą.

52. Atliekant bandymus su enchitrėjais, kurie yra mažesni negu sliekai, iš atitinkamo bandymo indo paimtus pavienius individus leidžiama sujungti į visumą. Jeigu pasirinkus sujungimą tenka mažinti tapačių indų skaičių, šiuo atveju apribojimas statistinių procedūrų, kurias galima taikyti duomenims, skaičius. Jeigu būtina taikyti specialią statistinę procedūrą ir statistinę galią, atliekant bandymą šiuo atveju turėtų būti naudojamas atitinkamas tapačių bandymo indų skaičius, kad būtų užtikrinamas norimas sujungimas į visumą arba taikoma procedūra ir galia.

53. Rekomenduojama, kad BAF būtų išreiškiamas kaip bendros sausosios masės funkcija, jeigu reikia (t. y. hidrofobiškų cheminių medžiagų), arba kaip lipidų kiekio funkcija. Turėtų būti taikomi tinkami lipidų kiekio nustatymo metodai (šiam tikslui turėtų būti pritaikomi keli esami metodai, pvz., (31) (58)). Šie metodai – chloroformo ir (arba) metanolio ekstrakcijos metodika. Tačiau siekiant išvengti chlorintų tirpiklių naudojimo reikėtų rinktis modifikuotą Bligh ir Dyer metodą (9) (aprašymas pateiktas (17)). Renkantis skirtingus metodus gali nepavykti nustatyti tapačių verčių, todėl svarbu pateikti išsamią informaciją apie naudotą metodą. Jeigu įmanoma, t. y. jeigu turimas pakankamas slieko audinio kiekis, lipidų analizę geriausia atlikti naudojant tą patį bandinį ar ekstraktą, kuris naudotas analizuojant bandomąją cheminę medžiagą, nes lipidai dažnai turi būti pašalinami iš ekstrakto prieš jį pradedant analizuoti chromatografu (49). Antraip kontrolinius gyvūnus galima naudoti matuojant lipidų kiekį, kuriuo vėliau galima remtis normalizuojant BAF vertes. Pasirinkus pastarąjį metodą sumažinama įrangos tarša bandomąja chemine medžiaga.

▼M4

DUOMENYS IR ATASKAITŲ TEIKIMAS

Rezultatų apdorojimas

54. Bandomosios cheminės medžiagos sugerties kreivė gaunama aritmetinėje skalėje brėžiant šios cheminės medžiagos koncentraciją sliekuose ir jiems poveikį sugerties tarpsiu darančią koncentraciją atsižvelgiant į jos kitimą laike. Kai kreivė pasiekia kreivės plokščiąją dalį ar nuostoviąją būseną (žr. sąvokų apibrėžtis 1 priedėlyje), biologinio kaupimosi kriterijus nuostovioje būsenoje (BAFss) apskaičiuojamas taip:

$$\frac{C_a \text{nuostovioje būsenoje arba sugerties tarpsnio pabaigoje (vidutinis)}}{C_s \text{nuostovioje būsenoje arba sugerties tarpsnio pabaigoje (vidutinis)}}$$

C_a yra bandomosios cheminės medžiagos koncentracija bandomajame organizme

C_a yra bandomosios cheminės medžiagos koncentracija dirvožemyje

55. Jeigu nuostovioji būsena nėra užtikrinama, greičio konstantomis grindžiamas BAFK turėtų būti nustatomas vietoje BAFss kaip aprašyta toliau:

— biologinio kaupimosi kriterijus (BAF_K) nustatomas kaip santykis k_s/k_e,

— sugerties ir šalinimo greitis visų pirmiausiai apskaičiuojami vienu metu (žr. 2 priedėlio 11 lygtį),

— šalinimo greičio konstanta (k_e) paprastai apskaičiuojama atsižvelgiant į šalinimo kreivę (t. y. tiriamojo objekto koncentracijos sliekuose kreivę šalinimo tarpsniu); tada šalinimo greičio konstanta k_s apskaičiuojama atsižvelgiant į k_e ir C_a vertę, kuri gaunama remiantis sugerties kreive, žr. 2 priedėlį, kuriame aprašyti šie metodai; Tinkamiausias BAFK ir greičio konstantų ks ir ke nustatymo metodas – netiesinio parametro įvertinimo metodai naudojant kompiuterį. Jeigu šalinimas akivaizdžiai nėra pirmo laipsnio, šiuo atveju turėtų būti taikomi sudėtingesni modeliai

Bandymo ataskaita

56. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukiama ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— bet kokia turima informacija apie bandomosios cheminės medžiagos ūmųjį ar ilgalaikį toksiškumą (pvz., EC_x, LC_x,, NOEC) dirvožemio sliekams,

— grynumas, fizinis pobūdis, fizinės ir cheminės savybės, pvz., log K_{ow}, tirpumas vandenyje,

— cheminės tapatybės nustatymo duomenys, bandomojo objekto šaltinis, bet kokio naudoto tirpiklio tapatybė ir koncentracija,

— jeigu naudojama žymėtoji bandomoji cheminė medžiaga, šiuo atveju nurodoma tiksli žymėtųjų atomų padėtis, savitasis radioaktyvumas ir radiocheminis grynumas.

Bandomųjų rūšių gyvūnai:

— mokslinis pavadinimas, veislė, bet koks išankstinis apdorojimas, aklimatizavimas, gyvūnų amžiaus intervalas ir t. t.

▼M4

Bandymo sąlygos:

— naudotos bandymo procedūros,

— pasirinkto apšvietimo tipas ir charakteristikos bei apšvietimo laikotarpio (ių) trukmė,

— bandymo planas (pvz., bandymo indų skaičius ir dydis, dirvožemio masė ir dirvožemio sluoksnio storis, tapačių indų skaičius, sliekų skaičius tapačiame inde, bandomųjų koncentracijų skaičius, sugerties ir šalinimo tarpsnių trukmė, ėminių ėmimo dažnumas),

— bandymo indo medžiagos pasirinkimo pagrindimas,

— tiriamojo objekto paruošimo metodas ir naudojimas bei konkretaus metodo pasirinkimo priežastys,

— nominaliosios bandymo koncentracijos, išmatuotų verčių vidurkiai ir jų standartiniai nuokrypiai bandymo induose bei šių verčių nustatymo metodai,

— dirbtinio dirvožemio sudedamųjų dalių šaltinis arba, jeigu naudojama, natūrali terpė, dirvožemio kilmė, bet kokio išankstinio apdorojimo aprašymas, kontrolinių bandinių rezultatai (išgyvenimas, biomasės didėjimas, veisimasis), dirvožemio charakteristikos (pH, bendros organinės anglies kiekis, granuliometrinė sudėtis (procentinė smėlio, nuosėdų ir molio dalis), vandens sulaikymo geba ($WHC_{didž.}$) procentinė vandens dalis bandymo pradžioje ir pabaigoje ir bet kokie kiti atlikti matavimai,

— išsami informacija apie dirvožemio ir sliekų ėminių apdorojimą, įskaitant duomenis apie ruošimo, sandėliavimo, bandomosios medžiagos įterpimo procedūras, bandomojo objekto sliekuose ir dirvožemyje ekstrakcijos bei analizės procedūras (ir glaudumą) ir lipidų kiekį (jeigu matuojamas) bei bandomojo objekto regeneravimą.

Rezultatai:

— sliekų iš kontrolinių indų ir sliekų iš kiekvieno bandymo indo gaištamumas bei bet koks pastebėtas neprastas elgesys (pvz., vengimas įsirausti į dirvą, dauginimosi nebuvimas su enchitrėjais atliekant biologinio kaupimosi bandymą),

— dirvožemio ir bandomųjų organizmų sausosios masės santykis su šlapiąja mase (naudingas atliekant normalizavimą),

— šlapioji kirmėlių masė kiekvieną kartą imant ėminius; šlapioji sliekų masė bandymo pradžioje ir kiekvieną kartą imant ėminius prieš virškinamojo trakto turinio pašalinimą ir jį pašalinus,

— bandomųjų organizmų lipidų kiekis (jeigu nustatomas),

— bandomosios cheminės medžiagos sugerties kirmėlėse ir jos šalinimo iš kirmėlių kinetiką ir trukmę iki nuostoviosios būsenos apibūdinančios kreivės,

— visų ėminių ėmimo laiko C_a ir C_s (su standartiniu nuokrypiu ir intervalu, jeigu reikia) (C_a išreiškiama viso kūno sausosios ir šlapiosios masės kg^{-1}, C_s išreiškiama dirvožemio sausosios ir šlapiosios masės kg^{-1}). Jeigu būtinas nuosėdų akumuliacijos faktorius (BSAF) (pvz., siekiant lyginti su skirtingo lipidų kiekio gyvūnais atliktų dviejų ar daugiau bandymų rezultatus), C_a taip pat galima išreikšti organizmo lipidų kiekiu (g kg^{-1}) ir Cs galima išreikšti kaip dirvožemio organinės anglies kiekį (g kg-1),

— BAF (išreikštas kaip dirvožemio kg kirmėlių $^{-1}$ kg), dirvožemiui poveikio greičio konstanta k_s (išreikšta g dirvožemio kg^{-1} kirmėlių $dienų^{-1}$) ir šalinimo greičio konstanta (išreikšta $diena^{-1}$); BSAF (išreikštą kg dirvožemio OC kg^{-1} kirmėlių lipidų kiekio) galima pateikti papildomai,

▼M4

— jeigu buvo išmatuota: procentinė dalis dirvožemyje ir bandomuosiuose gyvūnuose aptiktos pradinės cheminės medžiagos, metabolitų ir susijusių liekanų (t. y. bandomosios cheminės medžiagos, kurios neįmanoma ekstrahuoti naudojant įprastus ekstrahavimo metodus, procentinė dalis),

— naudoti duomenų statistinės analizės metodai.

Rezultatų įvertinimas:

— rezultatų atitiktis 17 pastraipoje išvardytiems validumo kriterijams,

— netikėti ar neįprasti rezultatai, pvz., nevisiškas bandomosios cheminės medžiagos pašalinimas iš bandomųjų gyvūnų.

LITERATŪRA

1. Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

2. ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688–00a.

3. ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676–04: 26 pp.

4. Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation - New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235–276.

5. Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93–99.

6. Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W & Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. SAFEty 25: 154–165.

7. Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. SAFEty 31: 185–191.

8. Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1–13.

9. Bligh EG and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911–917.

10. Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 p.

11. Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

12. Bruns E, Egeler Ph, Römbke J Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185–196.

13. Conder JM and Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. J. Soils Sediments 3: 13–20.

▼M4

14. Connell DW and Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91–100.

15. Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2–29.

16. Didden W (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, pp. 555–576.

17. De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, ES, Standards, Measurement and Testing Programme.

18. Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140–145.

19. 2006 m. gruodžio 18 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH), įsteigiantis Europos cheminių medžiagų agentūrą, iš dalies keičiantis Direktyvą 1999/45/EB bei panaikinantis Tarybos reglamentą (EEB) Nr. 793/93, Komisijos reglamentą (EB) Nr. 1488/94, Tarybos direktyvą 76/769/EEB ir Komisijos direktyvas 91/155/EEB, 93/67/EEB, 93/105/EB bei 2000/21/EB, OL L 396, 2006 12 30, p. 1.

20. Edwards CA and Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.

21. OECD (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

22. Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Galima parsisiųsti šiuo adresu: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

23. Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). SAFEty factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.

24. Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

25. EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195–208.

26. Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897–1905.

27. Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501–1514.

28. Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼M4

29. Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78–84.

30. Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225–1231.

31. Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099–1105.

32. Hawker DW and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701–707.

33. Hund-Rinke K and Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15–20.

34. Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59–81.

35. ISO 11268–2 (1998) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.

36. Jaenike J (1982). „*Eisenia foetida*“ is two biological species. Megadrilogica 4: 6–8.

37. Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080–2090.

38. Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953–961.

39. Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767–775.

40. Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399–3404.

41. Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305–312.

42. Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217–232.

43. Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.

44. Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Toxicol. 23: 588–595.

45. Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. SAFEty 36: 17–26.

46. Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates*. Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244–1249.

▼M4

47. Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

48. Šio priedo C.8 skyrius. Toksiškumas sliekams.

49. Šio priedo C.13 skyrius. Biologinis kaupimasis: bandymas su žuvimis pratekėjimo sąlygomis.

50. Šio priedo C.21 skyrius. Dirvožemio mikroorganizmai: azoto transformacijos bandymas.

51. OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

52. Oecd (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

53. OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

54. Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287–388.

55. Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378–396.

56. Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77–81.

57. Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida.* RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

58. Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.-Toxicol. Chem. 10: 1431–1436.

59. Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

60. Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 pp.

61. Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105–129.

62. Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W,Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. SAFEty 27: 107–127.

63. Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110–2120.

64. Schlosser H-J and Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413–433.

65. Schmelz R and Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93–100.

▼M4

66. Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

67. Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557–2563.

68. Spacie A and Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309–320.

69. Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67–81.

70. Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167–1171.

71. UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

72. US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

73. Van Brummelen TC and Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277–285.

74. Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).

75. Van Gestel CA and Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023–1033.

76. Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409–417.

77. Venter JM and Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161–165.

78. Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843–1851.

79. Widianarko B and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402–406.

▼M4

1 priedėlis

SĄVOKŲ APIBRĖŽTYS

Biologinis kaupimasis – bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos padidėjimas organizme ar jo paviršiuje, palyginti su bandomosios cheminės medžiagos koncentracija aplinkinėje terpėje. Biologinį kaupimąsi sukelia biologinės koncentracijos ir su užterštu maistu ar grobiu susijęs bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos organizme didėjimo procesai (žr. toliau).

Biologinio kaupimosi koncentracijos didėjimas – su cheminės medžiagos pasisavinimu visų pirmiausiai iš aplinkinės terpės (t. y. per kūno paviršių ir prarytą dirvožemį) susijęs bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos padidėjimas organizme ar jo paviršiuje, palyginti su bandomosios cheminės koncentracija aplinkinėje terpėje.

Su užterštu maistu ar grobiu susijęs bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos organizme didėjimas – su pasisavinimu iš užteršto maisto ar grobio susijęs bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos padidėjimas organizme ar jo paviršiuje, palyginti su bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos maiste ar grobyje. Dėl su užterštu maistu ar grobiu susijusio bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos organizme didėjimo bandomasis objektas gali būti perduodamas į maisto grandines ar jose kauptis.

Bandomosios cheminės medžiagos **šalinimas** – šios cheminės medžiagos išskyrimas iš bandomojo organizmo audinio veikliaisiais ar pasyviaisiais procesais, kurie vyksta neatsižvelgiant į bandomojo objekto buvimą ar jo nebuvimą aplinkinėje terpėje

Biologinio kaupimosi kriterijus (BAF) bet kuriuo sugerties tarpsnio metu atliekant šį biologinio kaupimosi bandymą – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija bandomajame organizme ar jo paviršiuje ((C_a g·kg^{-1} kirmėlių sausosios masės), padalinta iš cheminės medžiagos koncentracijos aplinkinėje terpėje (C_s kaip g·kg^{-1} dirvožemio sausosios masės); BAF vienetas yra dirvožemio kg kirmėlių kg^{-1}).

Nuostoviosios būsenos biologinio kaupimosi kriterijus (BAF_{ss}) yra nuostovosios būsenos BAF ir ilgą laiką bent kiek labiau nesikeičia, bandomosios cheminės medžiagos koncentracija aplinkinėje terpėje (C_s kaip g kg^{-1} dirvožemio sausosios masės) yra pastovus šiuo laikotarpiu.

Biologinio kaupimosi kriterijai, apskaičiuoti tiesiogiai naudojantis pasisavinimo iš dirvožemio greičio konstantos ir šalinimo greičio konstantos (k_s ir k_e, žr. toliau) santykiu, vadinami kinetiniu biologinio kaupimosi kriterijumi (BAF_K).

Biotos-nuosėdų akumuliacijos kriterijus (BSAF) – pagal į lipidų kiekį normalizuota bandomosios cheminės medžiagos koncentracija bandomajame organizme ar jo paviršiuje, padalyta iš pagal organinę anglį normalizuotos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos dirvožemyje esant nuostoviajai būsenai. Tada C_a yra išreikšta kaip g kg^{-1} organizmo lipidų kiekio ir C_s išreikšta kaip g kg^{-1} dirvožemio organinės anglies kiekio; BSAF matuojamas kg OC kg^{-1} lipidų vienetais.

Nuostovioji būsena yra apibrėžiama kaip sugerties ir šalinimo procesų pusiausvyra, nusistovinti vienu metu per sugerties tarpsnį. Nuostovioji būsena užtikrinama brėžiant BAF kreivę atsižvelgiant į laiką, kai kreivė būna lygiagreti laiko ašiai ir kai trijų viena pa kitos atliktų ėminių, kurie paimti ne trumpesniais negu dviejų dienų intervalais, BAF analizių rezultatai vieni nuo kitų skiriasi ne daugiau negu 20 % ir trims ėminių ėmimo laikotarpiams nebūdingi statistiškai reikšmingi skirtumai. Jeigu naudojamos lėčiau pasisavinamos bandomosios cheminės medžiagos, tinkamesnis būtų septynių dienų intervalas (49).

Organinės anglies ir vandens pasiskirstymo koeficientas (K_{oc}) – cheminės medžiagos koncentracijos dirvožemio organinės anglies dalyje ar prie jos santykis su cheminės medžiagos koncentracija vandenyje esant pusiausvyrai.

Oktanolio ir vandens pasiskirstymo koeficientas (K_{ow}) – n-oktanolio cheminis tirpumas vandenyje esant pusiausvyrai, taip pat kartais išreiškiamas kaip P_{ow}. K_{ow} (log K_{ow}) logaritmas naudojamas apibūdinant vandens organizmų biologinio kaupimo cheminį potencialą.

▼M4

Pasisavinimo arba sugerties tarpsnis yra laikotarpis, per kurį bandomuosius organizmus veikia bandomoji cheminė medžiaga.

Pasisavinimo iš dirvožemio greičio konstanta (k_2) – skaitinė vertė, kuria apibrėžiamas bandomojo objekto koncentracijos didėjimas bandomajame organizme arba jo paviršiuje, kai šį didėjimą sukelia pasisavinimo iš dirvožemio tarpsnis. k_s išreiškiamas kaip g dirvožemio kg^{-1} kirmėlių d^{-1}.

Šalinimo tarpsnis – laikotarpis po bandomųjų organizmų iš užterštos terpės perkėlimo į terpę be bandomojo objekto; šiuo laikotarpiu tiriamas cheminės medžiagos šalinimas (ar grynasis jos kiekio mažėjimas) iš bandomųjų organizmų.

Šalinimo greičio konstanta (k_e) – skaitinė vertė, kuria apibrėžiamas bandomojo objekto koncentracijos bandomajame organizme ar jo paviršiuje mažėjimo greitis po to, kai bandomieji organizmai iš terpės su bandomuoju objektu perkeliami į terpę be šios cheminės medžiagos; k_e išreiškiamas d^{-1}.

Bandomoji cheminė medžiaga – bet kokia naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga ar mišinys.

▼M4

2 priedėlis

Pasisavinimo ir šalinimo parametrų skaičiavimas

Svarbiausias biologinio kaupimosi bandymo rezultatas yra biologinio kaupimosi kriterijus BAF. Išmatuotą BAF galima apskaičiuoti koncentraciją bandomajame organizme C_a dalinant iš koncentracijos dirvožemyje C_s esant nuostoviajai būsenai. Jeigu nuostovioji būsena per sugerties tarpsnį nėra užtikrinama, BAF_K apskaičiuojamas pagal greičio konstantas, o ne pagal BAF_{ss}. Tačiau pabrėžtina, ar BAF grindžiamas nuostoviosios būsenos koncentracijomis ar negrindžiamas.

Kinetinis biologinio kaupimosi kriterijus (BAF_K), pasisavinimo iš dirvožemio greičio konstanta (k_s) ir šalinimo greičio konstanta (k_e) gaunama įprastu būdu, t. y. naudojant kompiuterinius netiesinio parametro apskaičiavimo metodus, pvz., taikant (68) aprašytus modelius. Jeigu duota koncentracijos kitimo laike duomenų aibė ir lygčių modelis

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^t) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[1 lygtis]}$$

arba

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^t) \qquad t > t_c \qquad \text{[2 lygtis]}$$

kur:

C_a = cheminės medžiagos koncentracija kirmėlėse [g kg-1 šlapiosios arba sausosios masės]

k_s = sugerties greičio konstanta audinyje [g dirvožemio kg-1 kirmėlių d-1]

C_a = cheminės medžiagos koncentracija dirvožemyje [g kg-1 šlapiosios arba sausosios masės]

k_e = šalinimo greičio konstanta [d-1]

t_c = laikotarpis sugerties tarpsnio pabaigoje,

taikant šias kompiuterių programas apskaičiuojamos BAF_K, k_s ir k_e vertės.

Jeigu nepaveiktų kirmėlių, pvz., nulinę dieną, fono koncentracija gerokai skiriasi nuo nulinės vertės (ši situacija gali susiklostyti, pvz., metalų atžvilgiu, ši fono koncentracija ($C_{a,0}$) turėtų būti įtraukta į šias lygtis, kurios įgauna šią formą:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^t) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[3 lygtis]}$$

ir

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^t) \qquad t > t_c \qquad \text{[4 lygtis]}$$

Tais atvejais, jeigu sugerties tarpsniu nustatomas didelis bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos sumažėjimas dirvožemyje, galima rinktis šiuos modelius, pvz., (67) (79):

$$C_s = C_0(e^{-k_0 t}) \qquad \text{[5 lygtis]}$$

▼M4

kur:

C_s = cheminės medžiagos koncentracija dirvožemyje [g kg-1 šlapiosios arba sausosios masės]

k_0 = skilimo greičio dirvožemyje konstanta [d-1]

C_0 = pradinė cheminės medžiagos koncentracija dirvožemyje [g kg-1 šlapiosios arba sausosios masės]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[6 lygtis]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[7 lygtis]}$$

kur:

C_a = cheminės medžiagos koncentracija kirmėlėse [g kg-1 šlapiosios arba sausosios masės]

k_s = sugerties greičio konstanta audinyje [g dirvožemio kg-1 kirmėlių d-1]

k_0 = skilimo greičio dirvožemyje konstanta [d-1]

k_e = šalinimo greičio konstanta [d-1]

t_c = laikotarpis sugerties tarpsnio pabaigoje.

Jeigu nuostovioji būsena užtikrinama per sugerties tarpsnį (t. y. $t = \infty$), 1 lygtį

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[1 lygtis]}$$

galima suprastinti iki:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

arba

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[8 lygtis]}$$

Tada k_s/k_e x C_s yra arti bandomojo objekto koncentracijos kirmėlės audinyje nuostoviosios būsenos sąlygomis ($C_{a,ss}$).

Biotos-nuosėdų akumuliacijos kriterijų (BSAF) galima apskaičiuoti taip:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[9 lygtis]}$$

kur f_{oc} yra dirvožemio organinės anglies dalis ir f_{lip} yra kirmėlės lipidų dalis; abi vertės visų pirmiausiai nustatomos pagal iš bandymo paimtus ėminius bei remiantis atitinkamai sausąja arba šlapiąja mase.

Šalinimo kinetiką galima modeliuoti naudojantis šalinimo tarpsnio duomenimis ir taikant toliau nurodytą pavyzdinę lygtį ir kompiuterinį ne linijinio parametro apskaičiavimo metodą. Jeigu duomenų taškai brėžiami kaip laiko funkcija ir gaunama bandomojo objekto koncentracijos gyvūnuose tolygi ir proporcinga mažėjimo linija, galima naudoti vieno skyriaus modelį (9 lygtis) siekiant aprašyti šalinimo trukmę.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[10 lygtis]}$$

▼M4

Šalinimo procesai kartais būna dviejų tarpsnių ir patvirtina greitą C_a vertės mažėjimą pirmuosiuose tarpsniuose; tada bandomųjų objektų netekimas lėtėja vėlesniais šalinimo tarpsniais, pvz., (27) (68). Du tarpsnius galima paaiškinti darant prielaidą, kad organizme yra du skirtingi skyriai, iš kurių bandomasis objektas šalinamas skirtingu greičiu. Šiais atvejais turėtų būti studijuojama speciali literatūra, pvz., (38) (39) (40) (78).

Naudojant pirmiau nurodytas pavyzdines lygtis taip pat galima apskaičiuoti kinetinius parametrus (k_s ir k_e) ir šiuo tikslu visiems sugerties tarpsnio ir šalinimo tarpsnio duomenims tuo pačiu metu taikant pirmojo laipsnio kinetikos modelį. Nuorodos į metodo, kurį taikant šiuo jungtiniu būdu galima apskaičiuoti sugerties greičio ir šalinimo greičio konstantas, aprašymą pateiktos 41), 73) ir 70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{[11 lygtis]}$$

Pastaba: Kai sugerties ir šalinimo parametrai vienu metu apskaičiuojami remiantis jungtiniais sugerties ir šalinimo duomenimis, 11 lygtyje pateiktasis „m“ yra deskriptorius, kurį naudojant kompiuterio programa atitinkamo tarpsnio duomenų rinkiniams įmanoma priskirti papildomus lygties dėmenis ir teisingai atlikti įvertinimą ((m = 1 naudojamas sugerties tarpsniui; m = 2 naudojamas šalinimo tarpsniui).

Vis dėlto šias pavyzdines lygtis reikėtų naudoti apdairiai, ypač tuo atveju, kai atliekant bandymą kinta bandomosios cheminės medžiagos biologinis įsisavinamumas ar (biologinis) skaidymas (žr. pvz., 79)).

▼M4

3 priedėlis

DIRVOŽEMIO BIOLOGINIO KAUPIMOSI BANDYMŲ TVARKARAŠČIO PAVYZDŽIAI

Bandymas su sliekais

a) Sugerties tarpsnis su 8 ėminių ėmimo datomis, naudojamomis apskaičiuojant kinetiką

Diena	Veikla
– 6	Pasiruošto dirvožemio kondicionavimas 48 val.;
– 4	Bandomosios cheminės medžiagos įtepimas į dirvožemio dalį; bet kokio tirpiklio garinimas; dirvožemio sudedamųjų dalių maišymas; dirvožemio paskirstymas bandymo indams; pusiausvyros užtikrinimas bandymo sąlygomis 4 dienas (3 savaitės, jeigu į dirvožemį įterpiamas metalas);
nuo – 3 iki – 1	Bandomųjų organizmų išėmimas iš auginimo kultūros siekiant juos aklimatizuoti; dirvožemio sudedamųjų dalių pasiruošimas ir drėkinimas;
0	Dirvožemio temperatūros ir pH matavimas; dirvožemio ėminių pašalinimas iš paveiktų indų ir tirpiklio kontrolinių ėminių, kad būtų nustatyta bandomosios cheminės medžiagos koncentracija; maisto normos dėjimas; kirmėlių svėrimas ir atsitiktinis paskirstymas po bandymo indus; pakankamų kirmėlių ėminių dalies išlaikymas siekiant nustatyti analizines fono vertes, šlapiąją ir sausąją masę ir lipidų kiekį; visų bandymo indų svėrimas siekiant kontroliuoti dirvožemio drėgmės kiekį; oro tiekimo kontrolė, jeigu naudojama uždaroji bandymo sistema;
1	Oro tiekimo kontrolė, kirmėlių elgsenos ir temperatūros registravimas dirvožemio ir kirmėlių ėminių ėmimas siekiant nustatyti bandomojo objekto koncentraciją;
2	Tas pats kaip 1 dieną;
3	Oro tiekimo, kirmėlių elgsenos ir temperatūros kontrolė;
4	Tas pats kaip 1 dieną;
5–6	Tas pats kaip 3 dieną;
7	Tas pats kaip 1 dieną; maisto normos davimas dirvožemio drėgmės kontrolė iš naujo pasveriant bandymo indus ir kompensuojant išgaravusį vandenį;
8–9	Tas pats kaip 3 dieną;
10	Tas pats kaip 1 dieną;
11–13	Tas pats kaip 3 dieną;
14	Tas pats kaip 1 dieną; maisto normos davimas dirvožemio drėgmės kontrolė iš naujo pasveriant bandymo indus ir kompensuojant išgaravusį vandenį;
15–16	Tas pats kaip 3 dieną;
17	Tas pats kaip 1 dieną;
18–20	Tas pats kaip 3 dieną;

▼M4

Diena	Veikla
21	Tas pats kaip 1 dieną; dirvožemio temperatūros ir pH matavimas; dirvožemio drėgnumo kontrolė iš naujo pasveriant bandymo indus; sugerties tarpsnio pabaiga; kirmėlių perkėlimas iš likusių paveiktų tapačių indų į indus su švariu dirvožemiu šalinimo tarpsniui (virškinamojo trakto turinys nėra šalinamas); dirvožemio ir kirmėlių ėminių ėmimas iš tirpiklio kontrolinių ėminių.
	Veiklos iki poveikio (pusiausvyros nustatymo tarpsnis) turėtų būti planuojamos atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos savybes.
	3 dienoms numatyta veikla turėtų būti vykdoma kasdien (bent darbo dienomis).

b) Šalinimo tarpsnis

Diena	Veikla
– 6	Dirvožemio sudedamųjų dalių pasiruošimas ir drėkinimas; pasiruošto dirvožemio kondicionavimas 48 val.;
– 4	Dirvožemio sudedamųjų dalių maišymas; dirvožemio paskirstymas po bandymo indus; inkubacija bandymo sąlygomis 4 dienas;
0 (sugerties tarpsnio pabaiga)	Dirvožemio temperatūros ir pH matavimas; svėrimas ir atsitiktinis kirmėlių paskirstymas po bandymo indus; maisto normos įdėjimas; kirmėlių iš likusių paveiktų tapačių indų perkėlimas į indus su švariu dirvožemiu; dirvožemio ir kirmėlių ėminių ėmimas po 4–6 val. siekiant nustatyti bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją;
1	Oro tiekimo kontrolė, kirmėlių elgsenos ir temperatūros registravimas; dirvožemio ir kirmėlių ėminių ėmimas siekiant nustatyti bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją;
2	Tas pats kaip 1 dieną;
3	Oro tiekimo, kirmėlių elgsenos ir temperatūros kontrolė;
4	Tas pats kaip 1 dieną;
5–6	Tas pats kaip 3 dieną;
7	Tas pats kaip 1 dieną; maisto normos davimas dirvožemio drėgmės kontrolė iš naujo pasveriant bandymo indus ir kompensuojant išgaravusį vandenį;
8–9	Tas pats kaip 3 dieną;
10	Tas pats kaip 1 dieną;
11–13	Tas pats kaip 3 dieną;
14	Tas pats kaip 1 dieną; maisto normos davimas dirvožemio drėgmės kontrolė iš naujo pasveriant bandymo indus ir kompensuojant išgaravusį vandenį;
15–16	Tas pats kaip 3 dieną;
17	Tas pats kaip 1 dieną;

▼M4

Diena	Veikla
18–20	Tas pats kaip 3 dieną;
21	Tas pats kaip 1 dieną; dirvožemio temperatūros ir pH matavimas; dirvožemio drėgnumo kontrolė iš naujo pasveriant bandymo indus; dirvožemio ir kirmėlių ėminių ėmimas iš tirpiklio kontrolinių ėminių.
	Dirvožemis prieš šalinimo tarpsnį turėtų būti pasiruošiamas taip pat kaip prieš sugerties tarpsnį.
	3 dienoms numatyta veikla turėtų būti vykdoma kasdien (bent darbo dienomis).

Bandymas su enchitrėjais

a) Sugerties tarpsnis su 8 ėminių ėmimo datomis, naudojamomis apskaičiuojant kinetiką

Diena	Veikla
– 6	Pasiruošto dirvožemio kondicionavimas 48 val.;
– 4	Bandomosios cheminės medžiagos įtepimas į dirvožemio dalį; bet kokio tirpiklio garinimas; dirvožemio sudedamųjų dalių maišymas; dirvožemio paskirstymas bandymo indams; pusiausvyros užtikrinimas bandymo sąlygomis 4 dienas (3 savaitės, jeigu į dirvožemį įterpiamas metalas);
nuo – 3 iki – 1	Bandomųjų organizmų išėmimas iš auginimo kultūros siekiant juos aklimatizuoti; dirvožemio sudedamųjų dalių pasiruošimas ir drėkinimas;
0	Dirvožemio temperatūros ir pH matavimas; dirvožemio ėminių pašalinimas iš paveiktų indų ir tirpiklio kontrolinių ėminių, kad būtų nustatyta bandomosios cheminės medžiagos koncentracija; maisto normos dėjimas į dirvožemį; kirmėlių svėrimas ir atsitiktinis paskirstymas po bandymo indus; pakankamų kirmėlių ėminių dalies išlaikymas siekiant nustatyti analizines fono vertes, šlapiąją ir sausąją masę ir lipidų kiekį; visų bandymo indų svėrimas siekiant kontroliuoti dirvožemio drėgmės kiekį; oro tiekimo kontrolė, jeigu naudojama uždaroji bandymo sistema;
1	Oro tiekimo kontrolė, kirmėlių elgsenos ir temperatūros registravimas; dirvožemio ir kirmėlių ėminių ėmimas siekiant nustatyti bandomojo objekto koncentraciją;
2	Tas pats kaip 1 dieną;
3	Oro tiekimo, kirmėlių elgsenos ir temperatūros kontrolė;
4	Tas pats kaip 1 dieną;
5–6	Tas pats kaip 3 dieną;
7	Tas pats kaip 1 dieną; maisto normos davimas į dirvožemį; dirvožemio drėgmės kontrolė iš naujo pasveriant bandymo indus ir kompensuojant išgaravusį vandenį;
9	Tas pats kaip 1 dieną;
10	Tas pats kaip 3 dieną;

▼**M4**

Diena	Veikla
11	Tas pats kaip 1 dieną;
12–13	Tas pats kaip 3 dieną;
14	Tas pats kaip 1 dieną; maisto normos dėjimas į dirvožemį; dirvožemio temperatūros ir pH matavimas; dirvožemio drėgnumo kontrolė iš naujo pasveriant bandymo indus; sugerties tarpsnio pabaiga; kirmėlių perkėlimas iš likusių paveiktų tapačių indų į indus su švariu dirvožemiu šalinimo tarpsniui (virškinamojo trakto turinys nėra šalinamas); dirvožemio ir kirmėlių ėminių ėmimas iš tirpiklio kontrolinių ėminių.
	Veiklos iki poveikio (pusiausvyros nustatymo tarpsnis) turėtų būti planuojamos atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos savybes.
	3 dienoms numatyta veikla turėtų būti vykdoma kasdien (bent darbo dienomis).

▼M4

4 priedėlis

Dirbtinis dirvožemis. Ruošimo ir sandėliavimo rekomendacijos

Natūralūs dirvožemiai apskritus metus iš konkretaus šaltinio gali būti neprieinami ir vietiniai organizmai bei esami mikroteršalai gali daryti įtaką bandymui, todėl atliekant šį bandymą rekomenduojama naudoti šio priedo C.8 skyriuje Toksiškumas sliekams (48) nurodytą dirbtinį substratą, dirbtinį dirvožemį. Kelių rūšių bandomieji gyvūnai gali išgyventi, augti ir daugintis šiame dirvožemyje ir todėl užtikrinamas didžiausias bandymų ir kultūros auginimo sąlygų standartizavimas bei bandymo palyginamumas laboratorijoje ir tarplaboratorinis bandymo palyginamumas.

Sudedamosios dirvožemio dalys:

Durpės:	10 %	Kiminų durpės pagal OECD gaires 207 (48);
Kvarcinis smėlis:	70 %	Pramoninis kvarcinis smėlis (džiovintas ore); grūdelių dydis: daugiau negu 50 % kietųjų dalelių turėtų būti 50–200 μm, tačiau visos dalelės turėtų būti ≤ 2 mm;
Kaolinito molis:	20 %	Kaolinito kiekis ≥ 30 %;
Kalcio karbonatas:	≤ 1 %	$CaCO_3$, milteliai, cheminių atžvilgiu gryni.

Dirbtinio dirvožemio organinės anglies kiekį leidžiama sumažinti, pvz., durpių kiekį mažinant iki 4–5 % sauso dirvožemio kiekio ir atitinkamai didinant smėlio kiekį. Taip sumažinus organinės anglies kiekį galima apriboti dirvožemio (organinės anglies) gebą sugerti bandomąją cheminę medžiagą ir todėl galėtų padidėti bandomosios cheminės medžiagos prieinamumas kirmėlėms. Įrodyta, kad *Enchytraeus albidus* ir *Eisenia fetida* gali atitikti dauginimuisi taikomus validumo kriterijus, jeigu bandant naudojami lauko dirvožemiai su mažesniu organinės anglies kiekiu, pvz., 2,7 % (33), 61), ir yra patvirtinta patirtimi, kad šį dalyką taip pat galima užtikrinti naudojant dirbtinį dirvožemį su 5 % durpių.

Paruošimas

Dirvožemio sausosios sudedamosios dalys kruopščiai išmaišomos (pvz., dideliame laboratorijos maišytuve). Jos sumaišomos maždaug prieš savaitę iki bandymo pradžios. Sumaišytos sausosios dirvožemio sudedamosios dalys turėtų būti drėkinamos dejonizuotu vandeniu bent prieš 48 val. iki bandomojo objekto įterpimo siekiant užtikrinti rūgštingumo pusiausvyrą ir (arba) jį stabilizuoti. Nustatant pH vertę naudojamas dirvožemio ir 1 M KCl tirpalas (santykis 1:5). Jeigu pH vertė neatitinka privalomojo intervalo (6,0 ± 0,5), į dirvožemį įterpiamas pakankamas kiekis $CaCO_3$ arba pasiruošiama nauja dirvožemio partija.

Dirbtinio dirvožemio didžiausia vandens sulaikymo geba (WHC) nustatoma pagal standartą ISO 11268-2 (35). Bent dvi dienos iki bandymo pradžios sausas dirbtinis dirvožemis yra drėkinamas įpilant reikiamą kiekį dejonizuoto ar regeneruoto vandens siekiant užtikrinti maždaug pusę galutinio vandens kiekio. Galutinis vandens kiekis turėtų būti 40 %–60 % didžiausios vandens sulaikymo gebos. Iš anksto sudrėkintas dirvožemis bandymo pradžioje išskirstomas į tiek dalių, kiek atliekant bandymą numatoma naudoti bandomųjų koncentracijų ir kontrolinių bandinių, bei naudojant bandomojo objekto tirpalą ir (arba) įpilant dejonizuoto arba regeneruoto vandens užtikrinama, kad drėgmės kiekio vertė būtų 40–60 % didžiausios vandens sulaikymo gebos. Drėgmės kiekis nustatomas bandymo pradžioje ir pabaigoje (105 °C temperatūroje). Drėgmės kiekis turėtų kuo geriausiai atitikti tam tikros rūšies gyvūnų reikalavimus (drėgmės kiekį taip pat galima tikrinti taip: dirvožemį nestipriai suspaudus delne, tarp pirštų turi atsirasti vandens lašeliais).

▼M4

Sandėliavimas

Drėgnosios dirbtinio dirvožemio sudedamosios dalys iki naudojimo pradžios turi būti laikomos kambario temperatūros sąlygomis. Pasiruoštą, iš anksto sudrėkintą dirvožemį galima lakyti vėsioje vietoje ne ilgiau negu tris dienas iki tiriamojo objekto įterpimo į dirvožemį; būtina pasirūpinti, kad išgaruotų kuo mažesnis vandens kiekis. Dirvožemis su įterptu bandomuoju objektu turėtų būti naudojamas nedelsiant, jeigu neturima informacijos, iš kurios būtų matyti, kad tam tikrą dirvožemį leidžiama laikyti nepadarant jokio poveikio bandomojo subjekto toksiškumui ir biologiniam įsisavinamumui. Po to dirvožemio su įterptu bandomuoju objektu ėminius galima sandėliuoti tam tikram bandomajam objektui rekomenduojamomis sąlygomis, kol bus atliekama analizė.

▼M4

5 priedėlis

Atliekant biologinio kaupimosi iš dirvožemio bandymus rekomenduojamos naudoti dugno mažašerių kirmėlių rūšys

Sliekai

Rekomenduojama bandomoji rūšis yra *Eisenia fetida* (Savigny 1826), priklausanti *Lumbricidae* šeimai. Nuo 1972 m. ji skiriama į du porūšius (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei* (10)). Pagal Jaenike (36) jos yra iš tikrųjų atskiros rūšys. *Eisenia fetida* yra lengvai atpažįstami pagal šviečias segmentus jungiančias juosteles, o *Eisenia Andrei* yra vienalyčiai, tamsiai raudonos spalvos. Jie, ko gero, yra kilę iš Juodosios jūros regiono ir šiandien išplitę po visą pasaulį, ypač žmogaus modifikuotose buveinėse, pvz., komposto krūvose. Abiejų rūšių sliekus galima naudoti atliekant ekotoksikologinius ir biologinio kaupimosi bandymus.

Eisenia fetida ir *Eisenia andrei* galima įsigyti rinkoje, pvz., kaip masalą žuvims. Palyginti su kitų rūšių sliekais, minėtieji gyvena trumpiau, subręsta maždaug per 2–3 mėnesius (kambario temperatūros sąlygomis). Jiems tinkamiausia temperatūra yra maždaug 20–24 °C. Jie mėgsta palyginti drėgnus substratus, kurių pH yra beveik neutralus ir kurių didelę dalį sudaro organinės medžiagos. Šių rūšių gyvūnai jau maždaug 25 metus plačiai naudojami atliekant standartinius ekotoksikologijos bandymus, todėl jų auginimas yra gerai reglamentuotas (48) (77).

Abiejų rūšių gyvūnus galima auginti įvairių tipų gyvūninėse atliekose. Standarte ISO (35) rekomenduojama iš arklių ar galvijų mėšlo ir durpių (50:50) paruošta auginimo terpė. Terpės pH vertė turėtų būti maždaug 6–7 (koreguojama naudojant kalcio karbonatą), mažas joninis laidumas (mažesnis negu 6 mS/cm arba mažesnis negu 0,5 % druskos koncentracijos) ir neturėtų būti pernelyg užteršta amoniaku arba gyvūnų šlapimu. Taip pat leidžiama naudoti rinkai pateikiamą sodininkystės dirvožemį be priedų arba dirbtinį dirvožemį pagal OECD (48) ar jų abiejų mišinį santykiu 50:50. Substratas turėtų būti drėgnas, tačiau ne pernelyg. Galima naudoti 10–50 litrų auginimo dėžes.

Siekiant gauti standartinio amžiaus ir masės sliekus geriausia juos išsiauginti iš kokonų. Todėl suaugę sliekai sudedami į auginimo dėžę su šviežiu substratu kokonams auginti. Remiantis sukaupta patirtimi galima tvirtinti, kad neblogas auginimo greitis užtikrinamas tuo atveju, kai maždaug 100 suaugusių sliekų laikomi 1 kg substrato (šlapioji masė) Po 28 dienų suaugę sliekai yra pašalinami. Iš kokonų išsiritę sliekai bandymams naudojami subrendę, t. y. ne anksčiau negu po 2 mėnesių, tačiau ne vėliau negu po 12 mėnesių.

Minėtų rūšių sliekus galima laikyti sveikais, jeigu jie rausiasi substrate, nemėgina iš jo išsirangyti ir be perstojo dauginasi. Jeigu sliekai šliaužia labai lėtai arba jiems susiformuoja geltonos spalvos užpakalinis galas (turima omenyje (*Eisenia fetida*), šiuo atveju galima manyti, kad substrato yra per daug. Šiuo atveju rekomenduojama naudoti šviežią substratą ir (arba) dėžėje sumažinti individų skaičių.

Papildomos parinktos nuorodos

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1–58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1–81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49–55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180–201.

▼M4

Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London, 31: 1–171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331–338 pp.

Enchitrėjai

Rekomenduojamoji rūšis yra *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (baltieji sliekai). *Enchytraeus albidus* yra viena iš didžiausių (ne didesnės negu 15 mm) *Enchytraeidae* šeimos mažašerės kirmėlės ir jos išplitusios visame pasaulyje, pvz., (8). *Enchytraeus albidus* gyvena jūrose, ežeruose ir sausumoje esančiose buveinėse; jos daugiausiai veisiasi pūvančiose organinėse medžiagose (jūros dumbliuose, komposte) ir retai jų pasitaiko pievose (42). Šios kirmėlės veisiasi skirtingoje ekologinėje aplinkoje ir pagal tam tikrus šių kirmėlių sandaros skirtumas galima daryti išvadą, kad gali būti skirtingų šios rūšies porūšių.

Enchytraeus albidus tiekiamos rinkai ir parduodamos kaip žuvų pašaras. Privaloma patikrinti, ar kultūra nėra užteršta kitomis, paprastai mažesnių rūšių gyvūnais (60). Jeigu nustatoma tarša, visos kirmėlės turėtų būti nuplaunamos vandeniu Petrio lėkštelėje. Tada naudojant stereomikroskopą išrankiojami suaugę *Enchytraeus albidus* individai, kurie būtų naudojami pradedant naują auginimą. Visos kitos kirmėlės pašalinamos. Jų gyvenimo ciklas yra trumpas, nes šios kirmėlės subręsta per 33 dienas (18 °C temperatūroje) ir per 74 dienas (12 °C temperatūroje). Atliekant bandymą turėtų būti naudojamos tik tos kultūros, kurios laboratorijoje buvo laikytos ne trumpiau negu 5 savaites (viena karta) ir dėl kurių nekilo jokių sunkumų.

Kitos *Enchytraeus* rūšys taip pat yra tinkamos, visų pirma *Enchytraeus luxuriosus*. Šios rūšies gyvūnai dažniausiai gyvena dirvožemyje (jų naujas aprašymas pateiktas (65)). Jeigu naudojamos kitos *Enchytraeus* rūšys, jos turėtų būti aiškiai identifikuojamos ir nurodomos šios rūšies pasirinkimo priežastys.

Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe 1992) yra rūšis, priklausanti tai pačiai grupei kaip *Enchytraeus luxuriosus*. Patikimai nenustatyta, kad ji būtų išplitusi laukuose, nes jos aprašymai susiję tik su sliekų auginimu ir komposto krūvomis (Römbke 2003). Todėl jai taikomi pirminiai ekologiniai reikalavimai nėra nustatyti. Tačiau pastaruoju metu atlikus įvairių sričių laboratorinius tyrimus nustatyta, kad šios rūšies kirmėlės prisitaiko prie gana didelių dirvožemio savybių parametrų paklaidų, pvz., pH ir tekstūros (Jänsch ir kt. 2005). Pastaraisiais metais šios rūšies individai dažnai naudoti atliekant ekotoksikologijos tyrimus, nes juos lengva auginti ir patogu naudoti, pvz., Kuperman ir kt. 2003). Tačiau šios kirmėlės yra mažos (3–12 mm; vidutinis dydis 7 mm (Westheide & Müller 1996) ir todėl jas būna sunkiau tvarkyti, jeigu lyginama su *Enchytraeus albidus*. Jeigu ši rūšis naudojama vietoj *Enchytraeus albidus*, galima rinktis mažesnį bandymo indą, tačiau šia pasirinktimi nėra privaloma naudotis. Be to, nereikėtų užmiršti, kad šios rūšies individai veisiasi labai greitai, t. y. nauja palikuonių karta išauga greičiau negu per 20 dienų 20 ± 2 °C temperatūros sąlygomis (Achazi ir kt. 1999) ir net greičiau, jeigu auginami aukštesnės temperatūros sąlygomis.

Enchytraeus albidus (taip pat kitų *Enchytraeus* rūšių) rūšies enchitrėjus galima auginti didelės plastiko dėžėse (pvz., 30 × 60 × 10 cm arba 20 × 12 × 8 cm, pritaikytose mažoms kirmėlėms auginti), pripildytose dirbtinio dirvožemio ir rinkai pateikiamo neužteršto sodo dirvožemio be priedų mišinio. Kompostavimo medžiagos nereikėtų rinktis, nes joje gali būti toksiškų cheminių medžiagų, pvz., sunkiųjų metalų. Prieš naudojant auginimo dirvožemį jo gyvūnija turėtų būti pašalinama, t. y. šiuo tikslu jis turėtų būti tris kartus sušaldomas. Taip pat leidžiama naudoti dirbtinį dirvožemį be priemaišų, tačiau šiuo atveju dauginimosi greitis būtų mažesnis, palyginti su tuo greičiu, kuris yra užtikrinamas pasirinkus mišrius substratus. Substrato pH vertė turėtų būti 6,0 ± 0,5. Auginimo kultūra laikoma inkubatoriuje 15 ± 2 °C temperatūroje, be šviesos. Bet kokiu atveju turėtų būti vengiama aukštesnės negu 23 °C temperatūros. Dirbtinis ir (rba) natūralus dirvožemis turėtų būti drėgnas, tačiau ne šlapias. Dirvožemį šiek tiek suspaudus delne turėtų rastis tik nedideli vandens lašeliai. Bet kokiu atveju neturėtų būti sukuriamos bedeguonės sąlygos (pvz., jeigu naudojamas dangtis, jame turi būti pakankamai angų, kad būtų užtikrinama reikiama oro kaita). Auginimo dirvožemis turėtų būti aeruojamas, t. y. atsargiai maišomas kartą per savaitę.

▼M4

Traiškytomis avižomis, kurios beriamos į dirvožemio paviršiaus ertmes ir užberiamos dirvožemiu, kirmėlės turėtų būti šeriamos bent kartą per savaitę be apribojimų. Jeigu ankstesnio šėrimo pašaras dar yra likę dėžėje, duodamo pašaro kiekis turėtų būti atitinkamai koreguojamas. Jeigu likusį pašarą apninka grybelis, pašarą būtina keisti kitu traiškytų avižų kiekiu. Siekiant skatinti dauginimąsi, traiškytas avižas kas dvi savaites galima papildyti rinkai pateikiamais vitaminais papildytais baltymų milteliais. Po trijų mėnesių gyvūnai perkeliami į šviežiai pasiruoštą auginimo ar veisimo substratą. Sandariuose induose laikytinas traiškytas avižas prieš naudojant reikėtų apdoroti autoklave ar pakaitinti, kad būtų išvengta miltų erkių (pvz., *Glyzyphagus sp.*, Astigmata, Acarina) ar plėšriųjų erkių (pvz., *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina) sukeliamų infekcijų. Užbaigus dezinfekavimą pašaras turi būti sumalamas taip, kad jį būtų įmanoma lengvai paskleisti dirvožemio paviršiuje. Pašarą taip pat gali atstoti kepimo mielės ar žuvų maistas „TetraMin®“.

Apskritai auginimo sąlygos laikomos tinkamomis, jeigu kirmėlės nemėgina išsigauti iš substrato, greitai šliaužti dirvožemiu, kirmėlėse nematyti blizgaus išorinio paviršiaus su prilipusiomis dirvožemio dalelėmis, kirmėlės būna daugiau ar mažiau baltos spalvos ir jeigu galima pamatyti skirtingo amžiaus kirmėlių. Tiesą sakant, kirmėles galima laikyti sveikomis, jeigu jos nuolat dauginasi.

Papildomos parinktos nuorodos

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117–126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51–83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitroheterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651–656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607–616.

Westheide W and Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479–488.

Westheide W and Graefe U (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263–267.

▼M6

C.31. BANDYMAS SU SAUSUMOS AUGALAIS. DAIGŲ PASIRODYMO IR DAIGŲ AUGIMO BANDYMAS

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 208 (2006). Bandymų metodai reguliariai persvarstomi atsižvelgiant į mokslo pažangą ir į jų tinkamumą reglamentavimo reikmėms. Šis atnaujintas bandymo metodas skirtas galimam cheminių medžiagų poveikiui augalų daigų pasirodymui ir augimui vertinti. Pagal šį metodą neatsižvelgiama į lėtinį poveikį ar poveikį reprodukcijai (t. y. sėklų užmezgimui, žiedų formavimuisi, vaisių brendimui). Siekiant užtikrinti, kad būtų taikomi tinkami bandymo metodai, būtina atsižvelgti į bandomosios cheminės medžiagos poveikio sąlygas ir savybes (pvz., atliekant metalų ir metalų junginių bandymus, reikėtų atsižvelgti į pH ir susijusių priešjonių poveikį) (1). Pagal šį bandymo metodą netiriamas cheminių medžiagų garų poveikis augalams. Pagal jį atliekami bendrosios paskirties cheminių medžiagų, biocidų ir augalų apsaugos produktų (taip pat vadinamų pesticidais) bandymai. Šis metodas parengtas remiantis esamais metodais (2), (3), (4), (5), (6), (7), atsižvelgiant ir į kitus augalų bandymams svarbius šaltinius (8), (9), (10). Taikant šį metodą vartojamos sąvokos apibrėžtos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

2. Atliekant šį bandymą vertinamas dirvožemyje (ar kitoje tinkamoje dirvožemio terpėje) esančios bandomosios cheminės medžiagos poveikis aukštesniųjų augalų daigų pasirodymui ir pradiniam augimui. Sėklos įterpiamos į bandomąja chemine medžiaga apdorotą dirvožemį ir poveikis paprastai vertinamas praėjus 14–21 dienai po 50 % kontrolinės grupės daigų pasirodymo. Vertinamoji baigtis – pasirodžiusių daigų išvaizdos vertinimas, sausos daigų medžiagos masės (arba šviežios daigų medžiagos masės) masės ir, kai kuriais atvejais, daigų aukščio nustatymas, taip pat pastebimo kenksmingo poveikio įvairioms augalo dalims vertinimas. Šių vertinimų ir stebėjimų duomenys palyginami su atitinkamais kontrolinės neapdorotos grupės augalų duomenimis.

3. Priklausomai nuo numatomo poveikio būdo, bandomoji cheminė medžiaga įterpiama į dirvožemį (arba galbūt į dirbtinio dirvožemio terpę) arba ja padengiamas dirvožemio paviršius (jei tai atitinka galimą tos cheminės medžiagos poveikio būdą). Į dirvožemį bandomoji medžiaga įterpiama bendrai apdorojant visą bandymui naudojamo dirvožemio kiekį, taip apdorotas dirvožemis paskirstomas į augalams auginti skirtus indus ir jame pasėjamos atitinkamos rūšies augalų sėklos. Kai bandomąja medžiaga reikia padengti dirvožemio paviršių, tai daroma jau pasėjus sėklas į indus su dirvožemiu. Po to bandymo vienetai (kontroliniai ir apdoroto dirvožemio bandiniai su pasėtomis sėklomis) laikomi sėklų dygimui ir augalų augimui palankiomis sąlygomis.

4. Priklausomai nuo tyrimo tikslo, šis bandymas gali būti atliekamas siekiant nubrėžti bandomosios medžiagos dozės ir atsako kreivę arba, pasirinkus vieną koncentracijos vertę (normą), kaip ribų nustatymo bandymas. Jeigu vienos koncentracijos (normos) bandymo rezultatas viršija tam tikrą toksiškumo lygį (pvz., jeigu pastebimas didesnis negu x % poveikis), atliekamas intervalo nustatymo bandymas, siekiant nustatyti viršutinę ir žemutinę toksiškumo ribas, o tada – kelių koncentracijų (normų) bandymas siekiant nubrėžti dozės ir atsako kreivę. Siekiant nustatyti efektyviąją koncentraciją EC_x arba efektyviąją naudojimo normą ER_x (pvz., EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) tiriamam didžiausio jautrio parametrui arba parametrams, atliekama tinkama statistinė analizė. Be to, atliekant šį bandymą galima apskaičiuoti nepastebėto poveikio koncentraciją (NOEC) ir mažiausią pastebėto poveikio koncentraciją (LOEC).

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

5. Nustatant tikėtiną cheminės medžiagos poveikio būdą ir planuojant bandymą naudinga žinoti šią informaciją: cheminės medžiagos struktūrinę formulę, grynumą, tirpumą vandenyje, tirpumą organiniuose tirpikliuose, 1-oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientą, gerties į dirvožemį savybes,

▼M6

garų slėgį, cheminį stabilumą veikiant vandeniui bei šviesai ir biologinį skaidumą.

BANDYMO TINKAMUMAS

6. Bandymas pripažįstamas tinkamu, jei kontrolinės grupės bandiniai atitinka šiuos veiksmingumo kriterijus:

— daigų pasirodymas siekia bent 70 %;

— daigai nėra patyrę pastebimo fitotoksinio poveikio (pvz., chlorozės, nekrozės, vytimo, lapų ir stiebų deformacijos) ir augalams yra būdingas tik tai konkrečiai rūšiai įprastas augimo ir sandaros (morfologinis) kintamumas;

— per visą tyrimo trukmę išgyvena vidutiniškai bent 90 % pasirodžiusių kontrolinės grupės daigų;

— konkrečios rūšies augalai laikomi vienodomis aplinkos sąlygomis ir jų auginimo terpių sudėtyje yra vienodi iš to paties šaltinio gautos dirvožemio terpės, atraminių medžiagų arba substrato kiekiai.

ETALONINĖ CHEMINĖ MEDŽIAGA

7. Siekiant įsitikinti, kad laikui bėgant per daug nesikeičia bandymo eiga, konkrečių bandomųjų augalų atsakas į poveikį ir bandymo sąlygos, galima reguliariai atlikti bandymus su etalonine chemine medžiaga. Kita vertus, kai kuriose laboratorijose bandymo sistemos veikimui vertinti gali būti naudojami ankstesnių kontrolinių augalų biomasės ar augimo matavimų duomenys; tai galėtų būti ir tarplaboratorinės kokybės kontrolės priemonė.

METODO APRAŠYMAS

Natūralus dirvožemis arba dirbtinis substratas

8. Augalai gali būti auginami induose, pripildytuose priesmėlio arba smėlingo priemolio, kurio sudėtyje turi būti iki 1,5 % organinės anglies (apie 3 % organinės medžiagos). Taip pat galima naudoti rinkoje parduodamą vazoniniams augalams skirtą dirvožemį arba sintetinį dirvožemio mišinį, kurio sudėtyje yra iki 1,5 % organinės anglies. Molingo dirvožemio naudoti nepatartina, jeigu yra žinoma, kad bandomajai cheminei medžiagai būdingas didelis junglumas su moliu. Iš lauko paimtą dirvožemį reikėtų išsijoti, kad jame liktų ne didesnės kaip 2 mm dalelės, taip jį suvienodinant ir pašalinant stambias daleles. Bandymo ataskaitoje reikėtų nurodyti galutinio paruošto dirvožemio rūšį ir struktūrą, organinės anglies kiekį (%), pH ir druskų kiekį, nuo kurio priklauso elektroninis laidumas. Turėtų būti nurodyta dirvožemio kategorija pagal standartinę klasifikavimo schemą (11). Dirvožemį galima pasterizuoti arba iškaitinti, kad sumažėtų jame esančių patogeninių mikroorganizmų poveikis.

9. Naudojant natūralų dirvožemį gali būti sudėtingiau aiškinti bandymo rezultatus ir jų kintamumas gali būti didesnis dėl dirvožemio fizikinių ar cheminių savybių ir mikroorganizmų populiacijų skirtumų, o šie kintamieji savo ruožtu gali pakeisti dirvožemio drėgmės imlumą, cheminių medžiagų surišimo gebą, aeraciją ir mitybinių medžiagų bei mikroelementų sudėtį. Kinta ne tik šie fiziniai parametrai, bet ir cheminės dirvožemio savybės, kaip antai pH ir oksidacijos-redukcijos potencialas, ir nuo to gali priklausyti bandomosios cheminės medžiagos biologinis įsisavinamumas (12), (13), (14).

10. Dirbtiniai substratai paprastai nenaudojami augalų apsaugos produktų bandymams, tačiau galima juos naudoti bandant bendrosios paskirties chemines medžiagas arba siekiant kuo labiau sumažinti natūraliam dirvožemiui būdingą kintamumą ir padidinti bandymų rezultatų palyginamumą. Naudojami substratai turėtų būti sudaryti iš inertinių medžiagų, kurios kuo mažiau sąveikautų su bandomąja chemine medžiaga, jos nešikliu-tirpikliu arba abiem šiomis medžiagomis. Nustatyta, kad rūgštimi išplautas kvarcinis smėlis, mineralinė vata ir stikliniai (pvz., 0,35–0,85 mm skersmens) rutuliukai yra

▼M6

tinkamos inertinės medžiagos, beveik nesugeriančios bandomosios cheminės medžiagos (15), taip užtikrinant, kad kuo didesnis jos kiekis per šaknis pasiektų daigus. Vermikulitas, perlitas ar kitos medžiagos, kurioms būdinga didelė sugerties geba, yra netinkami substratai. Turėtų pakakti augalams augti reikalingų mitybinių medžiagų, kad augalai nepatirtų streso dėl mitybinių medžiagų trūkumo; kai įmanoma, šių medžiagų pakankamumą reikėtų įvertinti atliekant cheminę analizę arba apžiūrint kontrolinius augalus.

Bandomųjų rūšių atrankos kriterijai

11. Siekiant tirti įvairius augalų atsakus į poveikį, reikėtų bandymui rinktis pakankamai įvairias rūšis, pvz., atsižvelgiant į jų taksonominę įvairovę augalų karalystėje, paplitimą, gausą, rūšiai būdingus gyvenimo ciklo ypatumus ir paplitimo gamtoje teritoriją (8), (10), (16), (17), (18), (19), (20). Renkantis iš bandymams galimų naudoti rūšių, reikėtų atsižvelgti į šiuos aspektus:

— ar tos rūšies augalai subrandina vienodas sėklas, kurias lengva gauti iš patikimo standartinių sėklų šaltinio arba šaltinių ir kurios vienodai, patikimai ir tolygiai dygsta, o daigai tolygiai auga;

— ar tie augalai yra tinkami laboratoriniams bandymams ir ar juos naudojant galima gauti patikimus ir atkuriamus rezultatus tiek toje pačioje bandymo vietoje, tiek įvairiose laboratorijose;

— bandymui naudojamos rūšies jautris turėtų atitikti natūralioje aplinkoje augančių augalų reakcijas į atitinkamos cheminės medžiagos poveikį;

— ar tos rūšys jau pirmiau kiek nors naudotos toksiškumo bandymams ir jas naudojant, pvz., herbicidų bioanalizei, sunkiųjų metalų tyrimams, druskingumo ar mineralinių medžiagų sukelto streso bandymams arba alelopatiniams tyrimams, nustatyta, kad jos yra jautrios labai įvairiems stresą sukeliantiems veiksniams;

— ar joms tinka auginimo sąlygos pagal šį bandymo metodą;

— ar jos atitinka bandymo tinkamumo kriterijus.

Kai kurios bandymams iki šiol daugiausia naudotos rūšys išvardytos 2 priedėlyje, o galimos naudoti nekultūrinių augalų rūšys – 3 priedėlyje.

12. Kiek augalų rūšių reikia naudoti per bandymą, priklauso nuo galiojančių norminių reikalavimų, todėl šio bandymo metodo aprašyme tai nenurodyta.

Bandomosios cheminės medžiagos naudojimas

13. Cheminę medžiagą reikėtų naudoti įterptą į tinkamą nešiklį (pvz., vandenį, acetoną, etanolį, polietilenglikolį, gumiarabiką, smėlį). Galima atlikti ir mišinių (apibrėžtos sudėties produktų arba preparatų), susidedančių iš veikliųjų medžiagų ir įvairių priedų, bandymus.

Įterpimas į dirvožemį arba dirbtinį substratą

14. Vandenyje tirpias arba vandenyje suspenduojamas chemines medžiagas galima įmaišyti į vandenį ir gautą tirpalą sumaišyti su dirvožemiu naudojant tinkamą maišytuvą. Bandymą šiuo būdu gali būti tinkama atlikti tada, kai cheminės medžiagos poveikis patiriamas per dirvožemį arba dirvožemio porų vandenį ir reikia tirti jos įsisavinimą per augalų šaknis. Dedant bandomąją cheminę medžiagą į dirvožemį, neturėtų būti viršytas jo drėgmės imlumas. Į kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos indą įpilamo vandens tūris turėtų būti vienodas, tačiau vandens kiekį reikėtų riboti, kad dirvožemis nesukibtų į gumulėlius.

▼M6

15. Vandenyje mažai tirpias chemines medžiagas reikėtų ištirpinti tinkamame lakiame tirpiklyje (pvz., acetone, etanolyje) ir sumaišyti su smėliu, tada tirpiklį iš smėlio galima pašalinti leidžiant oro srautą ir smėlį nepaliaujamai maišant. Taip apdorotas smėlis sumaišomas su bandymui naudojamu dirvožemiu. Paruošiamas antras kontrolinis bandinys, į kurį dedama tik smėlio ir tirpiklio. Į visų koncentracijų bandinius ir antrąjį kontrolinį bandinį dedama po vienodą smėlio, į kurį įmaišyta tirpiklio (kuris vėliau pašalintas), kiekį. Atliekant kietų, netirpių cheminių medžiagų bandymus, cheminė medžiaga sumaišoma su sausu dirvožemiu naudojant tinkamą maišytuvą, tada dirvožemis sudedamas į augalams auginti skirtus indus, į kuriuos iškart pasėjamos sėklos.

16. Kai vietoj dirvožemio naudojamas dirbtinis substratas, vandenyje tirpias chemines medžiagas galima ištirpinti mitybinių medžiagų tirpale prieš pat pradedant bandymą. Vandenyje netirpias chemines medžiagas, kurias galima suspenduoti vandenyje naudojant tirpiklį-nešiklį, reikėtų kartu su nešikliu įmaišyti į mitybinių medžiagų tirpalą. Vandenyje netirpias chemines medžiagas, kurioms tinkamų netoksiškų vandenyje tirpių nešiklių nėra, reikėtų ištirpinti tinkamame lakiajame tirpiklyje. Gautas tirpalas sumaišomas su smėliu arba stikliniais rutuliukais, mišinys įdedamas į būgninį vakuuminį aparatą ir išgarinamas. Lieka chemine medžiaga tolygiai padengtos smėlio dalelės arba stikliniai rutuliukai. Tam tikrą pasvertą rutuliukų dalį reikėtų paveikti tuo pačiu organiniu tirpikliu, ekstrahuojant bandomąją cheminę medžiagą ir ją išanalizuojant; tai reikėtų padaryti prieš pripildant indus, kuriuose bus auginami augalai.

Dirvožemio paviršiaus apdorojimas bandomąja medžiaga

17. Atliekant augalų apsaugos produktų bandymus, bandomoji cheminė medžiaga dažnai naudojama apipurškiant bandomuoju tirpalu dirvožemio paviršių. Visa bandymams naudojama įranga, įskaitant bandomosios cheminės medžiagos ruošimo ir dozavimo įrangą, turėtų būti tokio modelio ir gebos, kad, naudojant tą įrangą, bandymus būtų galima atlikti tiksliai ir prireikus pakartoti. Bandomąja medžiaga turėtų būti vienodai padengiamas visų bandinių dirvožemio paviršius. Reikėtų stengtis apsisaugoti nuo galimos cheminės medžiagos įgerties į naudojamą įrangą ar reakcijų su šia įranga (pvz., plastikiniais vamzdeliais ir lipofilinėmis medžiagomis arba plieninėmis dalimis ir elementais). Bandomoji cheminė medžiaga užpurškiama ant dirvožemio paviršiaus imituojant įprastą purškimą žemės ūkyje naudojamais purkštuvais. Paprastai užpurškiamas toks medžiagos kiekis, koks naudojamas pagal įprastą žemės ūkio praktiką; atitinkami (vandens ir kt.) kiekiai turėtų būti nurodyti ataskaitoje. Reikėtų rinktis tokį purkštuvo antgalį, kad būtų tolygiai padengiamas visas dirvožemio paviršius. Jeigu naudojami tirpikliai ir nešikliai, reikėtų paruošti antrą kontrolinių augalų, į kurių indus bus dedama tik tirpiklio arba nešiklio, grupę. To daryti nereikia, kai augalų apsaugos produktai bandomi kaip preparatai.

Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos (normos) patikrinimas

18. Bandymui pasirinktas cheminės medžiagos koncentracijas (naudojimo normas) būtina patikrinti atliekant tinkamą patvirtinamąją analizę. Visas tirpių cheminių medžiagų bandymo koncentracijas (normas) galima patvirtinti išanalizuojant bandymui naudojamą didžiausios koncentracijos bandomąjį tirpalą, jo vėlesnį skiedimą aprašant bandymo dokumentuose ir naudojant tinkamą kalibruotą įrangą (pvz., kalibruotus analizei skirtus stiklinius indus, kalibruotą purškimo įrangą). Atliekant netirpių cheminių medžiagų bandymus, gautą sudėtinę medžiagą būtina patikrinti pagal bandomosios cheminės medžiagos, dedamos į dirvožemį, masę. Jei būtina įrodyti dirvožemio vienalytiškumą, gali reikėti jį išanalizuoti.

PROCEDŪRA

Bandymo planas

19. Į indus pasėjamos tos pačios rūšies augalų sėklos. Į vieną indą sėjamų sėklų kiekis priklauso nuo augalų rūšies, indo dydžio ir bandymo trukmės. Viename inde turėtų būti tiek augalų, kad jie per visą bandymo trukmę galėtų augti tinkamomis sąlygomis ir jiems nebūtų per ankšta. Augalai turėtų

▼M6

būti sėjami ne tankiau kaip maždaug 3–10 sėklų 100 cm^2 plote (priklausomai nuo sėklų dydžio). Pavyzdžiui, 15 cm skersmens inde patartina auginti 1–2 kukurūzų, sojų, pomidorų, agurkų ar cukrinių runkelių daigus, tris rapsų ar žirnių daigus arba 5–10 svogūnų, kviečių ar kitų smulkiasėklių augalų daigų. Sėklų ir kartotinių indų (kartotiniais bandiniais laikomi indai, todėl atskiri tame pačiame inde augantys augalai nėra kartotiniai bandiniai) skaičius turėtų būti tinkamas statistinei analizei efektyviai atlikti (21). Pažymėtina, kad rezultatų kintamumas yra didesnis tada, kai į vieną (kartotinį) indą pasėjama mažiau, tačiau didesnių bandomosios rūšies augalų sėklų, negu tada, kai į indą galima pasėti daugiau smulkių sėklų. Šį kintamumą galima sumažinti į kiekvieną indą sėjant po vienodą augalų skaičių.

20. Siekiant užtikrinti, kad per bandymą būtų stebimas tik bandomosios cheminės medžiagos sukeltas ar su ja susijęs poveikis, naudojamos kontrolinės grupės. Tinkama kontrolinė grupė turėtų būti visais atžvilgiais tapati bandomajai grupei, išskyrus tai, kad ji nepatiria bandomosios cheminės medžiagos poveikio. Visi per vieną bandymą naudojami augalai, įskaitant kontrolinius augalus, turėtų būti gauti iš to paties šaltinio. Kad būtų išvengta vertinimo klaidų, būtina atsitiktine tvarka paskirstyti bandymo ir kontrolinius indus.

21. Reikėtų stengtis nenaudoti insekticidais ar fungicidais padengtų (t. y. beicuotų) sėklų, tačiau kai kurios reguliavimo institucijos leidžia naudoti tam tikrus nesisteminius kontaktinius fungicidus (pvz., kaptaną, tiramą) (22). Jeigu esama susirūpinimo dėl per sėklas platinamų patogeninių organizmų, galima trumpai pamirkyti sėklas silpname 5 % hipochlorito tirpale, tada kruopščiai perplauti tekančiu vandeniu ir išdžiovinti. Sėklų negalima papildomai apdoroti kitu augalų apsaugos produktu.

Bandymo sąlygos

22. Bandymo sąlygos turėtų būti artimos normaliam bandomųjų rūšių ir veislių augalų augimui reikalingoms sąlygoms (tinkamų bandymo sąlygų pavyzdžių pateikta 4 priedėlyje). Sudygę augalai turėtų būti pagal gerąją daržininkystės praktiką prižiūrimi reguliuojamo klimato kamerose, fitotronuose arba šiltnamiuose. Naudojant specialias augalams auginti skirtas patalpas, jose paprastai turėtų būti kontroliuojama ir pakankamai dažnai (pvz., kartą per dieną) užrašoma temperatūra, drėgnis, anglies dioksido koncentracija, šviesos (stiprio, bangų ilgio, fotosintezei tinkamos apšvietos) ir apšvietimo trukmės duomenys, laistymo būdas ir t. t., siekiant užtikrinti, kad augalai gerai augtų, palyginti su kontroliniais tos rūšies augalais. Temperatūra šiltnamyje turėtų būti reguliuojama vėdinimo, šildymo ir (arba) vėsinimo sistemomis. Apskritai bandymus šiltnamyje rekomenduojama atlikti tokiomis sąlygomis:

— 22 ± 10 °C temperatūra;

— 70 ± 25 % drėgnis;

— apšvietimo trukmė – ne mažiau kaip 16 šviesos valandų per parą;

— 350 ± 50 μ $E/m^2/s$ šviesos stipris. Jeigu šviesos stipris yra mažesnis nei 200 $\mu E/m^2/s$, o bangų ilgis nesiekia 400–700 nm intervalo, gali reikėti papildomo apšvietimo, išskyrus tuos atvejus, kai naudojamoms rūšims reikia mažiau šviesos.

Aplinkos sąlygos turėtų būti stebimos ir užrašomos per visą tyrimo trukmę. Augalai turėtų būti auginami neakytuose plastikiniuose ar glazūruotuose induose, po kuriais padėti padėklai arba lėkštelės. Indus galima reguliariai perstatyti siekiant, kad augalai augtų vienodai (taip sumažinant kintamumą

▼M6

dėl auginimo patalpose esamų nevienodų bandymo sąlygų). Indai turi būti pakankamai dideli, kad augalai juose galėtų normaliai augti.

23. Dirvožemio mitybines medžiagas galima papildyti, kai to reikia augalų gyvybingumui palaikyti. Ar reikia papildomų mitybinių medžiagų, ir kada jų dėti, galima sužinoti stebint kontrolinius augalus. Bandymo indus patartina drėkinti iš apačios (pvz., naudojant stiklo pluošto vamzdelius), tačiau iš pradžių galima laistyti iš viršaus, nes taip skatinamas sėklų dygimas ir, jeigu bandomąja medžiaga padengtas dirvožemio paviršius, palengvinama jos skverbtis į dirvožemį.

24. Konkrečios auginimo sąlygos turėtų būti tinkamos bandomajai augalų rūšiai ir tiriamai cheminei medžiagai. Kontrolinių ir bandomųjų grupių augalai turi būti laikomi vienodomis aplinkos sąlygomis, tačiau reikėtų imtis tinkamų priemonių, kad (pvz., lakiosios) bandomosios cheminės medžiagos neprasiskverbtų iš vienos bandomosios grupės į kitą ir nepaveiktų kontrolinės grupės augalų.

Vienos koncentracijos (normos) bandymas

25. Siekiant nustatyti tinkamą cheminės medžiagos koncentraciją arba normą, kad būtų galima atlikti vienos (poveikio / ribinės) koncentracijos arba normos bandymą, būtina atsižvelgti į kelis veiksnius. Per bendrosios paskirties cheminių medžiagų bandymus tie veiksniai yra cheminės medžiagos fizikinės ir cheminės savybės. Per augalų apsaugos produktų bandymus būtina atsižvelgti į bandomosios cheminės medžiagos fizikines ir chemines savybes, naudojimo pobūdį, jos didžiausią koncentraciją arba naudojimo normą, kiek kartų ji naudojama per sezoną, ir (arba) jos patvarumą. Siekiant nustatyti, ar bendrosios paskirties cheminė medžiaga turi fitotoksinių savybių, gali reikėti bandymui naudoti didžiausią jos kiekį – 1 000 mg vienam sausos dirvožemio masės kilogramui.

Intervalo nustatymo bandymas

26. Kai reikia, galima atlikti intervalo nustatymo bandymą siekiant sužinoti, kokias bandomosios medžiagos koncentracijas ar normas tinka naudoti per nustatomąjį dozės ir atsako tyrimą. Atliekant intervalo nustatymo bandymą, bandymui turėtų būti pasirinktas pakankamai platus koncentracijų (normų) intervalas (pvz., 0,1, 1,0, 10, 100 ir 1 000 mg medžiagos vienam sausos dirvožemio masės kilogramui). Per augalų apsaugos produktų bandymus reikiamas koncentracijas (normas) galima pasirinkti pagal rekomenduojamą arba didžiausią koncentraciją ar naudojimo normą, pvz., 1/100, 1/10 ar 1/1 rekomenduojamos arba didžiausios koncentracijos ar naudojimo normos.

Kelių koncentracijų (normų) bandymai

27. Bandymo, kuriam pasirenkamos kelios bandomosios medžiagos koncentracijos (normos), tikslas yra nustatyti jos dozės ir atsako santykį, taip pat nustatyti poveikio daigų pasirodymui, biomasei ir (arba) išvaizdai, palyginti su tos medžiagos poveikio nepatiriančiais kontroliniais bandiniais, EC_x arba ER_x vertę pagal reguliavimo institucijų reikalavimus.

28. Pasirinktų koncentracijos verčių arba normų skaičius ir intervalas turėtų būti pakankami, kad būtų galima gauti patikimą dozės ir atsako santykį bei regresijos lygtį ir EC_x arba ER_x įvertį. Pasirinktų koncentracijų (normų) intervalas turėtų apimti nustatomas EC_x arba ER_x vertes. Pavyzdžiui, jeigu reikia nustatyti EC_{50} vertę, bandymui patartina rinktis tokias bandomosios medžiagos normas, kad poveikis būtų 20–80 %. Šiuo tikslu rekomenduojama rinktis ne mažiau kaip penkias bandymo koncentracijos vertes (normas),

▼M6

išdėstytas geometrine progresija, kurios daugiklis neviršytų 3, kartu su kontroline neapdorota grupe. Kiekvienoje bandomojoje ir kontrolinėje grupėje turėtų būti mažiausiai 4 kartotiniai bandiniai, o sėklų iš viso turi būti ne mažiau kaip 20. Bandymui naudojant kai kuriuos augalus, kuriems būdingas mažas daigumas arba netolygus augimas, siekiant atlikti statistiškai patikimesnį bandymą, gali reikėti naudoti daugiau kartotinių bandinių. Jeigu bandymui pasirenkama daugiau koncentracijos verčių (normų), kartotinių bandinių gali būti mažiau. Jeigu reikia įvertinti NOEC, siekiant reikiamo statistinio patikimumo, gali reikėti naudoti daugiau kartotinių bandinių (23).

Stebėjimai

29. Stebėjimo laikotarpiu, t. y. 14–21 dieną po 50 % kontrolinių augalų (ir, kai tinka, tirpiklio kontrolinių bandinių augalų) sudygimo, augalai dažnai apžiūrimi (bent kartą per savaitę, jeigu įmanoma – kasdien) ir įvertinamas daigų pasirodymas, pastebimi fitotoksiškumo požymiai bei mirtingumas. Baigiant bandymą reikėtų užrašyti išmatuotą likusių gyvų augalų daigų pasirodymo procentinį lygį ir biomasę ir aprašyti pastebėtą kenksmingą poveikį įvairioms augalo dalims. Tai gali būti pakitusi pasirodžiusių daigų išvaizda, sulėtėjęs augimas, chlorozė, spalvos pakitimas, žūstamumas ir poveikis augalo vystymuisi. Galutinę biomasę galima išmatuoti pagal galutinę vidutinę likusių gyvų daigų sausosios medžiagos masę, nupjovus daigus ties dirvožemio paviršiumi ir išdžiovinus 60° C temperatūroje iki pastovios masės. Galutinę biomasę galima išmatuoti ir kitu būdu pagal šviežios daigų medžiagos masę. Dar viena vertinamoji baigtis gali būti daigo aukštis, jei to reikalauja reguliavimo institucijos. Vertinant pastebimą toksinį atsaką, pastebėtiems pažeidimams apibūdinti reikėtų naudoti vienodą vertinimo balais sistemą. Pavyzdžių, kaip galima atlikti kokybinius ir kiekybinius augalų vertinimus juos apžiūrint, pateikta nurodytoje literatūroje (23), (24).

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Statistinė analizė

Vienos koncentracijos (normos) bandymas

30. Kiekvienos rūšies augalų duomenis reikėtų išanalizuoti taikant tinkamą statistinį metodą (21). Ataskaitoje reikėtų nurodyti pasirinktos bandomosios medžiagos koncentracijos (normos) poveikio lygį arba nurodyti, kad esant tai koncentracijai (normai), tokio poveikio nepatirta (pvz., esant *y* koncentracijai arba normai, pastebėtas < *x* % poveikis).

Kelių koncentracijų (normų) bandymas

31. Dozės ir atsako santykis nustatomas pagal regresijos lygtį. Galima naudoti įvairius modelius: pvz., vertinant EC_x arba ER_x (kaip antai EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) ir šių verčių pasikliovimo ribas, daigų pasirodymą išreiškiant dvireikšmiais kintamaisiais, gali būti tinkama naudoti logito, probito, Weibull, Spearman-Karber, sutrumpintą Spearman-Karber ar kitus metodus. Nustatant daigų augimą (masę ir aukštį) kaip tolydžias vertinamąsias baigtis, EC_x arba ER_x ir šių verčių pasikliovimo ribas galima įvertinti atliekant tinkamą regresinę analizę (pvz., netiesinės regresijos analizę pagal Bruce ir Versteeg (25)). Kai įmanoma, jautriausių rūšių R^2 vertė turėtų būti 0,7 arba didesnė, o bandymui pasirinktos koncentracijos (normos) turėtų apimti 20–80 % poveikį. Jei reikia įvertinti NOEC, patartina taikyti patikimus statistinius kriterijus, kuriuos reikėtų pasirinkti remiantis duomenų paskirstymu (21), (26).

Bandymo ataskaita

32. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikti atliktų tyrimų rezultatai ir išsamiai aprašytos bandymo sąlygos, pateiktas išsamus rezultatų aptarimas, duomenų analizė ir šios analizės išvados. Reikėtų pateikti suvestinę rezultatų lentelę ir santrauką. Ataskaitoje turi būti pateikta toliau nurodyta informacija:

▼M6

Bandomoji cheminė medžiaga

— Cheminės medžiagos atpažinties duomenys, svarbios bandomosios cheminės medžiagos savybės (pvz., *log* P_{ow}, tirpumas vandenyje, garų slėgis, jei žinoma – informacija apie išliekamumą ir elgseną aplinkoje).

— Išsami informacija apie bandymo tirpalo ruošimą ir bandymui pasirinktų koncentracijų patikrinimą, kaip nurodyta 18 skirsnyje.

Bandomosios rūšys

— Informacija apie bandomuosius organizmus: rūšis (veislė), augalų šeimos, moksliniai ir bendriniai pavadinimai, gavimo šaltinis; kuo išsamiau aprašyta sėklų kilmė (t. y. tiekėjo pavadinimas, procentinis daigumas, sėklų dydžio kategorija, siuntos arba partijos numeris, kuriais metais arba per kurį augimo sezoną surinktos sėklos, daigumo nustatymo data), gyvybingumas ir t. t.

— Bandymui naudotų vienaskilčių ir dviskilčių augalų rūšių skaičius.

— Naudotų rūšių pasirinkimo priežastys.

— Sėklų laikymo, tvarkymo ir priežiūros aprašymas.

Bandymo sąlygos

— Bandymo patalpa (pvz., auginimo kamera, fitotronas ir šiltnamis).

— Bandymo sistemos aprašymas (pvz., augalams auginti skirtų indų matmenys, iš kokios medžiagos pagaminti tie indai, naudojami dirvožemio kiekiai).

— Dirvožemio savybės (dirvožemio struktūra arba rūšis: dirvožemio granuliometrinė sudėtis ir klasifikacija, fizikinės ir cheminės savybės, įskaitant organinės medžiagos kiekį (%), organinės anglies kiekį (%) ir pH vertę).

— Dirvožemio arba substrato (pvz., dirvožemio, dirbtinio dirvožemio, smėlio ar kt.) paruošimas prieš bandymą.

— Mitybinės terpės (jei naudojama) aprašymas.

— Bandomosios cheminės medžiagos naudojimas: naudojimo būdo aprašymas, naudojamos įrangos aprašymas, tos medžiagos poveikio lygiai ir kiekiai, be kita ko, patikrinti cheminės analizės būdu, taikyto kalibravimo metodo aprašymas ir aplinkos sąlygų, buvusių naudojant bandomąją medžiagą, aprašymas.

— Augalų auginimo sąlygos: šviesos stipris (pvz., fotosintezei tinkama apšvieta), apšvietimo trukmė, aukščiausia ir žemiausia temperatūros, laistymo grafikas ir būdas, tręšimas.

— Sėklų skaičius viename inde, vieną bandomosios medžiagos dozę gavusių augalų skaičius, kiekvieno poveikio lygio kartotinių bandinių (indų) skaičius.

— Kontrolinių bandinių (neigiamų ir (arba) teigiamų kontrolinių bandinių, tirpiklio, jei naudojamas, kontrolinių bandinių) rūšis ir skaičius.

— Bandymo trukmė.

Rezultatai

— Visų kiekvieno kartotinio bandinio, bandymui pasirinktos koncentracijos (normos) ir bandomosios rūšies vertinamųjų baigčių lentelė.

— Bandomosios grupės sėklų daigumas (išreikštas skaičiumi ir procentais), palygintas su kontrolinės grupės sėklų daigumu.

— Biomasės (sausos arba šviežios daigų medžiagos masės) matavimai, išreikšti kontrolinės grupės biomasės procentine dalimi.

▼M6

— Augalų daigų aukštis, išreikštas kontrolinės grupės daigų aukščio procentine dalimi (jeigu matuojamas).

— Pastebėti dėl bandomosios cheminės medžiagos poveikio atsiradę daigų pažeidimai, išreikšti procentiniu dydžiu, ir tų pastebėtų pažeidimų (chlorozės, nekrozės, vytimo, lapų ir stiebų deformacijos arba jokio poveikio, jei jo nepastebėta) kokybinis bei kiekybinis apibūdinimas, palyginant su kontroliniais augalais.

— Jei pastebėti pažeidimai vertinami balais – naudojamos balų sistemos aprašymas.

— Jei tyrimui pasirinkta tik viena bandomosios medžiagos norma, reikėtų nurodyti pažeidimų dydį, išreikštą procentais.

— EC_x arba ER_x (pvz., EC_{50}, ER_{50}, EC_{25}, ER_{25}) vertės ir atitinkamos pasikliovimo ribos. Jei atliekama regresinė analizė, pateikite regresinės lygties standartinę paklaidą ir atskirų parametrų įverčio (pvz., nuolydžio, atkarpos) standartinę paklaidą.

— Jeigu apskaičiuotos – NOEC (ir LOEC) vertės.

— Taikytų statistinių procedūrų ir padarytų prielaidų aprašymas.

— Šių duomenų grafinė schema ir bandomosios rūšies dozės bei atsako santykis.

Ataskaitoje taip pat turėtų būti aprašyti bet kokie nukrypimai nuo nustatytų pagal šį bandymo metodą atliekamų procedūrų ir bet kokie per bandymą pastebėti neįprasti reiškiniai.

NUORODOS

(1) Schrader G., Metge K., and Bahadir M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. Applied Soil Ecology, 7, 189-193.

(2) International Organisation of Standards. (1993). ISO 11269-1. Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora – Part 1: Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth.

(3) International Organisation of Standards. (1995). ISO 11269-2. Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora – Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants.

(4) American Standard for Testing Material (ASTM). (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.

(5) U.S. EPA. (1982). FIFRA, 40CFR, Part 158.540. Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.

(6) US EPA. (1996). OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850. Ecological Effects Test Guidelines:

— 850.4000: Background – Non-target Plant Testing;

— 850.4025: Target Area Phytotoxicity;

— 850.4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence);

— 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test;

— 850.4225: Seedling Emergence, Tier II;

— 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.

(7) AFNOR, X31-201. (1982). Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1. (1993) Determination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.

(8) Boutin, C., Freemark, K.E. and Keddy, C.J. (1993). Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-target plant testing and evaluation. Technical Report Series No.145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Canada.

▼**M6**

(9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., and Zwerger, P. (1997). Effects of Plant Protection Products on Non-Target Organisms – A contribution to the Discussion of Risk Assessment and Risk Mitigation for Terrestrial Non-Target Organisms (Flora and Fauna). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. No 48.

(10) Hale, B., Hall, J.C., Solomon, K., and Stephenson, G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario Canada.

(11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(12) Audus, L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. In: Audus, L.J. ed. *The Physiology and biochemistryof Herbicides*, London, New York, Academic Press, NY, Chapter 5, pp. 163-206.

(13) Beall, M.L., Jr. and Nash, R.G. (1969). Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlorfrom soil, J. Agro. 61:571-575.

(14) Beetsman, G.D., Kenney, D.R. and Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247-250.

(15) U.S. Food and Drug Administration (FDA). (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 pp., FDA, Washington, DC.

(16) McKelvey, R.A., Wright, J.P., Honegger, J.L. and Warren, L.W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science vol. 58:1161-1174

(17) Boutin, C.; Elmegaard, N. and Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology vol. 13(4): 349-369.

(18) Boutin, C., and Rogers, C.A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides – An analysis with two databases. Ecotoxicology vol.9(4):255-271.

(19) Boutin, C. and Harper, J.L. (1991). A comparative study of the population dynamics of five species of *Veronica* in natural habitats. J. Ecol. 9:155-271.

(20) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T.E., Batchelor, S.P. and Maguire, R.J.. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532-2541.

(21) OECD (2006). Draft Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(22) Hatzios, K.K. and Penner, D. (1985). Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. Rev. Weed Sci. 1:1-63.

(23) Hamill, P.B., Marriage, P.B. and G. Friesen. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. Weed Science 25:386-389.

(24) Frans, R.E. and Talbert, R.E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. In: B. Truelove (Ed.) Research Methods in Weed Science, 2nd ed. Southern weed Science Society, Auburn, 15-23.

(25) Bruce, R.D. and Versteeg, D. J.(1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. Environmental Toxicology and Chemistry 11, 1485-1492.

(26) Šio priedo C.33 skyrius. Sliekų (*Eisenia fetida / Eisenia andrei*) reprodukcijos bandymas.

▼M6

1 priedėlis

Sąvokų apibrėžtys

Veiklioji medžiaga (arba aktyvioji medžiaga)– medžiaga, naudojama siekiant sukelti tam tikrą biologinį poveikį (pvz., skirta vabzdžių kontrolei, augalų ligų kontrolei, piktžolių kontrolei ta medžiaga apdorojamame plote), taip pat vadinama techniškai gryna veikliąja medžiaga ar aktyviąja medžiaga.

Cheminė medžiaga– medžiaga arba mišinys.

Augalų apsaugos produktai (AAP) arba **pesticidai**– specifinio biologinio aktyvumo medžiagos, tikslingai naudojamos kultūriniams augalams nuo kenkėjų (pvz., grybelinių ligų, vabzdžių ir kitų konkuruojančių augalų) apsaugoti.

EC_x · x % poveikio koncentracija arba ER_x · x % poveikio lygis– bandomosios medžiagos koncentracija arba lygis, kuriam esant pasireiškia x % nepageidaujamas pokytis arba nuokrypis nuo bandymo vertinamosios baigties, palyginti su kontroline grupe (pvz., 25 arba 50 % mažesnis pasirodžiusių daigų skaičius, daigų aukštis, galutinis gyvų augalų skaičius arba pastebėtų pažeidimų dydis reikštų atitinkamai EC_{25} / ER_{25} arba EC_{50} / ER_{50}).

Daigo pasirodymas– augalo diegamakštės arba sėklaskiltės pasirodymas virš dirvožemio paviršiaus.

Preparatas– apibrėžtos sudėties komercinis produktas, kurio sudėtyje yra veikliosios medžiagos (aktyviosios medžiagos), taip pat vadinamas galutiniu preparatu ([1]) arba įprastu galutinio naudojimo produktu (angl. *typical end-use product*, TEP).

Mažiausia pastebėto poveikio koncentracija (LOEC)– mažiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant pastebėtas jos poveikis. Atliekant šį bandymą, LOEC atitinkanti koncentracija per nustatytą veikimo laikotarpį padaro statistiškai reikšmingą poveikį ($p < 0,05$), palyginti su kontroline grupe, ir yra didesnė nei NOEC vertė.

Netiksliniai augalai– augalai, augantys už tikslinių augalų ploto ribų. Naudojant augalų apsaugos produktus, netiksliniais augalais paprastai vadinami už tais produktais apdorojamo ploto ribų esantys augalai.

Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC)– didžiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant jokio poveikio nepastebėta. Atliekant šį bandymą, NOEC atitinkanti koncentracija per nustatytą veikimo laikotarpį nepadaro statistiškai reikšmingo poveikio ($p < 0,05$), palyginti su kontroline grupe.

Fitotoksiškumas– neigiami įprastos augalų išvaizdos ir augimo pakitimai (nustatomi atliekant matavimus ir apžiūrint augalus) dėl atsako į konkrečios cheminės medžiagos poveikį.

Kartotinis bandinys– kontrolinėje grupėje ir (arba) bandomojoje grupėje esantis reprezentatyvus bandymo vienetas. Per šiuos tyrimus kartotinis bandinys yra indas, kuriame auginami augalai.

Išvaizdos vertinimas– pastebimos augalams padarytos žalos vertinimas balais apžiūrint sudygusius augalus, jų gyvybingumą, deformacijas, chlorozę, nekrozę ir bendrą išvaizdą, palyginti su kontroline grupe.

Bandomoji cheminė medžiaga– naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

([1]) Galutinis preparatas – apibrėžtos sudėties komercinis produktas, kurio sudėtyje yra veikliosios medžiagos (aktyviosios medžiagos).

▼**M6**

2 priedėlis

Bandymams iki šiol naudotų augalų rūšių sąrašas

Šeima	Rūšis	Bendriniai pavadinimai
DICOTYLEDONAE		
Apiaceae (Umbelliferae)	*Daucus carota*	Paprastoji morka
Asteraceae (Compositae)	*Helianthus annuus*	Paprastoji saulėgrąža
Asteraceae (Compositae)	*Lactuca sativa*	Sėjamoji salota
Brassicaceae (Cruciferae)	*Sinapis alba*	Baltoji garstyčia
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica campestris* var. *chinensis*	Kininis kopūstas
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica napus*	Sėjamasis rapsas
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica oleracea* var. *capitata*	Gūžinis kopūstas
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica rapa*	Ropė
Brassicaceae (Cruciferae)	*Lepidium sativum*	Sėjamoji pipirnė
Brassicaceae (Cruciferae)	*Raphanus sativus*	Valgomasis ridikas
Chenopodiaceae	*Beta vulgaris*	Paprastasis runkelis
Cucurbitaceae	*Cucumis sativus*	Paprastasis agurkas
Fabaceae (Leguminosae)	*Glycine max (G. soja)*	Gauruotoji soja
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus aureus*	Spindulinė pupuolė
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus vulgaris*	Daržinė pupelė, šparaginė pupelė
Fabaceae (Leguminosae)	*Pisum sativum*	Sėjamasis žirnis
Fabaceae (Leguminosae)	*Trigonella foenum-graecum*	Vaistinė ožragė
Fabaceae (Leguminosae)	*Lotus corniculatus*	Paprastasis garždenis
Fabaceae (Leguminosae)	*Trifolium pratense*	Raudonasis dobilas
Fabaceae (Leguminosae)	*Vicia sativa*	Sėjamasis vikis
Linaceae	*Linum usitatissimum*	Sėjamasis linas
Polygonaceae	*Fagopyrum esculentum*	Sėjamasis grikis
Solanaceae	*Solanum lycopersicon*	Pomidoras

▼**M6**

Šeima	Rūšis	Bendriniai pavadinimai
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amarylladaceae)	*Allium cepa*	Valgomasis svogūnas
Poaceae (Gramineae)	*Avena sativa*	Sėjamoji aviža
Poaceae (Gramineae)	*Hordeum vulgare*	Paprastasis miežis
Poaceae (Gramineae)	*Lolium perenne*	Daugiametė svidrė
Poaceae (Gramineae)	*Oryza sativa*	Sėjamasis ryžis
Poaceae (Gramineae)	*Secale cereale*	Sėjamasis rugys
Poaceae (Gramineae)	*Sorghum bicolor*	Sorgas
Poaceae (Gramineae)	*Triticum aestivum*	Paprastasis kvietys
Poaceae (Gramineae)	*Zea mays*	Paprastasis kukurūzas

▼M6

3 priedėlis

Galimų naudoti nekultūrinių augalų rūšių sąrašas

Toksiškumo augalams bandymams galimos naudoti rūšys pagal EBPO

Pastaba. Tolesnėje lentelėje pateikiama informacija apie 52 nekultūrinių augalų rūšis (skliausteliuose pateiktos kiekvienai rūšiai svarbios literatūros nuorodos). Lentelėje pateikiami daigų pasirodymo duomenys yra paimti iš publikuotos literatūros ir skirti tik susipažinti; reali padėtis gali priklausyti nuo to, iš kokio šaltinio gautos sėklos, ir nuo kitų veiksnių.

ŠEIMA Botaninis rūšies pavadinimas (lietuviškas bendrinis pavadinimas)	Gyvenimo trukmė ir augimvietė [1]	Sėklos masė (mg)	Sudygimui arba augimui reikalinga apšvietimo trukmė [2]	Sėjimo gylis (mm) [3]	Per kiek laiko (parų) sudygsta sėklos [4]	Specialus paruošimas [5]	Toksiškumo bandymas [6]	Sėklų tiekėjai [7]	Kitos nuorodos [8]
APIACEAE *Torilis japónica* (Builinė dygūnė)	V arba Dv Auga žmogaus veiklos paliestose vietose, gyvatvorėse, ganyklose (16, 19)	1,7–1,9 (14, 19)	Š = T (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	stratifikavimas šaltyje (7, 14, 18, 19), sėklas gali reikėti subrandinti (19), tamsa stabdo dygimą (1, 19), nereikia specialaus paruošimo (5)	PO (5)		
ASTERACEAE *Bellis perennis* (Daugiametė saulutė)	D Auga pievose, ariamuose laukuose, vejose (16, 19)	0,09–0,17 (4, 19)	Š = T (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	dygimas nepriklauso nuo apšvietos (18, 19), nereikia specialaus paruošimo (4, 14)	PO (4)	A, D, F	7
Centaurea cyanus (Rugiagėlė)	V Auga laukuose, pakelėse, atvirose augimvietėse (16)	4,1–4.9 (4, 14)	Š = T (14)	0–3 (2, 4, 14)	14–21 (100 %) (14)	nereikia specialaus paruošimo (2, 4)	PO (2, 4)	A, D, E, F	7
Centaurea nigra (Juodoji bajorė)	D Auga laukuose, pakelėse, atvirose augimvietėse (16, 19)	2,4–2,6 (14, 19)	Š = T (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	sėklas gali reikėti subrandinti (18, 19), tamsa stabdo dygimą (19), nereikia specialaus paruošimo (5, 14, 26)	PO (5, 22, 26)	A	
Inula helenium (Didysis debesylas)	D Auga drėgnose, žmogaus veiklos paliestose vietose (16)	1–1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		nereikia specialaus paruošimo (4)	PO (4)	A, F	

▼M6

ŠEIMA Botaninis rūšies pavadinimas (lietuviškas bendrinis pavadinimas)	Gyvenimo trukmė ir augimvietė (1)	Sėklos masė (mg)	Sudygimui arba augimui reikalinga apšvietimo trukmė (2)	Sėjimo gylis (mm) (3)	Per kiek laiko (parų) sudygsta sėklos (4)	Specialus paruošimas (5)	Toksiškumo bandymas (6)	Sėklų tiekėjai (7)	Kitos nuorodos (8)
Leontodon hispidus (Vienagraižė snaudalė)	D Auga laukuose, pakelėse, žmogaus veiklos paliestose vietose (16, 19)	0,85–1,2 (14, 19)	Š = T (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	tamsa stabdo dygimą (17, 18, 19), nereikia specialaus paruošimo (5, 23)	PO (5, 22, 23)		
Rudbeckia hirta (Plaukuotoji rudbekija)	D, Dv Auga žmogaus veiklos paliestose vietose (16)	0,3 (4, 14)	Š = T (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	nereikia specialaus paruošimo (4, 14, 33)	PO (4, 33)	C, D, E, F	
Solidago canadensis (Kanadinė rykštenė)	D Auga ganyklose, atvirose vietose (16)	0,06–0,08 (4, 14)	Š = T (11)	0 (4)	14–21 (11)	sumaišyti su tokiu pačiu smėlio kiekiu ir 24 val. mirkyti 500 ppm giberelino (GA) tirpale (11), nereikia specialaus paruošimo (4)	PO (4)	E, F	
Xanthium pensylvanicum (Pensilvaninis dagišius)	V Auga laukuose, atvirose augimvietėse (16)	25–61 (14, 29)		0(1) 5(29)		tamsa gali stabdyti dygimą (1), 12 val. mirkyti šiltame vandenyje (29)	PRIEŠ IR PO (31)	A	
Xanthium spinosum (Dygliuotasis dagišius)	V Auga atvirose augimvietėse (16)	200 (14)	Š = T (14) Š > T (6)	10 (6)		skarifikavimas (14), nereikia specialaus paruošimo (6)	PRIEŠ IR PO (6)	A	
Xanthium strumarium (Paprastasis dagišius)	V Auga laukuose, atvirose augimvietėse (16)	67,4 (14)	Š = T (14)	10–20 (6, 21)		nereikia specialaus paruošimo (6, 14, 21)	PRIEŠ IR PO (6, 21, 28, 31)	A	
BRASSICACEAE *Cardamine pratensis* (Pievinė kartenė)	D Auga laukuose, pakelėse, vejose (16, 19)	0,6 (14, 19)	Š = T (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	tamsa stabdo dygimą (18, 19), nereikia specialaus paruošimo (5, 14, 22)	PO (5, 22)	F	

▼M6

ŠEIMA Botaninis rūšies pavadinimas (lietuviškas bendrinis pavadinimas)	Gyvenimo trukmė ir augimvietė (1)	Sėklos masė (mg)	Sudygimui arba augimui reikalinga apšvietimo trukmė (2)	Sėjimo gylis (mm) (3)	Per kiek laiko (parų) sudygsta sėklos (4)	Specialus paruošimas (5)	Toksiškumo bandymas (6)	Sėklų tiekėjai (7)	Kitos nuorodos (8)
CARYOPHYLLACEAE *Lychnis flos-cuculi* (Šilkažiedė gaisrena)	D (16)	0,21 (14)	Š = T (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	sėklas gali reikėti subrandinti (18), nereikia specialaus paruošimo (5, 14, 15, 22–26)	PO (5, 15, 22–26)	F	
CHENOPODIACEAE *Chenopodium album* (Baltoji balanda)	V Auga laukų pakraščiuose, žmogaus veiklos paliestose vietose (16, 19)	0,7–1,5 (14, 19, 34)	Š = T (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	apdorojimas priklauso nuo sėklų spalvos (19), per ramybės periodą sėklos laikomos sausai (19), tamsa stabdo dygimą (1, 18, 19), stratifikavimas šaltyje (18), nereikia specialaus apdorojimo (14, 34)	PRIEŠ IR PO (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE *Hypericum perforatum* (Paprastoji jonažolė)	D Auga laukuose, ariamose dirvose, atvirose augimvietėse (16, 19)	0,1–0,23 (14, 19)	Š= T (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	tamsa stabdo dygimą (1, 18, 19) nereikia specialaus apdorojimo (5, 14, 15, 25, 27)	PO (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE *Ipomoea hederacea* (Gebenlapis sukutis)	V Auga pakelėse, atvirose augimvietėse, javų laukuose (16)	28,2 (14)	Š > T (6, 10)	10–20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	dygimas nepriklauso nuo apšvietos (1) nereikia specialaus apdorojimo (6, 21)	PRIEŠ IR PO (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE *Cyperus rotundus* (Riešutinė viksvuolė)	D Auga ariamose dirvose, ganyklose, pakelėse (16, 30)	0,2 (14)	Š= T (14)	0 (1) 10–20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	tamsa stabdo dygimą (1) nereikia specialaus apdorojimo (6, 10, 14)	PRIEŠ IR PO (6, 28, 31)	B	7
FABACEAE *Lotus corniculatus* (Paprastasis garždenis)	D Auga pievose, pakelėse, atvirose augimvietėse (16, 19)	1–1,67 (14, 19)	Š = T (14)		1 (50 %) (19)	skarifikavimas (14, 19) dygimas nepriklauso nuo apšvietos (18, 19), nereikia specialaus apdorojimo (23, 25)	PO (5, 23, 25)	A, D, E, F	

▼M6

ŠEIMA Botaninis rūšies pavadinimas (lietuviškas bendrinis pavadinimas)	Gyvenimo trukmė ir augimvietė (1)	Sėklos masė (mg)	Sudygimui arba augimui reikalinga apšvietimo trukmė (2)	Sėjimo gylis (mm) (3)	Per kiek laiko (parų) sudygsta sėklos (4)	Specialus paruošimas (5)	Toksiškumo bandymas (6)	Sėklų tiekėjai (7)	Kitos nuorodos (8)
Senna obtusifolia (Bukalapė velniapupė)	V Auga drėgnuose miškuose(16)	23–28 (9)	Š = T (14) Š > T (9)	10–20 (6, 9)		sėklas 24 val. mirkyti vandenyje (9) skarifikavimas (14), sėklų gyvybingumas priklauso nuo spalvos (1), nereikia specialaus apdorojimo (6)	PO (6, 9)	A	
Sesbania exaltata (Agatpupė)	V Auga aliuviniuose dirvožemiuose (16)	11–13 (9, 14)	Š > T (9)	10–20 (9, 21)		sėklas 24 val. mirkyti vandenyje (9) dygimas nepriklauso nuo apšvietos (1), nereikia specialaus apdorojimo (21)	PRIEŠ IR PO (9, 21, 28, 31)	A	
Trifolium pratense (Raudonasis dobilas)	D Auga laukuose, pakelėse, ariamose dirvose (16, 19)	1,4–1,7 (14, 19)	Š = T (14)		1 (50 %) (19)	skarifikavimas (14, 18) sėklas gali reikėti subrandinti (19), dygimas nepriklauso nuo apšvietos (1, 19), nereikia specialaus apdorojimo (5)	PO (5)	A, E, F	
LAMIACEAE *Leonurus cardiaca* (Paprastoji sukatžolė)	D Atvirose vietose (16)	0,75–1,0 (4, 14)	Š = T (14)	0 (4)		nereikia specialaus apdorojimo (4, 14)	PO (4)	F	
Mentha spicata (Šaltmėtė)	D Auga drėgnose vietose (16)	2,21 (4)		0 (4)		nereikia specialaus apdorojimo (4)	PO (4)	F	
Nepeta cataria (Paprastoji katžolė)	D Auga žmogaus veiklos paliestose vietose (16)	0,54 (4, 14)	Š = T (14)	0 (4)		nereikia specialaus apdorojimo (2, 4, 14)	PO (2,4)	F	

▼M6

ŠEIMA Botaninis rūšies pavadinimas (lietuviškas bendrinis pavadinimas)	Gyvenimo trukmė ir augimvietė (1)	Sėklos masė (mg)	Sudygimui arba augimui reikalinga apšvietimo trukmė (2)	Sėjimo gylis (mm) (3)	Per kiek laiko (parų) sudygsta sėklos (4)	Specialus paruošimas (5)	Toksiškumo bandymas (6)	Sėklų tiekėjai (7)	Kitos nuorodos (8)
Prunella vulgaris (Paprastoji juodgalvė)	D Auga ariamose dirvose, pievose, žmogaus veiklos paliestose vietose (16, 19)	0,58–1,2 (4, 14, 19)	Š= T (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	tamsa stabdo dygimą (18, 19) didesnės sėklos geriau sudygsta (1), nereikia specialaus apdorojimo (4, 14, 22)	PO (4, 22)	A, F	
Stachys officinalis (Vaistinė notra)	D Auga pievose, laukų pakraščiuose (19)	14–18 (14, 19)	Š = T (14)		7 (50 %) (19)	nereikia specialaus apdorojimo (5, 14, 22)	PO (5, 22)	F	
MALVACEAE *Abutilón theophrasti* (Pluoštinis galenis)	V Auga laukuose, atvirose augimvietėse (16)	8,8 (14)	Š = T (14)	10–20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	skarifikavimas (14) nereikia specialaus apdorojimo (5, 10, 21)	PRIEŠ IR PO (6, 22, 28, 31)	A, F	
Sida spinosa (Dygioji sida)	V Auga laukuose, pakelėse (16)	3,8 (14)	Š = T (14)	10–20 (6, 21)		skarifikavimas (14) dygimas nepriklauso nuo apšvietos (1), nereikia specialaus apdorojimo (6, 21)	PRIEŠ IR PO (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE *Papaver rhoeas* (Aguona birulė)	V Auga laukuose, ariamose dirvose, žmogaus veiklos paliestose vietose (16, 19)	0,1–0,3 (4, 14, 19, 29)	Š = T (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	stratifikavimas šaltyje ir skarifikavimas (1, 19, 32) nereikia specialaus apdorojimo (4, 14, 29)	PO (4)	A, D, E, F, G	
POACEAE *Agrostis tenuis* (Paprastoji smilga)	Auga vejose, ganyklose (16)	0,07 (14)	Š > T (IO)	20 (10)	10 (62 %) (10)	tamsa stabdo dygimą (1, 17–19), nereikia specialaus apdorojimo (10)	PO (10)	A, E	
Alopecurus myosuroides (Pelinis pašiaušėlis)	V Auga pievose, atvirose augimvietėse (16)	0,9-1,6 (29, 34)	Š = T (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	skarifikavimas (14), apdorojimas 101 mg/L KNO3 (14), stratifikavimas šiltai (1), tamsa stabdo dygimą (1), nereikia specialaus apdorojimo (34)	PRIEŠ IR PO (28, 34)	A	32

▼M6

ŠEIMA Botaninis rūšies pavadinimas (lietuviškas bendrinis pavadinimas)	Gyvenimo trukmė ir augimvietė (1)	Sėklos masė (mg)	Sudygimui arba augimui reikalinga apšvietimo trukmė (2)	Sėjimo gylis (mm) (3)	Per kiek laiko (parų) sudygsta sėklos (4)	Specialus paruošimas (5)	Toksiškumo bandymas (6)	Sėklų tiekėjai (7)	Kitos nuorodos (8)
Avena fatua (Tuščioji aviža)	V Auga dirbamoje žemėje, atvirose augimvietėse (16)	7–37,5 (14, 30)	Š = T (14) Š > T (6)	10–20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	skarifikavimas (7, 32), tamsa stabdo dygimą (1) stratifikavimas šaltyje (1, 18), nereikia specialaus apdorojimo (6, 10, 14)	PRIEŠ IR PO (6, 10, 28, 31)	A	
Bromus tectorum (Smiltyninė dirsė)	V Auga laukuose, pakelėse, ariamose dirvose (16)	0,45–2,28 (14, 29)	Š = T (14)	3 (29)		brandinimo periodas (1, 7, 32), šviesa stabdo dygimą (1), nereikia specialaus apdorojimo (14)	PRIEŠ IR PO (28, 31)	A	
Cynosurus cristatus (Paprastoji kietavarpė)	D Auga laukuose, pakelėse, atvirose augimvietėse (16, 19)	0,5–0,7 (14, 19, 29)	Š = T (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	dygimas nepriklauso nuo apšvietos (19), nereikia specialaus apdorojimo (14, 29)	PO (5)	A	
Digitaria sanguinalis (Raudonoji pirštuotė)	V Auga laukuose, vejose, atvirose augimvietėse (16)	0,52–0,6 (14, 30)	Š = T (14)	10–20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	skarifikavimas, stratifikavimas šaltyje ir brandinimas (1, 7, 14, 32), apdorojimas 101 mg/L KNO3 (14), tamsa stabdo dygimą (1), nereikia specialaus apdorojimo (21)	PRIEŠ IR PO (18, 25, 31)	A	
Echinochloa crusgalli (Paprastoji rietmenė)	V (16)	1,5 (14)	Š = T (14) Š > T (3)	10–20 (7, 21)		skarifikavimas (7, 32), dygimas nepriklauso nuo apšvietos (1), nereikia specialaus apdorojimo (3, 14, 21)	PRIEŠ IR PO (3, 21, 28, 31)	A	
Elymus canadensis (Kanadinis elimas)	D Auga pakrantėse, žmogaus veiklos paliestose vietose (16)	4–5 (14, 30)	Š = T (11)	1 (11)	14–28 (11)	nereikia specialaus apdorojimo (2, 11)	PO (2)	C, D, E	
Festuca pratensis (Tikrasis eraičinas)	D Auga laukuose, drėgnose vietose (16, 19)	1,53–2,2 (16, 19)	Š = T (14) Š > T (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	nereikia specialaus apdorojimo (10, 19)	PO (10)	A	7

▼M6

ŠEIMA Botaninis rūšies pavadinimas (lietuviškas bendrinis pavadinimas)	Gyvenimo trukmė ir augimvietė (1)	Sėklos masė (mg)	Sudygimui arba augimui reikalinga apšvietimo trukmė (2)	Sėjimo gylis (mm) (3)	Per kiek laiko (parų) sudygsta sėklos (4)	Specialus paruošimas (5)	Toksiškumo bandymas (6)	Sėklų tiekėjai (7)	Kitos nuorodos (8)
Hordeum pusillum (Žemasis miežis)	V Auga ganyklose, pakelėse, atvirose augimvietėse (16)	3,28 (14)				stratifikavimas šiltai (1), dygimas nepriklauso nuo apšvietos (1)	PRIEŠ (31)		7
Phleum pratense (Pašarinis motiejukas)	D Auga ganyklose, ariamuose laukuose, žmogaus veiklos paliestose vietose (16, 19)	0,45 (14, 19)	Š > T (10, 14)	0–10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	tamsa stabdo dygimą (19), dygimas nepriklauso nuo apšvietos (17), nereikia specialaus apdorojimo (10, 14, 17, 19)	PO (10)	A, E	
POLYGONACEAE *Polygonum convolvulus* (Vijoklinis rūgtis)	V Auga atvirose augimvietėse, pakelėse (16)	5–8 (4, 14, 29)	Š = T (20)	0–2 (4, 29)		stratifikavimas šaltyje 4–8 savaites (1, 2, 4, 20, 29), dygimas nepriklauso nuo apšvietos (1)	PRIEŠ IR PO 1, 2, 20, 28, 31	A	32
Polygonum lapathifolium (Trumpamakštis rūgtis)	V Auga drėgnuose dirvožemiuose (16)	1,8–2,5 (14)	Š > T (6)		5 (94 %) (18)	dygimas nepriklauso nuo apšvietos (1), tamsa stabdo dygimą (18), stratifikavimas šaltyje (1), nereikia specialaus apdorojimo (5)	PRIEŠ IR PO (6)	A, E	
Polygonum pennsylvanicum (Pensilvaninis rūgtis)	V Auga laukuose, atvirose augimvietėse (16)	3,6–7 (14, 29)		2 (29)		stratifikavimas šaltyje 4 savaites, esant 0–5 °C temperatūrai (1, 29), tamsa stabdo dygimą (1)	PRIEŠ (31)	A, E	
Polygonum periscaria (Dėmėtasis rūgtis)	V Auga žmogaus veiklos paliestose vietose, ariamose dirvose (16, 19)	2,1–2,3 (14, 19)	Š > T (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	skarifikavimas, stratifikavimas šaltyje, apdorojimas giberelinu (14), stratifikavimas šaltyje, brandinimas (17–19), tamsa stabdo dygimą (19), nereikia specialaus apdorojimo (13)	PO (13)	A	32

▼M6

ŠEIMA Botaninis rūšies pavadinimas (lietuviškas bendrinis pavadinimas)	Gyvenimo trukmė ir augimvietė (1)	Sėklos masė (mg)	Sudygimui arba augimui reikalinga apšvietimo trukmė (2)	Sėjimo gylis (mm) (3)	Per kiek laiko (parų) sudygsta sėklos (4)	Specialus paruošimas (5)	Toksiškumo bandymas (6)	Sėklų tiekėjai (7)	Kitos nuorodos (8)
Rumex crispus (Rauktalapė rūgštynė)	D Auga ariamuose laukuose, pakelėse, atvirose vietose (16, 19)	1,3–1,5 (4, 14, 19)	Š = T (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	tamsa stabdo dygimą (18, 19), sėklas gali reikėti subrandinti (18), nereikia specialaus apdorojimo (4, 14, 33)	PO (4, 33)	A, E	32
PRIMULACEAE *Anagallis arvensis* (Raudonžiedis progailis)	V Auga ariamuose laukuose, atvirose ir žmogaus veiklos paliestose vietose (16, 19)	0,4–0,5 (4, 14, 19)	Š = T (14)		1 (50 %) (19)	stratifikavimas šaltyje, apdorojimas giberelinu (1,14, 18, 19, 32), dygimui reikia šviesos (1), nereikia specialaus apdorojimo (2, 4)	PO (2, 4)	A, F	
RANUNCULACEAE *Ranunculus acris* (Aitrusis vėdrynas)	D Auga ariamuose laukuose, pakelėse, atvirose vietose (16, 19)	1,5–2 (14, 19, 29)	Š = T (14)	1 (29)	41–56 (19, 29)	nereikia specialaus apdorojimo (5, 14, 22, 24–26)	PO (5, 22, 24–26)		32
ROSACEAE *Geum urbanum* (Geltonoji žiognagė)	D Auga gyvatvorėse, drėgnose vietose (16, 19)	0,8–1,5 (14, 19)	Š = T (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	tamsa stabdo dygimą (18, 19), stratifikavimas šiltai (1), nereikia specialaus apdorojimo (5, 14, 22, 25, 26)	PO (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE *Galium aparine* (Kibusis lipikas)	V Auga ariamuose laukuose, drėgnose ir žmogaus veiklos paliestose vietose (16, 19)	7–9 (14, 19)	Š = T (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	stratifikavimas šaltyje (1, 18, 19), dygimas nepriklauso nuo apšvietos (18, 19), šviesa stabdo dygimą (1), nereikia specialaus apdorojimo (6, 14)	PRIEŠ IR PO (6, 28)	A	32

▼M6

ŠEIMA Botaninis rūšies pavadinimas (lietuviškas bendrinis pavadinimas)	Gyvenimo trukmė ir augimvietė (1)	Sėklos masė (mg)	Sudygimui arba augimui reikalinga apšvietimo trukmė (2)	Sėjimo gylis (mm) (3)	Per kiek laiko (parų) sudygsta sėklos (4)	Specialus paruošimas (5)	Toksiškumo bandymas (6)	Sėklų tiekėjai (7)	Kitos nuorodos (8)
Galium mollugo (Paprastasis lipikas)	D Auga gyvatvorėse, atvirose vietose (8)	7 (29)	Š = T (14)	2 (29)		nereikia specialaus apdorojimo (5, 14, 22, 24, 26, 29)	PO (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE *Digitalis purpurea* (Paprastoji rusmenė)	Dv, D Auga gyvatvorėse, atvirose vietose (16, 19)	0,1–0,6 (4, 14, 19)	Š = T (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	tamsa stabdo dygimą (1, 17–19), nereikia specialaus apdorojimo (4, 22–26)	PO (4, 22–26)	D, G, F	
Veronica persica (Persinė veronika)	V Auga ariamuose laukuose, atvirose ir žmogaus veiklos paliestose vietose (16, 19)	0,5–0,6 (14, 19)	Š = T (14)	0 (19)	3(19) 5 (96 %) (18)	tamsa stabdo dygimą (18, 19), stratifikavimas šaltyje (18), nereikia specialaus apdorojimo (14)	PRIEŠ IR PO (28)	A	32

(1) V – vienamečiai, Dv – dvimečiai, D – daugiamečiai augalai.
(2) 11,14 ir 33 literatūros šaltiniuose nurodytas sėklų dygimui reikalingas šviesos (Š) ir tamsos (T) santykis. 3, 6, 9, 10, 13 ir 20 literatūros šaltiniuose nurodytos auginimo šiltnamiuose sąlygos.
(3) 0 mm reiškia, kad sėklos pasėtos dirvožemio paviršiuje arba kad sėkloms sudygti reikia šviesos.
(4) Nurodyti skaičiai reiškia, per kiek dienų sudygo atitinkama procentinė sėklų dalis, pagal nurodytą literatūros šaltinį, pvz., per 3 dienas sudygo 50 % sėklų (žr. 19 literatūros šaltinį).
(5) Sėklų brandinimo ir (arba) stratifikavimo trukmė ne visada nurodyta. Temperatūros sąlygos nenurodytos, išskyrus atvejus, kai sėklas reikia apdoroti šaltai, nes atliekant bandymus šiltnamiuose, galimybės reguliuoti temperatūrą yra ribotos. Dauguma sėklų sudygsta ir esant šiltnamiuose įprastam temperatūrų svyravimui.
(6) Nurodyta, ar atitinkamos rūšies augalai per herbicidų toksiškumo augalams bandymą tirti PRIEŠ pasirodant daigams, ar PO daigų pasirodymo virš dirvožemio paviršiaus.
(7) Pateikta sėklas tiekiančių prekybininkų pavyzdžių.
(8) Nurodyti du papildomi literatūros šaltiniai, kuriais remtasi.

▼**M6**

Nurodyti sėklų tiekėjai

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

CITUOTOS NUORODOS

(1) Baskin, C.C. & Baskin, J.M. 1998. Seeds. Academic Press, Toronto

(2) Blackburn, L.G. & Boutin, C. 2003. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-Up®). Ecotoxicology, 12:271-285.

(3) Boutin, C., Lee, H-B., Peart, T., Batchelor, P.S., & Maguire, R.J. 2000. Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Environmental Toxicology & Chemistry, 19(10):2532-2541.

(4) Boutin, C., Elmegaard, N., & Kjaer, C. 2004. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment. Ecotoxicology, 13:349-369.

(5) Breeze, V., Thomas, G., & Butler, R. 1992. Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. Annals of Applied Biology, 121:669-677.

(6) Brown, R.A., & Farmer, D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. In: Plants for toxicity assessment: 2nd volume. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang, & M.A. Lewis, eds. American Society for Testing & Materials, Philadelphia. pp 197 – 208.

▼M6

(7) Buhler, D.D. & Hoffman, M.L. 1999. Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants. Weed Science Society of America, Lawrence, K.

(8) Clapham, A.R., Tutin, T.G., & Warburg, E.F. 1981. Excursion flora of the British Isles, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge

(9) Clay, P.A. & Griffin, J.L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. Weed Science, 48:481-486.

(10) Cole, J.F.H. & Canning, L. 1993. Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. BCPC – Weeds. pp. 151 – 156.

(11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Personal communication. (www.ernstseed.com).

(12) Fletcher, J.S., Johnson, F.L., & McFarlane, J.C. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. Environmental Toxicology & Chemistry, 9:769-776.

(13) Fletcher, J.S., Pfleeger, T.G., Ratsch, H.C., & Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. Environmental Toxicology & Chemistry, 15(7):1189-1196.

(14) Flynn, S., Turner, R.M., and Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgkew.org.uk/-data/sid)

(15) Franzaring, J., Kempenaar, C., & van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. Environmental Pollution, 114:21-28.

(16) Gleason, H.A. & Cronquist, A. 1991. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2nd ed. New York Botanical Garden, Bronx, NY

(17) Grime, J.P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. Annals of Applied Biology, 98:555-558.

(18) Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M., & Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. Journal of Ecology, 69:1017-1059.

(19) Grime, J.P., Hodgson, J.G., & Hunt, R. 1988. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., London

(20) Kjaer, C. 1994. Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (Polygonum convolvulus L.). Weed Research, 34:453-459.

(21) Klingaman, T.E., King, C.A., & Oliver, L.R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. Weed Science, 40:227-232.

(22) Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. Environmental Pollution, 59:71-86.

(23) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. Environmental Pollution, 69:223-235.

(24) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. Environmental Pollution, 73:25-42.

(25) Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., & Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. Agriculture, Ecosystems, & Environment, 45:283-293.

▼**M6**

(26) Marrs, R.H. & Frost, A.J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. Journal of Environmental Management, 50:369-388.

(27) Marshall, E.J.P. & Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. BCPC – Weeds. pp. 1021-1028.

(28) McKelvey, R.A., Wright, J.P., & Honegger, J.L. 2002. A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. Pest Management Science, 58:1161-1174.

(29) Morton, S. (Herbiseed). 2004. Personal communication. (http://www.herbiseed.com)

(30) USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, version 3.5. (http://plants.usda.gov). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA

(31) USEPA. 1999. One-Liner Database. [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].

(32) Webster, R.H. 1979. Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.

(33) White, A. L. & Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Personal communication.

(34) Zwerger, P. & Pestemer, W. 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh., 17:711-718.

▼**M6**

4 priedėlis

Kai kurių rūšių kultūriniams augalams tinkamų auginimo sąlygų pavyzdžiai

Toliau aprašytos sąlygos, kaip nustatyta, tinkamos dešimties rūšių kultūriniams augalams auginti; šiomis gairėmis galima remtis auginimo kamerose bandymams naudojant ir kai kurių kitų rūšių augalus:

anglies dioksido koncentracija: 350 ± 50 ppm;

santykinis drėgnis: 70 ± 5 % šviesos periodais, 90 ± 5 % tamsos periodais;

temperatūra: 25 ± 3 °C dienomis, 20 ± 3 °C naktimis;

apšvietimo trukmė: 16 šviesos ir 8 tamsos valandos, kai vidutinis šviesos bangų ilgis 400–700 nm;

apšvietimas: 350 ± 50 $\mu E/m^2/s$ skaisčio šviesa, matuojant augalinės dangos paviršiuje.

Šios kultūrinių augalų rūšys yra:

— pomidoras (*Solanum lycopersicon*);

— paprastasis agurkas (*Cucumis sativus*);

— sėjamoji salota (*Lactuca sativa*);

— gauruotoji soja (*Glycine max*);

— gūžinis kopūstas (*Brassica oleracea var. capitata*);

— paprastoji morka (*Daucus carota*);

— sėjamoji aviža (*Avena sativa*);

— daugiametė svidrė (*Lolium perenne*);

— paprastasis kukurūzas (*Zea mays*);

— valgomasis svogūnas (*Allium cepa*).

▼M6

C.32. ENCHITRĖJŲ REPRODUKCIJOS BANDYMAS

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 220 (2004). Jis skirtas cheminių medžiagų poveikiui kirmėlių enchitrėjų *Enchytraeus albidus* (Henle, 1873) reprodukcijos našumui dirvožemyje vertinti. Jis daugiausia pagrįstas Vokietijos aplinkos apsaugos agentūros *Umweltbundesamt* sukurtu metodu (1), kuriam patikrinti atliktas tarplaboratorinis bandymas (2). Svarstomos galimybės cheminių medžiagų toksiškumą *Enchytraeidae* šeimos kirmėlėms ir sliekams tikrinti ir kitais metodais (3), (4), (5), (6), (7), (8).

ĮŽANGINĖS PASTABOS

2. Dirvožemyje gyvenančios *Enchytraeus* genties žieduotosios kirmėlės yra ekotoksikologiniams bandymams ekologiškai svarbios rūšys. Nors enchitrėjai dažnai aptinkami tuose pačiuose dirvožemiuose, kuriuose gyvena sliekai, jų taip pat dažnai gausu ir tokių rūšių dirvožemyje, kuriame sliekų nėra. Enchitrėjus galima naudoti tiek bandymams laboratorijoje, tiek bandymams pusiau lauko arba lauko sąlygomis. Daugelio *Enchytraeus* rūšių kirmėles praktiškai nesunku prižiūrėti ir veisti, o jų generacijos laikas kur kas trumpesnis negu sliekų. Todėl reprodukcijos bandymas naudojant enchitrėjus trunka tik 4–6 savaites, o naudojant sliekus (*Eisenia fetida*) – 8 savaites.

3. Svarbiausia informacija apie sausumos enchitrėjų ekologiją ir ekotoksikologiją pateikta literatūroje (9), (10), (11), (12).

BANDYMO PRINCIPAS

4. Suaugę enchitrėjai patiria įvairių bandomosios cheminės medžiagos, kurios įmaišyta į dirbtinį dirvožemį, koncentracijų poveikį. Galima skirti du šio bandymo etapus: a) intervalo nustatymo bandymą, atliekamą tada, kai trūksta informacijos – tokiu atveju po dviejų bandomosios medžiagos poveikio savaičių pagrindinė vertinamoji baigtis yra organizmų gaištamumas; ir b) nustatomąjį reprodukcijos bandymą, per kurį vertinamas bendras vieno motininio gyvūno atsivestų jauniklių skaičius ir motininių gyvūnų išgyvenamumas. Nustatomasis bandymas trunka šešias savaites. Po pirmųjų trijų savaičių suaugusios kirmėlės išimamos ir aprašomi jų sandaros (morfologiniai) pakitimai. Dar po trijų savaičių suskaičiuojami iš suaugusių kirmėlių padėtų kokonų išsiritę palikuonys. Bandomosios cheminės medžiagos paveiktų gyvūnų reprodukcijos našumas palyginamas su kontrolinės grupės arba grupių gyvūnų reprodukcijos našumu siekiant nustatyti: i) nepastebėto poveikio koncentraciją (NOEC) ir (arba) ii) EC_x (pvz., EC_{10}, EC_{50}), pagal regresijos modelį vertinant koncentraciją, kuriai esant reprodukcijos našumas sumažėtų x %. EC_x (pvz., EC_{10}, EC_{50}) vertė turėtų patekti į bandymui pasirinktų koncentracijos verčių intervalą, kad EC_x būtų galima nustatyti interpoliacijos, o ne ekstrapoliacijos būdu.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

5. Pageidautina žinoti bandomosios cheminės medžiagos tirpumą vandenyje, *log* K_{ow}, dirvožemio ir vandens pasiskirstymo koeficientą (žr. šio priedo C.18 arba C.19 skyrių) ir garų slėgį. Patartina turėti papildomos informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos išliekamumą dirvožemyje, kaip antai jos fotolizės ir hidrolizės lygius.

6. Šį bandymo metodą galima taikyti vandenyje tirpioms arba netirpioms cheminėms medžiagoms, tačiau nuo tirpumo vandenyje priklauso bandomosios cheminės medžiagos naudojimo būdas. Šis bandymo metodas netinka lakiosioms cheminėms medžiagoms, pvz., tokioms, kurių Henrio dėsnio konstanta arba oro ir vandens pasiskirstymo koeficientas viršija vienetą, arba cheminėms medžiagoms, kurių garų slėgis 25 °C temperatūroje viršija 0,0133 Pa.

▼M6

BANDYMO TINKAMUMAS

7. Bandymas pripažįstamas tinkamu, jeigu kontrolinės grupės bandiniai atitinka šiuos veiksmingumo kriterijus:

— suaugusių gyvūnų gaištamumas, nustatytas baigus intervalo nustatymo bandymą ir po pirmų trijų reprodukcijos bandymo savaičių, neturėtų viršyti 20 %;

— jeigu, pradedant bandymą, į kiekvieną indą įleista po 10 suaugusių kirmėlių, bandymo pabaigoje kiekviename inde turėtų būti vidutiniškai bent 25 jaunikliai;

— vidutinio jauniklių skaičiaus variacijos koeficientas reprodukcijos bandymo pabaigoje neturėtų viršyti 50 %.

Jeigu bandymas neatitinka šių tinkamumo kriterijų, jį reikėtų nutraukti, nebent įmanoma pagrįstai įrodyti, kodėl verta jį tęsti. Šį pagrindimą reikėtų pateikti bandymo ataskaitoje.

ETALONINĖ CHEMINĖ MEDŽIAGA

8. Bandymai su etalonine chemine medžiaga turėtų būti atliekami reguliariais intervalais arba galbūt per kiekvieną bandymą, siekiant įsitikinti, kad bandomųjų organizmų atsakas laikui bėgant reikšmingai nesikeičia. Tinkama etaloninė cheminė medžiaga yra karbendazimas, kurio poveikis enchitrėjų išgyvenimui ir reprodukcijai įrodytas (13), (14); galima naudoti ir kitas chemines medžiagas, kurių toksiškumo duomenys yra gerai žinomi. Per tarplaboratorinį bandymą naudotas karbendazimo preparatas (prekės pavadinimas – *Derosal*™), kurį tiekia Frankfurte (Vokietija) įsikūrusi įmonė „AgrEvo“ ir kuriame yra 360 g/l (32,18 %) veikliosios medžiagos (2). Per tarplaboratorinį bandymą nustatyta šios medžiagos poveikio reprodukcijai EC_{50} vertė yra 1,2 ± 0,8 mg veikliosios medžiagos vienam sausosios medžiagos masės kilogramui (2). Jei per bandymų seriją naudojamas teigiamas toksiškumo etalonas, pasirenkama viena koncentracija, o kartotinių bandinių turėtų būti tiek pat, kiek ir kontrolinėse grupėse. Kaip etaloninę medžiagą pasirinkus karbendazimą, patartina bandymui naudoti 1,2 mg veikliosios medžiagos vienam sausosios medžiagos masės kilogramui (kai bandymas atliekamas su skystu preparatu).

BANDYMO APRAŠYMAS

Įranga

9. Bandymui naudojami indai turėtų būti pagaminti iš stiklo ar kitos chemiškai inertinės medžiagos. Tinka stiklainiai (pvz., 0,20–0,25 l tūrio ir ≈ 6 cm skersmens). Indų dangčiai turėtų būti perregimi (pvz., iš stiklo ar polietileno) ir tokie, kad per juos kuo mažiau garuotų vanduo, tačiau vyktų pakankama dujų apykaita tarp dirvožemio ir atmosferos oro. Dangčiai turėtų būti skaidrūs ir praleisti šviesą.

10. Bandymui reikalinga įprasta laboratorinė įranga, visų pirma:

— džiovinimo spinta;

— stereomikroskopas;

— pH matuoklis ir fotometras;

— tinkamos tikslios svarstyklės;

— tinkama temperatūros kontrolės įranga;

— tinkama drėgmės kontrolės įranga (nebūtinai, jeigu bandomosios medžiagos poveikis tiriamas induose su dangčiais);

— inkubatorius arba maža patalpa su oro kondicionieriumi;

— pincetai, vąšeliai arba instrumentai su kilpelėmis gale;

— fotografijų ryškinimo vonelė.

Dirbtinio dirvožemio paruošimas

11. Šiam bandymui naudojamas dirbtinis dirvožemis (5), (7), kurio sudėtis yra tokia (nurodyta sausosios medžiagos, išdžiovintos iki pastovios masės 105 °C temperatūroje, mase):

▼M6

— 10 % kiminų durpių, ore išdžiovintų ir smulkiai sumaltų (tinkamas dalelių dydis yra 2 ± 1 mm); prieš naudojant bandymui dirvožemį, į kurį dėta durpių iš naujo paketo, patartina įsitikinti, kad jis tinka kirmėlėms auginti;

— 20 % kaolino molio (patartina, kad kaolinito jame būtų daugiau kaip 30 %);

— apie 0,3–1,0 % kalcio karbonato (analiziškai grynų $CaCO_3$ miltelių), kad būtų gautas 6,0 ± 0,5 pH; dedamo kalcio karbonato kiekis gali daugiausia priklausyti nuo durpių kokybės ir (arba) rūšies;

— apie 70 % ore išdžiovinto kvarcinio smėlio (priklausomai nuo reikiamo $CaCO_3$ kiekio), daugiausia smulkaus, kad daugiau kaip 50 % dalelių jame būtų 50–200 μm dydžio.

Prieš naudojant dirvožemį nustatomajam bandymui, patartina įsitikinti, kad dirbtinis dirvožemis yra tinkamas kirmėlėms auginti ir atitinka bandymo tinkamumo kriterijus. Ypač patartina įsitikinti, kad bandymo eiga nebūtų sutrikdyta sumažinus organinės anglies kiekį dirbtiniame dirvožemyje, pvz., iki 4–5 % sumažinus durpių kiekį ir atitinkamai padidinus smėlio kiekį. Taip mažinant organinės anglies kiekį, galima sumažinti tikimybę, kad bandomoji cheminė medžiaga įsigers į dirvožemį (dėl jame esančios organinės anglies), ir padidinti kirmėlėms prieinamą bandomosios cheminės medžiagos kiekį. Įrodyta, kad *Enchytraeus albidus* gali atitikti reprodukcijai taikomus bandymo tinkamumo kriterijus, bandymui naudojant iš lauko paimtą dirvožemį su mažesniu, negu nurodyta, organinės anglies kiekiu, pvz., 2,7 % (15), taip pat yra (nors ir ribotos) patirties, kad tai įmanoma pasiekti ir naudojant dirbtinį dirvožemį su 5 % durpių.

Pastaba. Naudojant natūralų dirvožemį papildomiems (pvz., aukštesnės pakopos) bandymams, taip pat reikėtų įrodyti tokio dirvožemio tinkamumą ir atitiktį bandymo tinkamumo kriterijams.

12. Sausos dirvožemio sudedamosios dalys kruopščiai sumaišomos (pvz., dideliame laboratoriniame maišytuve). Reikėtų tai padaryti likus bent savaitei iki bandymo pradžios. Sumaišytą dirvožemį reikėtų palaikyti dvi dienas, kad nusistovėtų (stabilizuotųsi) rūgštingumas; tinkamai pH vertei nustatyti naudojamas dirvožemio ir 1 M kalio chlorido (KCl) arba 0,01 M kalcio chlorido ($CaCl_2$) tirpalas (santykiu 1:5), žr. (16) ir 3 priedėlį. Jeigu dirvožemio rūgštumas viršija tinkamą intervalą (žr. 11 skirsnį), jį galima pakoreguoti įdedant reikiamą $CaCO_3$ kiekį. Jeigu dirvožemis yra pernelyg kalkingas, jį galima pataisyti įdedant daugiau 11 skirsnyje nurodyto mišinio, tačiau nededant $CaCO_3$.

13. Dirbtinio dirvožemio didžiausias vandens įmirkis nustatomas pagal 2 priedėlyje aprašytas procedūras. Iki bandymo pradžios likus vienai ar dviem dienoms, sausas dirbtinis dirvožemis iš pradžių sudrėkinamas įpilant pakankamai dejonizuoto vandens, kad jame būtų maždaug pusė galutinio vandens kiekio (40–60 % didžiausio vandens įmirkio). Taip iš anksto sudrėkintas dirvožemis pradedant bandymą išskirstomas į tiek dalių, kiek koncentracijų pasirinkta (įskaitant, kai tinka, etaloninę cheminę medžiagą) ir kiek kontrolinių bandinių naudojama bandymui. Dirvožemio drėgnis patikslinamas iki 40–60 % didžiausio vandens įmirkio, įpilant bandomosios cheminės medžiagos tirpalo ir (arba) papildomai įpilant distiliuoto ar dejonizuoto vandens (žr. 19–21 skirsnius). Drėgnis nustatomas pradedant ir baigiant

▼M6

bandymą (išdžiovinant dirvožemį iki pastovios masės 105 °C temperatūroje) ir turėtų būti optimalus, kad jame išgyventų kirmėlės. Dirvožemio drėgnį galima apytikriai nustatyti nestipriai suspaudus saujoje šiek tiek dirvožemio – jei drėgnis yra tinkamas, tarp pirštų turėtų pasirodyti smulkių vandens lašelių.

Bandomųjų gyvūnų atranka ir paruošimas

14. Bandymams rekomenduojama naudoti rūšis yra *Enchytraeus albidus* (Henle, 1837) – baltasis enchitrėjas, priklausantis *Enchytraeidae* šeimai (*Oligochaeta* būrys, *Annelida* tipas). *E. albidus* rūšies enchitrėjai yra vieni stambiausių – yra rašytinių duomenų apie iki 35 mm ilgio užaugančius egzempliorius (17), (18). *E. albidus* yra paplitę visame pasaulyje, gyvena jūrų, gėlo vandens ir sausumos buveinėse, daugiausia pūvančiose organinėse medžiagose (jūrų dumbliuose, komposte), taip pat (retai) pievose (9). Šios kirmėlės pakenčia labai įvairias ekologines sąlygas ir iš tam tikrų jų sandaros (morfologinių) pakitimų galima spręsti, kad esama kelių šios rūšies porūšių.

15. *E. albidus* kirmėlėmis prekiaujama rinkoje kaip žuvų pašaru. Reikėtų patikrinti, ar jų kultūra nėra užkrėsta kitų, paprastai smulkesnių, rūšių organizmais (1), (19). Aptikus užkratą, visas kirmėles reikėtų nuplauti vandeniu Petri lėkštelėje. Tada (naudojant stereomikroskopą) reikėtų išrinkti didelius suaugusius *E. albidus* individus, kurie bus naudojami naujai kultūrai pradėti, o visas likusias kirmėles pašalinti. *E. albidus* galima lengvai veisti naudojant labai įvairias organines medžiagas (žr. 4 priedėlį). *E. albidus* gyvenimo ciklas yra trumpas, nes šios kirmėlės subręsta per laiko tarpą nuo 33 dienų (18 °C temperatūroje) iki 74 dienų (12 °C temperatūroje) (1). Bandymui naudojamos tik tokios kultūros, kurios be jokių problemų laikytos laboratorijoje bent 5 savaites (vieną generacijos ciklą).

16. Tinka ir kitos *Enchytraeus* genties rūšys, pvz., *E. buchholzi* (Vejdovsky, 1879) arba *E. crypticus* (Westheide ir Graefe, 1992) (žr. 5 priedėlį). Jeigu naudojamos kitos *Enchytraeus* rūšys, būtina aiškiai jas identifikuoti ir ataskaitoje nurodyti jų pasirinkimo priežastį.

17. Bandymams naudojamos suaugusios kirmėlės. Jų kliteliumo vietoje turėtų būti kiaušinėlių (baltų taškų) ir jos visos turėtų būti maždaug vienodo dydžio (apie 1 cm ilgio). Jų veisimo kultūros sinchronizuoti nebūtina.

18. Jeigu enchitrėjai nėra auginami tos pačios rūšies dirvožemyje ir tokiomis pačiomis (be kita ko, šėrimo) sąlygomis, kokiomis jie bus naudojami galutiniam bandymui, juos būtina aklimatizuoti bent 24 valandas, o ilgiausiai iki trijų dienų. Iš pradžių reikėtų aklimatizuoti daugiau suaugusių kirmėlių, negu reikia bandymui atlikti, kad būtų galima pašalinti pažeistus ar dėl kitų priežasčių bandymui netinkamus individus. Po aklimatizacijos periodo bandymui atrenkamos tik tos kirmėlės, kurios turi kiaušinėlių ir elgiasi įprastai (pvz., nebando išlįsti iš dirvožemio). Kirmėlės atsargiai išimamos naudojant juvelyrinį pincetą, vąšelį arba instrumentą su kilpelėmis gale ir įdedamos į Petri lėkštelę, kurioje yra įpilta truputį gėlo vandens. Geriausia naudoti regeneruotą gėlą vandenį, kaip pasiūlyta šio priedo C.20 skyriuje (*Daphnia magna* reprodukcijos bandymas), nes kirmėlėms gali pakenkti dejonizuotas, demineralizuotas ar vandentiekio vanduo. Kirmėlės patikrinamos apžiūrint per stereomikroskopą, neturinčios kiaušinėlių pašalinamos. Kruopščiai išimamos ir pašalinamos bet kokios erkės ar kolembolos, kuriomis gali būti užkrėstos auginamos kultūros. Sveikos kirmėlės, kurios nebus naudojamos bandymui, grąžinamos į pradinę kultūrą.

▼M6

Bandymui pasirinktų koncentracijų terpių ruošimas

Vandenyje tirpi bandomoji cheminė medžiaga

19. Bandomosios cheminės medžiagos tirpalo dejonizuotame vandenyje paruošiama tiek, kad jo pakaktų visiems vienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotiniams bandiniams. Patartina naudoti tinkamą vandens kiekį reikiamam drėgniui, t. y. 40–60 % didžiausio vandens įmirkio, pasiekti (žr. 13 skirsnį). Kiekvienas bandomosios cheminės medžiagos tirpalas prieš dedant į bandymo indą gerai sumaišomas su viena iš anksto sudrėkinto dirvožemio porcija.

Vandenyje netirpi bandomoji cheminė medžiaga

20. Bandomąsias chemines medžiagas, kurios yra netirpios vandenyje, tačiau tirpios organiniuose tirpikliuose, galima ištirpinti minimaliame tinkamo nešiklio (pvz., acetono) kiekyje. Reikėtų naudoti tik lakiuosius tirpiklius. Nešiklis užpurškiamas ant nedidelio smulkaus kvarcinio smėlio kiekio, pvz., 2,5 g, arba su juo sumaišomas, tada pašalinamas bent vieną valandą garinant po traukos gaubtu. Taip gautas kvarcinio smėlio ir bandomosios cheminės medžiagos mišinys įberiamas į iš anksto sudrėkintą dirvožemį ir kruopščiai su juo sumaišomas įpylus reikiamą dejonizuoto vandens kiekį, kad dirvožemio drėgnis būtų tinkamas. Gautas mišinys sudedamas į bandymo indus.

21. Kai cheminės medžiagos yra mažai tirpios vandenyje ir organiniuose tirpikliuose, kiekvienam bandymo indui imama po 2,5 g smulkiai sumalto kvarcinio smėlio, kuris sumaišomas su tinkamu bandomosios cheminės medžiagos kiekiu, kad būtų gauta bandymui reikiama jos koncentracija. Šis kvarcinio smėlio ir bandomosios cheminės medžiagos mišinys įberiamas į iš anksto sudrėkintą dirvožemį ir kruopščiai su juo sumaišomas įpylus reikiamą dejonizuoto vandens kiekį, kad dirvožemio drėgnis būtų tinkamas. Gautas mišinys išskirstomas į bandymo indus. Ta pati procedūra kartojama ruošiant kiekvienos koncentracijos bandinius, taip pat paruošiama tinkama kontrolinių bandinių grupė.

22. Bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos paprastai neturėtų viršyti 1 000 mg vienam sausosios dirvožemio medžiagos masės kilogramui, tačiau konkretaus bandymo tikslais gali reikėti rinktis ir didesnes koncentracijos vertes.

BANDYMŲ EIGA

Bandomosios ir kontrolinės grupės

23. Į kiekvienos bandomosios koncentracijos indus dedamas bandymui paruošto dirvožemio kiekis, atitinkantis 20 g sausosios medžiagos masės (žr. 19–21 skirsnius). Taip pat paruošiami kontroliniai bandiniai be bandomosios cheminės medžiagos. Į kiekvieną indą įdedama pašaro 29 skirsnyje aprašyta tvarka. Tada į kiekvieną bandymo indą įdedama po dešimt atsitiktine tvarka atrinktų kirmėlių. Kirmėlės atsargiai perkeliamos į kiekvieną bandymo indą ir padedamos dirvožemio paviršiuje naudojant, pvz., juvelyrinį pincetą, vąšelį arba instrumentą su kilpelėmis gale. Kartotinių kiekvienos bandymo koncentracijos ir kontrolinės grupės bandinių kiekis priklauso nuo pasirinkto bandymo plano (žr. 34 skirsnį). Bandymo indai atsitiktine tvarka sustatomi į bandymui skirtą inkubatorių ir kas savaitę, taip pat atsitiktine tvarka, sukeičiami vietomis.

24. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga dedama į bandinius naudojant nešiklį, kartu su bandymo indų serija reikėtų paruošti vieną kontrolinių bandinių seriją su kvarciniu smėliu, kuris būtų apipurkštas tirpikliu arba su juo sumaišytas. Naudojamo tirpiklio arba dispergento koncentracija turėtų būti tokia pati, kaip ir bandymo induose, į kuriuos dėta bandomosios cheminės medžiagos. Kontrolinių bandinių, į kuriuos papildomai dedama kvarcinio smėlio (po 2,5 g į kiekvieną indą), seriją reikėtų paruošti tais atvejais, kai bandomosios cheminės medžiagos turi būti naudojamos 21 skirsnyje aprašyta tvarka.

▼M6

Bandymo sąlygos

25. Bandymas atliekamas 20 ± 2 °C temperatūroje. Kad kirmėlės nebandytų iššliaužti iš dirvožemio, atliekant bandymą reguliuojamas šviesos ir tamsos ciklas (geriausia, kad būtų 16 val. šviesos ir 8 val. tamsos) ir palaikomas bandymo indų apšvietimas 400–800 lx šviesa.

26. Siekiant patikrinti dirvožemio drėgnį, indai pasveriami bandymo pradžioje ir vėliau sveriami kartą per savaitę. Trūkstama masė papildoma įpilant reikiamą dejonizuoto vandens kiekį. Pažymėtina, kad vandens netekimą galima sulėtinti palaikant didelį oro drėgnį (> 80 %) bandymo inkubatoriuje.

27. Drėgnį ir pH reikėtų išmatuoti pradedant ir baigiant tiek intervalo nustatymo bandymą, tiek nustatomąjį bandymą. Matavimus reikėtų atlikti kontroliniuose ir apdorotuose bandomąja medžiaga (visų koncentracijų) dirvožemio ėminiuose, paruoštuose ir prižiūrimuose taip pat, kaip ir bandomųjų kultūrų indai, tik be kirmėlių. Į šiuos dirvožemio ėminius pašaro reikėtų dėti tik bandymo pradžioje, siekiant paskatinti mikroorganizmų aktyvumą. Pašaro turėtų būti dedama tiek pat, kiek jo reikia bandomųjų kultūrų kirmėlėms šerti, tačiau per bandymą papildomo pašaro į šiuos indus dėti nereikia.

Šėrimas

28. Galima naudoti enchitrėjų populiacijai palaikyti tinkamą pašarą. Nustatyta, kad pašarui tinka avižiniai dribsniai; prieš naudojant patartina juos apdoroti autoklave, kad būtų išvengta užkrėtimo mikroorganizmais (taip pat galima juos pakaitinti).

29. Pašaro dedant pirmą kartą, 50 mg sumaltų avižinių dribsnių sumaišoma su dirvožemiu kiekviename inde, prieš įleidžiant kirmėles. Vėliau pašaro papildomai dedama kas savaitę iki 21 bandymo dienos. 28 bandymo dieną pašaro nededama, nes tuo metu reikia išimti suaugusius individus, o jauniklėms kirmėlėms papildomo pašaro vėliau reikia gana nedaug. Šeriant kirmėles bandymo metu, po 25 mg sumaltų avižinių dribsnių įdedama į kiekvieną indą ir atsargiai paberiama dirvožemio paviršiuje, stengiantis nesužeisti kirmėlių. Kad mažiau augtų grybeliai, avižinius dribsnius reikėtų įmaišyti į dirvožemį, ant jų užberiant nedidelį dirvožemio kiekį. Jei lieka nesuvartoto pašaro, jo davinį reikėtų sumažinti.

Intervalo nustatymo bandymo planas

30. Kai reikia, atliekamas intervalo nustatymo bandymas pasirinkus, pvz., penkias bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas – 0,1, 1,0, 10, 100 ir 1 000 mg vienam sausosios dirvožemio medžiagos masės kilogramui. Kiekvienoje bandomojoje ir kontrolinėje grupėje pakanka paruošti po vieną kartotinį bandinį.

31. Intervalo nustatymo bandymas trunka dvi savaites. Baigiant bandymą įvertinamas kirmėlių gaištamumas. Kirmėlė registruojama kaip negyva, jeigu nereaguoja į mechaninį dirgiklį priekinėje kūno dalyje. Sprendžiant, koks turėtų būti nustatomojo bandymo koncentracijos verčių intervalas, gali būti naudinga remtis ir papildoma informacija apie gaištamumą. Todėl taip pat reikėtų aprašyti suaugusių kirmėlių elgsenos pokyčius (pvz., jeigu kirmėlės nesugeba įsirausti į dirvožemį arba nejudėdamos guli prisišliejusios prie stiklinės bandymo indo sienos), morfologinius pokyčius (pvz., ar nėra atvirų žaizdų) ir ar yra jauniklių. Jauniklių buvimą galima nustatyti taikant 6 priedėlyje aprašytą dažymo metodą.

32. LC_{50} galima apytikriai nustatyti apskaičiuojant gaištamumo duomenų geometrinį vidurkį. Parenkant koncentracijos verčių intervalą nustatomajam bandymui, poveikis reprodukcijai laikomas iki 10 kartų mažesniu negu LC_{50}. Tačiau tai empirinis santykis, kuris kiekvienu konkrečiu atveju gali būti skirtingas. Per intervalo nustatymo bandymą užrašytos papildomos

▼M6

pastabos, kaip antai dėl jauniklių buvimo, gali padėti patikslinti bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų intervalą, kuris bus naudojamas per nustatomąjį bandymą.

33. Siekiant tiksliai nustatyti LC_{50}, rekomenduojama atliekant bandymą naudoti bent po keturis kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kartotinius bandinius ir parinkti tinkamą koncentracijų skaičių, kad būtų gauti mažiausiai keturi statistiškai pakankamai skirtingi vidutiniai atsakai į tų koncentracijų poveikį. Kai tinka, tiek pat koncentracijos verčių ir kartotinių bandinių naudojama kontrolinėse grupėse.

Nustatomojo reprodukcijos bandymo planas

34. Remiantis rekomendacijomis, pateiktomis atlikus tarplaboratorinį bandymą, siūlomi trys bandymo planai (2):

— nustatant NOEC, reikėtų bandymui rinktis bent penkias koncentracijos vertes, išdėstytas geometrine progresija. Rekomenduojama paruošti po keturis kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotinius bandinius ir dar aštuonis kontrolinius bandinius. Koncentracijos vertės turėtų skirtis pastoviu santykiu, neviršijančiu 1,8;

— nustatant EC_x (pvz., EC_{10}, EC_{50}), reikėtų bandymui rinktis mažiausiai penkias koncentracijas ir EC_x turėtų patekti į tų koncentracijų intervalą, kad EC_x vertę būtų galima nustatyti interpoliacijos, o ne ekstrapoliacijos būdu. Rekomenduojama paruošti bent po keturis kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotinius bandinius ir keturis kontrolinius kartotinius bandinius. Koncentracijos gali skirtis įvairiu santykiu, kuris, pvz., gali būti mažesnis ar lygus 1,8 tikėtino poveikio intervale arba viršyti 1,8, esant didesnėms arba mažesnėms koncentracijoms;

— NOEC ir EC_x galima kartu nustatyti pagal kombinuotą metodą. Pagal jį turėtų būti aštuonios bandomosios medžiagos koncentracijos, išdėstytos geometrine progresija. Rekomenduojama paruošti po keturis kiekvienos koncentracijos kartotinius bandinius, taip pat aštuonis kontrolinius bandinius. Pasirinktos koncentracijos vertės turėtų skirtis pastoviu santykiu, neviršijančiu 1,8.

35. Kiekviename bandymo inde turėtų būti dešimt suaugusių kirmėlių (žr. 23 skirsnį). Į bandymo indus dedama pašaro pradedant bandymą ir vėliau kartą per savaitę (žr. 29 skirsnį) iki 21 bandymo dienos imtinai. 21 dieną dirvožemio ėminiai kruopščiai apieškomi rankomis, gyvos suaugusios kirmėlės apžiūrimos ir suskaičiuojamos, aprašomi jų elgsenos pokyčiai (pvz., kirmėlės neįstengia įsirausti į dirvožemį ar nejudėdamos guli prisišliejusios prie stiklinės bandymo indo sienos) ir morfologiniai pokyčiai (pvz., ar yra atvirų žaizdų). Tada visos suaugusios kirmėlės išimamos iš bandymo indų ir bandymui naudoto dirvožemio. Bandymui naudotas dirvožemis su visais kirmėlių padėtais kokonais dar tris savaites inkubuojamas tomis pačiomis bandymo sąlygomis, tačiau pašaro dedama tik 35 bandymo dieną (t. y. į kiekvieną indą įdedama po 25 mg maltų avižinių dribsnių).

36. Po šešių savaičių suskaičiuojamos iš kiaušinėlių naujai išsiritusios kirmėlės. Rekomenduojama rinktis dažymo Bengalijos rožiniu (žr. 6 priedėlį) dažikliu pagrįstą metodą, nors įrodyta, kad tinka ir kiti surinkimo šlapiuoju būdu (bet nekaitinant) ir flotacijos (išplukdymo) metodai (4), (10), (11), (20). Dažymo Bengalijos rožiniu dažikliu metodą patartina rinktis todėl, kad kirmėlių surinkimą iš dirvožemio substrato šlapiuoju būdu gali apsunkinti drumstumas dėl suspenduotų molio dalelių.

Ribų nustatymo bandymas

37. Jeigu per intervalo nustatymo bandymą nenustatoma jokio bandomosios medžiagos poveikio esant didžiausiai jos koncentracijai (t. y. 1 000 mg/kg), reprodukcijos bandymą galima atlikti kaip ribinį (ribų nustatymo bandymą, naudojant 1 000 mg/kg koncentraciją, siekiant įrodyti, kad poveikio reprodukcijai NOEC viršija šią vertę.

▼M6

Bandymo santrauka ir tvarkaraštis

38. Bandymo etapus galima apibendrinti taip:

Laikas	Intervalo nustatymo bandymas	Nustatomasis bandymas
Likus 7 ar daugiau dienų iki bandymo	— Paruoškite dirbtinį dirvožemį (sumaišykite sausas sudedamąsias dalis)	— Paruoškite dirbtinį dirvožemį (sumaišykite sausas sudedamąsias dalis)
Likus 5 dienoms iki bandymo	— Patikrinkite dirbtinio dirvožemio pH — Išmatuokite didžiausią dirvožemio vandens įmirkį	— Patikrinkite dirbtinio dirvožemio pH — Išmatuokite didžiausią dirvožemio vandens įmirkį
Likus 5–3 dienoms iki bandymo	— Atrinkite kirmėles aklimatizacijos periodui	— Atrinkite kirmėles aklimatizacijos periodui
3–0 dienos iki bandymo	— Aklimatizuokite kirmėles bent 24 valandas	— Aklimatizuokite kirmėles bent 24 valandas
1 diena iki bandymo	— Dirbtinį dirvožemį iš anksto sudrėkinkite ir padalykite į porcijas	— Dirbtinį dirvožemį iš anksto sudrėkinkite ir padalykite į porcijas
0 diena	— Paruoškite pradinius tirpalus — Apdorokite bandomąja chemine medžiaga — Sudėkite bandymo substratą į bandymo indus ir juose pasverkite — Įmaišykite pašaro — Įleiskite kirmėles — Išmatuokite dirvožemio pH ir drėgnį	— Paruoškite pradinius tirpalus — Apdorokite bandomąja chemine medžiaga — Sudėkite bandymo substratą į bandymo indus ir juose pasverkite — Įmaišykite pašaro — Įleiskite kirmėles — Išmatuokite dirvožemio pH ir drėgnį
7 diena	— Patikrinkite dirvožemio drėgnį	— Patikrinkite dirvožemio drėgnį — Įdėkite pašaro
14 diena	— Nustatykite suaugusių kirmėlių gaištamumą — Įvertinkite jauniklių skaičių — Išmatuokite dirvožemio pH ir drėgnį	— Patikrinkite dirvožemio drėgnį — Įdėkite pašaro
21 diena		— Stebėkite suaugusių kirmėlių elgesį — Išimkite suaugusias kirmėles — Nustatykite suaugusių kirmėlių gaištamumą — Patikrinkite dirvožemio drėgnį — Įdėkite pašaro
28 diena		— Patikrinkite dirvožemio drėgnį — Pašaro nedėkite
35 diena		— Patikrinkite dirvožemio drėgnį — Įdėkite pašaro
42 diena		— Suskaičiuokite jaunikles kirmėles — Išmatuokite dirvožemio pH ir drėgnį

▼M6

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų tvarkymas

39. Neskaitant 7 priedėlyje pateiktos apžvalgos, pagal šį bandymo metodą konkrečiai nenurodoma, kaip reikėtų atlikti statistinę bandymo rezultatų analizę.

40. Intervalo nustatymo bandymo pagrindinė vertinamoji baigtis yra bandomųjų gyvūnų gaištamumas. Tačiau taip pat reikėtų aprašyti suaugusių kirmėlių elgesio pokyčius (pvz., kirmėlės neįstengia įsirausti į dirvožemį arba nejudėdamos guli prisišliejusios prie stiklinės bandymo indo sienos), morfologinius pokyčius (pvz., atviras žaizdas) ir ar yra jauniklių. Nustatant LC_{50} paprastai reikėtų atlikti probito analizę (21) arba logistinę regresinę analizę. Tačiau tais atvejais, kai šis analizės metodas netinka (pvz., jeigu yra mažiau nei trys koncentracijos, kurioms esant dalis gyvūnų žūsta), galima taikyti alternatyvius metodus: tai gali būti slankiųjų vidurkių metodas (22), sutrumpintas Spearman-Karber metodas (23) arba paprastoji interpoliacija (pvz., LC_0 ir LC_{100} geometrinis vidurkis apskaičiuojamas LC_0 kvadratinę šaknį dauginant iš LC_{100}).

41. Nustatomojo bandymo vertinamoji baigtis yra kirmėlių vislumas (t. y. atvestų jauniklių skaičius), tačiau šio bandymo, kaip ir intervalo nustatymo bandymo, galutinėje ataskaitoje reikėtų aprašyti ir visus kitus kenksmingo poveikio kirmėlėms požymius. Atliekant statistinę analizę būtina apskaičiuoti kiekvienos bandomosios ir kontrolinės grupės reprodukcijos aritmetinį vidurkį ir standartinį nuokrypį.

42. Atlikus dispersinę analizę, standartinį nuokrypį *s* ir laisvės laipsnius *df* galima pakeisti suminiu dispersijos įverčiu, gautu taikant ANOVA metodą, ir, atitinkamai, jo laisvės laipsnius, jeigu dispersija nepriklauso nuo koncentracijos. Tokiu atveju naudokite bendras kontrolinių ir bandomųjų grupių dispersijos vertes. Šios vertės paprastai apskaičiuojamos naudojant komercinę statistikos programinę įrangą, kiekvieno indo rezultatus naudojant kaip kartotinio bandinio rezultatus. Jeigu atrodo, kad galima pagrįstai sujungti neigiamų ir tirpiklio kontrolinių bandinių duomenis, užuot testams naudojus tik kuriuos nors iš jų, reikėtų testais nustatyti, kad tarp jų nėra reikšmingo skirtumo (dėl tinkamų testų žr. 45 skirsnį ir 7 priedėlį).

43. Tolesni statistiniai testai ir išvados priklauso nuo to, ar kartotinių bandinių vertės sudaro normalųjį skirstinį ir ar jų dispersija yra vienalytė.

NOEC vertinimas

44. Turėtų būti taikomi patikimi statistiniai kriterijai. Reikėtų naudoti, pvz., iš ankstesnės tarplaboratorinių bandymų patirties arba kitų ankstesnių duomenų gautą informaciją apie tai, ar duomenys maždaug sudaro normalųjį skirstinį. Labiau lemiamą reikšmę turi dispersijos vienalytiškumas (homoskedastija). Iš patirties žinoma, kad dispersija dažnai didėja, didėjant vidurkiui. Šiais atvejais duomenų transformavimas gali lemti homoskedastiją. Tačiau toks transformavimas turėtų būti pagrįstas ankstesnių duomenų tvarkymo patirtimi, o ne tiriamais duomenimis. Turint vienalyčius duomenis, reikėtų taikyti kelis *t* kriterijus, kaip antai Williams kriterijų ($\alpha = 0{,}05$, vienpusis) (24), (25) arba, kai kuriais atvejais, Dunnett kriterijų (26), (27). Pažymėtina, kad netolygios replikacijos atveju lentelėje nurodytas *t* vertes būtina pataisyti, kaip tai siūlo Dunnett ir Williams. Kartais dėl didelės variacijos atsakai didėja arba mažėja netolygiai. Šiuo atveju, jeigu labai nukrypta nuo monotoniškumo, labiau tinka taikyti Dunnett kriterijų. Jeigu nukrypstama nuo homoskedastijos, gali būti pagrįsta atidžiau ištirti galimą poveikį dispersijoms siekiant nuspręsti, ar taikant *t* kriterijus per daug nesumažėtų patikimumas (28). Kitu atveju galima taikyti daugybinį U kriterijų, pvz., Bonferroni U kriterijų pagal Holm (29), arba, kai šiems duomenims būdinga heteroskedastija, tačiau kitais atžvilgiais jie atitinka esamą monotonišką dozės ir

▼M6

atsako santykį, – bet kokį kitą neparametrinį kriterijų [pvz., Jonckheere-Terpstra (30), (31) arba Shirley (32), (33)], ir apskritai jam teiktina pirmenybė prieš nelygios dispersijos *t* kriterijus (taip pat žr. 7 priedėlyje pateiktą schemą).

45. Jeigu atliktas ribų nustatymo bandymas ir tenkinamos parametrinio kriterijaus procedūrų taikymo (normalumo, vienalytiškumo) sąlygos, galima taikyti porinį Student *t* kriterijų arba, kitu atveju, U kriterijaus procedūrą pagal Mann ir Whitney (29).

ECx vertinimas

46. Apskaičiuojant bet kokią EC_x vertę, kiekvienos bandomosios grupės vidurkiai naudojami atliekant (tiesinės arba netiesinės) regresijos analizę po to, kai gaunama tinkama dozės ir atsako santykio funkcija. Siekiant gauti kirmėlių augimą kaip nenutrūkstamą atsaką, EC_x- vertes galima nustatyti atliekant tinkamą regresinę analizę (35). Tarp dvireikšmiams kintamiesiems (gaištamumas arba išgyvenimas ir atsivestų jauniklių skaičius) tinkamų funkcijų yra įprastos sigmoidinės, logistinės arba Weibull funkcijos su dviem ar keturiais parametrais, iš kurių kai kurie gali taip pat sudaryti hormetinius atsakus. Jeigu dozės ir atsako funkcija buvo pritaikyta atlikus tiesinės regresijos analizę, prieš vertinant EC_x, kartu su regresine analize turėtų būti nustatytas reikšmingas r^2 (determinacijos koeficiento) dydis ir (arba) nuolydis, įrašant x % atitinkančią kontrolinės grupės vidurkio vertę į lygtį, sudarytą atlikus regresinę analizę. 95 % pasikliovimo ribos apskaičiuojamos pagal Fieller (cituojama Finney (21)) arba kitais tinkamais šiuolaikiniais metodais.

47. Kitu atveju atsakas modeliuojamas kaip pavyzdinio parametro procentinis dydis arba proporcija, aiškinama kaip vidutinis kontrolinės grupės atsakas. Šiais atvejais įprastą (logistinę, Weibull) sigmoidinę kreivę dažnai galima lengvai pritaikyti rezultatams pagal probito regresijos procedūrą (21). Tokiais atvejais svorinė funkcija turi būti pritaikyta metriniams atsakams, kaip nurodo Christensen (36). Tačiau pastebėjus hormezę, probito analizę reikėtų pakeisti keturių parametrų logistine arba Weibull funkcija, pritaikyta pagal netiesinės regresijos procedūrą (36). Jeigu duomenims neįmanoma pritaikyti tinkamos dozės ir atsako funkcijos, galima rinktis alternatyvius EC_x ir jos pasikliovimo ribų vertinimo metodus, kaip antai slankiųjų vidurkių metodą pagal Thompson (22) ir sutrumpintą Spearman-Karber procedūrą (23).

BANDYMO ATASKAITA

48. Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta toliau nurodyta informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga

— Medžiagos fizikinė prigimtis ir svarbios fizikinės bei cheminės savybės (pvz., tirpumas vandenyje, garų slėgis).

— Bandomosios cheminės medžiagos cheminės atpažinties duomenys pagal IUPAC nomenklatūrą, CAS numeris, partijos ir siuntos numeriai, struktūrinė formulė ir grynumas.

— Iki kokios datos tinka naudoti ėminį.

Bandomosios rūšys

— Naudojami bandomieji gyvūnai: rūšis, mokslinis pavadinimas, šaltinis, iš kurio gauti organizmai, ir jų veisimo sąlygos.

Bandymo sąlygos

— Dirbtinio dirvožemio sudedamosios dalys ir paruošimas.

▼M6

— Bandomosios cheminės medžiagos naudojimo bandymui metodas.

— Bandymo sąlygų aprašymas, įskaitant temperatūrą, drėgnį, pH ir t. t.

— Išsamus bandymo plano ir procedūrų aprašymas.

Bandymo rezultatai

— Suaugusių kirmėlių gaištamumas po dviejų savaičių ir jauniklių skaičius intervalo nustatymo bandymo pabaigoje.

— Suaugusių kirmėlių gaištamumas po trijų poveikio savaičių ir išsamus jauniklių aprašas nustatomojo bandymo pabaigoje.

— Bet kokie pastebėti fiziniai ar patologiniai simptomai ir bandomųjų organizmų elgesio pokyčiai.

— Poveikio reprodukcijai LC_{50}, NOEC ir (arba) EC_x (pvz., EC_{50}, EC_{10}), jeigu nustatytos kurios nors iš šių verčių, kartu su pasikliautinaisiais intervalais, ir grafikas su pritaikytu modeliu, naudotu joms apskaičiuoti, taip pat visa informacija bei pastabos, galinčios padėti aiškinti gautus rezultatus.

Ataskaitoje taip pat turėtų būti aprašyti bet kokie nukrypimai nuo nustatytų pagal šį bandymo metodą atliekamų procedūrų ir bet kokie per bandymą pastebėti nenumatyti reiškiniai.

NUORODOS

(1) Römbke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen – Enchytraeen. Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.

(2) Römbke, J. and Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 pp.

(3) Westheide, W. and Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, In: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Ed. by Esser, G. and Overdieck, D. pp 497-508. Elsevier, Amsterdam,

(4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.

(5) Šio priedo C.8 skyrius. Toksiškumas sliekams.

(6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, No. 11268-1. ISO, Geneve.

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

(8) Rundgren, S. and A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877). In: Løkke, H. and C.A.M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73-94.

(9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23, 217-232.

(10) Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246-249.

(11) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

▼M6

(12) Didden, W.A.M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37, 2-29.

(13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen – Prüfungskategorien der Forschung. UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19-24.

(14) Römbke, J. and Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.

(15) Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

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

(17) Bell, A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus.* Ann. Mus. Novitat. 1902, 1-13.

(18) Nielsen, C.O. and Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Natura Jutlandica 8-9, 1-160.

(19) Bouguenec, V. and Giani, N. (1987). Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et rediscription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. Ann. Limnol. 23, 9-22.

(20) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

(21) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

(22) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd, London.

(23) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

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

(25) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(26) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

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

(28) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361

(29) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(30) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(31) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

(32) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

▼**M6**

(33) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

(34) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

(35) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

(36) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼M6

1 priedėlis

Sąvokų apibrėžtys

Toliau pateiktos taikant šį bandymo metodą vartojamų sąvokų apibrėžtys.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

ECx (x % poveikį sukelianti poveikio koncentracija) – bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant bandomieji organizmai patiria x % poveikį per atitinkamą tos medžiagos veikimo laikotarpį, palyginti su kontroliniu bandiniu. Atliekant šį bandymą poveikio koncentracijos išreiškiamos kaip bandomosios cheminės medžiagos masės santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase.

LC_0 (nemirtina koncentracija) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant per atitinkamą laikotarpį nežūsta jokie jos veikiami bandomieji organizmai. Atliekant šį bandymą LC_0 išreiškiama kaip bandomosios cheminės medžiagos masės santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase.

LC_{50} (vidutinė mirtina koncentracija) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant per atitinkamą laikotarpį žūsta 50 % jos veikiamų bandomųjų organizmų. Atliekant šį bandymą LC_{50} išreiškiama kaip bandomosios cheminės medžiagos masės santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase.

LC_{100} (visiškai mirtina koncentracija) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant per atitinkamą laikotarpį žūsta 100 % jos veikiamų bandomųjų organizmų. Atliekant šį bandymą LC_{100} išreiškiama kaip bandomosios cheminės medžiagos masės santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase.

LOEC (mažiausia pastebėto poveikio koncentracija) – mažiausia statistiškai reikšmingą poveikį ($p < 0,05$) turinti bandomosios cheminės medžiagos koncentracija. Atliekant šį bandymą LOEC išreiškiama kaip bandomosios cheminės medžiagos masės santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase. Esant visoms bandomosios medžiagos koncentracijoms, kurios yra didesnės negu LOEC, paprastai turėtų būti patirtas statistiškai reikšmingas poveikis, palyginti su kontroline grupe. Bet kokius nukrypimus nuo šios LOEC nustatymo tvarkos būtina pagrįsti bandymo ataskaitoje.

NOEC (nepastebėto poveikio koncentracija) – didžiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuri yra tik truputį mažesnė negu LOEC ir kuriai esant jokio poveikio nepastebėta. Atliekant šį bandymą, NOEC atitinkanti koncentracija per nustatytą veikimo laikotarpį nepadaro statistiškai reikšmingo poveikio ($p < 0,05$), palyginti su kontroline grupe.

Reprodukcijos sparta yra per bandymo laikotarpį atsivestų jauniklių vidutinis skaičius, tenkantis tam tikram suaugusių kirmėlių skaičiui.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

▼M6

2 priedėlis

DIdžiausio vandens įmirkio nustatymas

Dirbtinio dirvožemio didžiausio vandens įmirkio nustatymas

Nustatyta, kad tinka taikyti šį metodą, kuris aprašytas ISO DIS 11268-2 standarto C priede.

Paimkite nustatytą bandomojo dirvožemio substrato kiekį (pvz., 5 g) naudodami tinkamą prietaisą (vamzdelį su įvijomis ar kt.). Vamzdelio apačią uždenkite filtravimo popieriaus lapu ir, pripildę jį vandens, pastatykite ant stovo vandens vonelėje. Vamzdelis turėtų laipsniškai panirti, kol vanduo apsems dirvožemio paviršių, tada jį reikėtų palikti vandenyje maždaug 3 val. Kadangi ne visas į dirvožemio poras įsigėręs vanduo gali būti sulaikytas jame, reikėtų palikti dirvožemio ėminį dviem valandoms, kad pasišalintų vandens perteklius, padėjus vamzdelį ant stipriai sudrėkinto kvarcinio smėlio pakloto uždengtame inde (kad neišdžiūtų). Tada ėminį reikėtų pasverti, prieš tai išdžiovinus iki pastovios masės 105 °C temperatūroje. Vandens įmirkį tada galima apskaičiuoti taip:

$$\text{Vandens įmirkis (sausosios medžiagos masės \%)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Šioje formulėje:

S – vandeniu sumirkęs substratas + vamzdelio masė + filtravimo popieriaus masė

T – tara (vamzdelio masė + filtravimo popieriaus masė)

D – sausosios substrato medžiagos masė

NUORODA

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

▼**M6**

3 priedėlis

Dirvožemio PH nustatymas

Šis dirvožemio ėminio pH nustatymo metodas yra pagrįstas standarte ISO 10390 (Dirvožemio kokybė. pH nustatymas) pateiktu aprašymu.

Tam tikras nustatytas dirvožemio kiekis mažiausiai 12 valandų džiovinamas kambario temperatūroje. Tada iš šio dirvožemio paruošiama penkis kartus didesnio tūrio suspensija (joje turi būti mažiausiai 5 g dirvožemio) naudojant 1 M analiziškai gryno kalio chlorido (KCl) arba 0,01 M analiziškai gryno kalcio chlorido ($CaCl_2$) tirpalą. Tada suspensija penkias minutes kruopščiai purtoma. Po purtymo suspensija paliekama nusistovėti mažiausiai 2 valandas, bet ne ilgiau kaip 24 valandas. Tada išmatuojamas skystosios fazės pH naudojant pH matuoklį, kuris prieš kiekvieną matavimą kalibruojamas naudojant tinkamą buferinių tirpalų (pvz., pH = 4,0 ir 7,0) seriją.

NUORODA

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

▼M6

4 priedėlis

***Enchytraeus* sp. kultūrų auginimo sąlygos**

Enchytraeus albidus rūšies (ir kitų *Enchytraeus* rūšių) enchitrėjus galima auginti didelėse (pvz., 30 × 60 × 10 cm) plastiko dėžėse, pripildytose dirbtinio dirvožemio ir natūralaus neužteršto sodo dirvožemio santykiu 1:1. Kompostuojamų medžiagų dėti negalima, nes jose gali būti nuodingųjų cheminių medžiagų, kaip antai sunkiųjų metalų. Prieš naudojant dirvožemį reikėtų pašalinti jo gyvūniją (pvz., giliai užšaldant). Taip pat galima naudoti tik iš dirbtinio dirvožemio paruoštą substratą, tačiau reprodukcijos sparta jame gali būti mažesnė negu mišriame dirvožemio substrate. Kirmėlių kultūroms auginti naudojamo substrato pH turėtų būti 6,0 ± 0,5.

Auginama kultūra laikoma tamsoje, 15–20 ± 2 °C temperatūroje. Reikėtų stengtis, kad temperatūra būtų ne aukštesnė kaip 23 °C. Dirvožemis turi būti visą laiką drėgnas, bet ne šlapias. Dirvožemio drėgnis yra tinkamas, jeigu, nestipriai suspaudus saujoje šiek tiek dirvožemio, tarp pirštų pasirodo smulkių vandens lašelių. Būtina saugotis, kad nesusidarytų bedeguonės sąlygos, užtikrinant, kad per kultūros auginimo indų dangčius vyktų pakankama dujų apykaita su atmosferos oru. Siekiant pagerinti dirvožemio aeraciją, reikėtų kiekvieną savaitę jį kruopščiai supurenti.

Kirmėles galima šerti avižiniais dribsniais. Juos reikėtų laikyti sandariai uždengtuose induose ir prieš naudojant apdoroti autoklave arba pakaitinti, kad neįsiveistų miltų erkių (pvz., *Glyzyphagus sp.*, *Astigmata*, *Acarina*) ar plėšriųjų erkių [pvz., *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*]. Termiškai apdorotą pašarą reikėtų sumalti, kad jį būtų lengva paskleisti dirvožemio paviršiuje. Avižinių dribsnių pašarą kartais galima papildyti vitaminais, pienu ir žuvų taukais. Kiti tinkami pašarai yra kepimo mielės ir žuvų pašaras „Tetramin“.

Kirmėlės šeriamos maždaug du kartus per savaitę. Tinkamas avižinių dribsnių kiekis paberiamas ant dirvožemio paviršiaus arba atsargiai įmaišomas į substratą, kai dirvožemis purenamas aeracijai pagerinti. Tikslus dedamo pašaro kiekis priklauso nuo substrate esančių kirmėlių skaičiaus. Apskritai, jeigu visas pašaras suvartojamas per vieną parą po šėrimo, jo kiekį reikėtų padidinti, ir priešingai, jeigu per antrą šėrimą (po savaitės) dirvožemio paviršiuje tebėra pašaro, davinį reikėtų sumažinti. Grybeliais užkrėstą pašarą reikėtų išimti ir pakeisti šviežiu pašaru. Po trijų mėnesių kirmėles reikėtų perkelti į šviežiai paruoštą substratą.

Auginimo sąlygos laikomos tinkamomis, jeigu kirmėlės: a) nebando išlįsti iš dirvožemio substrato, b) greitai šliaužia dirvožemiu, c) jų paviršius blizgus, be prikibusių dirvožemio dalelių, d) jos yra daugiau ar mažiau balsvos spalvos, e) auginamose kultūrose yra įvairių amžiaus grupių kirmėlių ir f) jos nepaliaujamai dauginasi.

▼M6

5 priedėlis

Bandymas naudojant kitų rūšių Enchitrėjus

Rūšių pasirinkimas

Bandymui galima naudoti ne tik *E. albidus*, bet ir kitų rūšių enchitrėjus, tačiau tokiu atveju reikėtų atitinkamai pakeisti bandymo procedūrą ir tinkamumo kriterijus. Kadangi daugelio *Enchytraeus* rūšių kirmėlių lengva gauti ir jas galima tinkamai prižiūrėti laboratorijoje, svarbiausias kriterijus, pagal kurį pasirenkamos ne *E. albidus*, o kitos rūšies kirmėlės, yra jų ekologinė svarba ir santykinis jautris. Kitą rūšį bandymui galima rinktis ir dėl norminių priežasčių. Pavyzdžiui, tose valstybėse, kuriose *E. albidus* rūšies kirmėlės natūraliai neaptinkamos ir jų negalima importuoti (kaip antai dėl karantino apribojimų), reikės naudoti kitų *Enchytraeus* rūšių kirmėles.

Kitų tinkamų rūšių pavyzdžiai

— *Enchytraeus crypticus* (Westheide ir Graefe, 1992). Pastaraisiais metais šios rūšies kirmėlės dažnai naudojamos per ekotoksikologinius tyrimus, nes jas paprasta veisti ir naudoti bandymams. Tačiau šios kirmėlės yra mažos, todėl su jomis sunkiau dirbti negu su *E. albidus* (ypač ankstesniuose etapuose, prieš taikant dažymo metodą). *E. crypticus* paplitimas gamtoje nėra patikimai nustatytas, nes ši rūšis aprašyta tik auginamose sliekų kultūrose. Todėl jos ekologiniai poreikiai nežinomi.

— *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky, 1879) tikriausiai vadinama artimai giminingų rūšių, kurias pagal sandarą sunku vieną nuo kitos atskirti, grupė. Jos naudoti bandymams nerekomenduojama iki tol, kol bus galima patikimai identifikuoti bandymui naudojamų individų rūšį. *E. buchholzi* rūšies kirmėlės paprastai aptinkamos pievose ir žmogaus veiklos paliestose vietose, kaip antai pakelėse.

— *Enchytraeus luxuriosus*. Ši rūšis iš pradžių vadinta *E. minutus,* tačiau aprašyta neseniai (1). Ją pirmą kartą aptiko U. Graefe iš Hamburgo pievoje arti Sankt Peter-Ordingo (Šlėzvigo-Holšteino žemė, Vokietija). *E. luxuriosus* kirmėlės yra maždaug perpus mažesnės nei *E. albidus*, tačiau didesnės nei kitų čia aptariamų rūšių kirmėlės, todėl gali būti tinkamas *E. albidus* pakaitalas.

— *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen ir Christensen, 1963). Ši rūšis iki šiol buvo žinoma kaip gyvenanti Vokietijos ir Ispanijos mineraliniuose dirvožemiuose, kur ji dažna, bet paprastai nelabai gausi. Palyginti su kitomis smulkiomis šios genties rūšimis, ją identifikuoti gana lengva. Nieko nežinoma apie šios rūšies kirmėlių elgseną per laboratorinius bandymus ar jautrį cheminėms medžiagoms, tačiau nustatyta, kad jas auginti gana paprasta (E. Belotti, asmeninė korespondencija).

Veisimo sąlygos

Visų minėtų *Enchytraeus* rūšių kirmėles galima auginti tuose pačiuose substratuose, kaip ir *E. albidus*. Kadangi jos yra mažesnės, jas galima auginti mažesniuose induose ir nors galima naudoti tą patį parašą, davinio dydį reikia atitinkamai sumažinti. Šių rūšių kirmėlių gyvenimo ciklas yra trumpesnis negu *E. albidus* ir jas reikėtų dažniau šerti.

Bandymo sąlygos

Bandymo sąlygos apskritai yra tokios pačios, kaip ir per *E. albidus* bandymą, tačiau:

— galima, tačiau nebūtina, naudoti mažesnius bandymo indus;

— reprodukcijos bandymas gali būti (nebūtinai) trumpesnis, t. y. keturios vietoj šešių savaičių, tačiau intervalo nustatymo bandymo trukmės keisti nereikėtų;

— kadangi jauniklės kirmėlės yra labai smulkios, patartina jas skaičiuoti taikant dažymo metodą;

— tinkamumo kriterijų, pagal kurį vertinamas „jauniklių skaičius kiekviename bandymo kontrolinės grupės inde“, reikėtų pakeisti į „50“.

▼**M6**

NUORODA

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

▼M6

6 priedėlis

Išsamus kirmėlių surinkimo metodų aprašymas

Dažymas bengališkuoju raudoniu

Šį limnologijos srityje iš pradžių sukurtą metodą (1) taikyti enchitrėjų jaunikliams skaičiuoti per enchitrėjų reprodukcijos bandymą pirmiausia pasiūlė W. de Coen (Gento universitetas, Belgija). RIVM Bilthoven institutas atskirai sukūrė modifikuotą šio metodo versiją (pagal kurią bengališkasis raudonis vietoj etanolio maišomas su formaldehidu) (2), (3).

Baigus nustatomąjį bandymą (t. y. po šešių savaičių) dirvožemis iš bandymo indų perkeliamas į negilią talpą. Šiam tikslui tinka „Bellaplast“ indas arba fotografijų ryškinimo vonelė gofruotu dugnu (tai svarbu, nes dugno paviršiaus „bangelės“ riboja kirmėlių judėjimą stebėjimo lauke). Jaunikliai užfiksuojami etanoliu (apie 5 ml vienam kartotiniam bandiniui), tada į indus įpilamas 1–2 cm gylio vandens sluoksnis. Įlašinami keli lašai (200–300 µl) bengališkojo raudonio (1 % etanolio tirpalo; vietoj jo galima naudoti 0,5 % eozino tirpalą) ir abu komponentai kruopščiai sumaišomi. Po 12 valandų kirmėlės turėtų būti nusidažiusios rausva spalva ir jas turėtų būti lengva suskaičiuoti, nes jos gulės substrato paviršiuje; arba, prieš skaičiuojant kirmėles, substrato ir alkoholio mišinį galima perplauti per sietą (kurio akučių dydis 0,250 mm). Per šią procedūrą išplaunamas kaolinitas, durpės ir dalis smėlio, taigi rausvai nudažytas kirmėles lengviau pastebėti ir suskaičiuoti. Skaičiuoti kirmėles taip pat lengviau naudojant apšviestus lęšius (lęšių dydis turėtų būti bent 100 × 75 mm, didinamoji galia 2–3 karto).

Taikant dažymo metodą, viename inde buvusios kirmėlės suskaičiuojamos per kelias minutes, taigi vienam asmeniui turėtų būti įmanoma įvertinti visų vieno bandymo indų turinį daugiausia per dvi dienas.

Surinkimas šlapiuoju būdu

Kirmėles rinkti šlapiuoju būdu reikėtų pradėti iškart, kai tik baigiamas bandymas. Dirvožemis iš kiekvieno bandymo indo sudedamas į maždaug 1 mm dydžio akučių plastikinius sietus, kurie pakabinami plastikiniuose dubenyse taip, kad neliestų dugno. Tada į dubenis atsargiai pripilama vandens tiek, kad dirvožemio ėminiai sietuose būtų visiškai apsemti. Siekiant užtikrinti, kad iš ėminių būtų surinkta daugiau kaip 90 % kirmėlių, jų rinkimo periodas turėtų trukti 3 dienas, palaikant 20 ± 2 °C temperatūrą. Šiam periodui pasibaigus, sietai išimami ir vanduo lėtai ir atsargiai nupilamas, truputį jo paliekant ir stengiantis nesudrumsti dubenų dugne esančių nuosėdų. Tada plastikiniai dubenys lengvai supurtomi, suspenduojant nuosėdas paviršinio vandens likutyje, kuris perpilamas į Petri lėkštelę. Tada, dirvožemio dalelėms vėl nusėdus į dugną, enchitrėjus galima pastebėti, išimti ir suskaičiuoti naudojant stereomikroskopą ir minkšto plieno chirurgines žnyples.

Flotacija

Flotacija (kirmėlių išplukdymu) pagrįstas metodas aprašytas R. Kuperman pastaboje (4). Bandymo indo turinį užfiksavus etanoliu, dirvožemis užpilamas „Ludox“ (AM-30 koloidinio silicio dioksido 30 masės proc. vandeninės suspensijos) preparatu, kad jo lygis siektų 10–15 mm virš dirvožemio paviršiaus. Tada dirvožemis 2–3 minutes kruopščiai maišomas su flotacine medžiaga, o po to galima lengvai suskaičiuoti paviršiuje plūduriuojančias jaunikles kirmėles.

NUORODOS

(1) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

▼**M6**

(2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*, *Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.

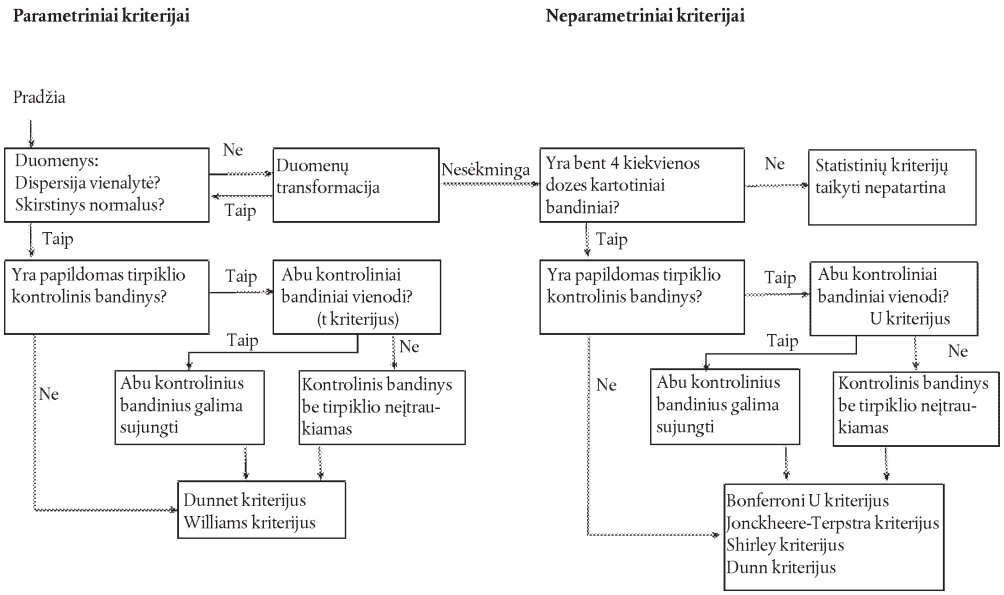
(3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. and Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. Ecotox. Envir. Safety 38, 108-121.

(4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. and Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, p. 157.

▼M6

7 priedėlis

Statistinio duomenų vertinimo apžvalga (NOEC nustatymas)



▼M6

C.33. SLIEKŲ (*EISENIA FETIDA / EISENIA ANDREI*) REPRODUKCIJOS BANDYMAS

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 222 (2004). Jis skirtas dirvožemyje esančių cheminių medžiagų poveikiui *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) arba *Eisenia andrei* (Andre, 1963) (1), (2) rūšies sliekų reprodukcijos našumui (ir kitoms nemirtinoms vertinamosioms baigtims) vertinti. Šis metodas patikrintas per tarplaboratorinį bandymą (3). Yra sukurtas bandymo metodas ūmiam toksiškumui sliekams tirti (4). Paskelbta ir daugiau kitų tarptautinių bei nacionalinių gairių, kaip atlikti ūmaus ir lėtinio toksiškumo sliekams bandymus (5), (6), (7), (8).

2. *Eisenia fetida* ir *Eisenia andrei* laikomos vienomis iš tipinių dirvožemio faunos ir, konkrečiai, sliekų rūšių. Bendra informacija apie sliekų ekologiją ir naudojimą ekotoksikologiniams bandymams paskelbta literatūroje (7), (9), (10), (11), (12).

BANDYMO PRINCIPAS

3. Suaugę sliekai patiria įvairių bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų poveikį. Bandomoji medžiaga įmaišoma į dirvožemį arba, pesticidų atveju, įterpiama į dirvožemį arba ja apdorojamas dirvožemio paviršius pagal tinkamą tos cheminės medžiagos naudojimo procedūrą. Konkretus bandomosios medžiagos naudojimo būdas priklauso nuo bandymo tikslo. Bandymo koncentracijų intervalas pasirenkamas toks, kad apimtų koncentracijas, kurios, tikėtina, per aštuonių savaičių laikotarpį turėtų tiek nemirtiną, tiek mirtiną poveikį. Poveikis suaugusių sliekų gaištamumui ir augimui nustatomas po 4 bandomosios medžiagos poveikio savaičių. Tada suaugę sliekai išimami iš dirvožemio ir dar po 4 savaičių įvertinamas poveikis reprodukcijai suskaičiuojant dirvožemyje esančius palikuonis. Bandomosios cheminės medžiagos paveiktų sliekų reprodukcijos našumas palyginamas su kontrolinės grupės arba grupių sliekų reprodukcijos našumu nustatant: i) nepastebėto poveikio koncentraciją (NOEC) ir (arba) ii) EC_x (pvz., EC_{10}, EC_{50}), pagal regresijos modelį vertinant koncentraciją, kuriai esant reprodukcijos našumas sumažėtų x %. EC_x (pvz., EC_{10}, EC_{50}) vertė turėtų patekti į bandymui pasirinktų koncentracijos verčių intervalą, kad EC_x būtų galima nustatyti interpoliacijos, o ne ekstrapoliacijos būdu (sąvokų apibrėžtis žr. 1 priedėlyje).

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

4. Kad būtų galima tinkamai planuoti bandymo procedūras, reikėtų žinoti šią informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą:

   — jos tirpumą vandenyje;

   — log K_{ow};

   — garų slėgį;

   — kai įmanoma, taip pat informaciją apie jos išliekamumą ir elgseną aplinkoje (pvz., fotolizės lygį ir hidrolizės lygį, kai tinka, priklausomai nuo bandomosios medžiagos naudojimo būdo).

5. Šis bandymo metodas tinka visoms cheminėms medžiagoms, nepriklausomai nuo jų tirpumo vandenyje. Šis bandymo metodas netinka lakiosioms cheminėms medžiagoms, šiuo atveju apibrėžiamoms kaip cheminės medžiagos, kurių Henrio dėsnio konstanta arba oro ir vandens pasiskirstymo koeficientas viršija vienetą, arba cheminėms medžiagoms, kurių garų slėgis 25 °C temperatūroje viršija 0,0133 Pa.

6. Pagal šį bandymo metodą neatsižvelgiama į galimą bandomosios cheminės medžiagos skilimą bandymo laikotarpiu, todėl negalima daryti prielaidos, kad pradinės jos poveikio koncentracijos vertės liks nepakitusios per visą bandymą. Tokiu atveju patartina atlikti bandomosios cheminės medžiagos cheminę analizę pradedant ir baigiant bandymą.

▼M6

ETALONINĖ CHEMINĖ MEDŽIAGA

7. Siekiant įsitikinti, kad laboratorinės bandymo sąlygos yra tinkamos ir kad laikui bėgant statistiškai nesikeičia bandomųjų organizmų atsakas į poveikį, būtina nustatyti etaloninės cheminės medžiagos NOEC ir (arba) EC_x vertes. Etaloninės cheminės medžiagos bandymą patartina atlikti bent kartą per metus arba, jeigu rečiau, – tuo pačiu metu, kai nustatomas bandomosios cheminės medžiagos toksiškumas. Tinkamos etaloninės cheminės medžiagos, kurių poveikis reprodukcijai įrodytas, yra karbendazimas arba benomilas (3). Reikšmingas poveikis turėtų būti pastebimas esant: a) 1 ir 5 mg veikliosios medžiagos vienam sausosios medžiagos masės kilogramui arba b) 250–500 g/ha ar 25–50 mg/m^2. Jei per bandymų seriją naudojamas teigiamas toksiškumo etalonas, pasirenkama viena koncentracija, o kartotinių bandinių turėtų būti tiek pat, kiek ir kontrolinėse grupėse.

BANDYMO TINKAMUMAS

8. Bandymo rezultatas pripažįstamas tinkamu, jei kontrolinės grupės bandiniai atitinka šiuos kriterijus:

— kiekviename kartotiniame bandinyje (kuriame yra 10 suaugusių individų) iki bandymo pabaigos atsivesta ≥ 30 jauniklių;

— reprodukcijos variacijos koeficientas yra ≤ 30 %;

— suaugusių sliekų gaištamumas per pirmas 4 bandymo savaites yra ≤10 %.

Jeigu bandymas neatitinka šių tinkamumo kriterijų, jį reikėtų nutraukti, nebent įmanoma pagrįstai įrodyti, kodėl verta jį tęsti. Šį pagrindimą reikėtų pateikti bandymo ataskaitoje.

BANDYMO APRAŠYMAS

Įranga

9. Turėtų būti naudojami iš stiklo ar kitos chemiškai inertinės medžiagos pagaminti maždaug 1–2 litrų talpos indai. Indų skerspjūvio plotas turėtų būti maždaug 200 cm^2, kad pridėjus 500–600 g sauso substrato masės, drėgno substrato sluoksnio gylis būtų apie 5–6 cm. Indų dangčiai turėtų būti tokie, kad per juos vyktų dujų apykaita tarp substrato ir atmosferos oro ir prasiskverbtų šviesa (pvz., naudojami perforuoti skaidrūs dangčiai), tačiau per juos negalėtų iššliaužti sliekai. Jeigu bandymui substrato į kiekvieną bandymo indą dedama kur kas daugiau negu 500–600 g, reikėtų proporcingai padidinti sliekų skaičių.

10. Bandymui reikalinga įprasta laboratorinė įranga, visų pirma:

— džiovinimo spinta;

— stereomikroskopas;

— pH matuoklis ir fotometras;

— tinkamos tikslios svarstyklės;

— tinkama temperatūros kontrolės įranga;

— tinkama drėgmės kontrolės įranga (nebūtinai, jei bandomosios medžiagos poveikis tiriamas induose su dangčiais);

— inkubatorius arba maža patalpa su oro kondicionieriumi;

— pincetai, vąšeliai arba instrumentai su kilpelėmis gale;

— vandens vonelė.

▼M6

Dirbtinio dirvožemio paruošimas

11. Šiam bandymui naudojamas dirbtinis dirvožemis (5), (7), kurio sudėtis yra tokia (nurodyta sausosios medžiagos, išdžiovintos iki pastovios masės 105 °C temperatūroje, mase):

— 10 % kiminų durpių (kurių pH turi būti kuo artimesnis 5,5–6,0, neturi būti pastebimų augalų liekanų, durpės turi būti smulkiai sumaltos ir išdžiovintos iki tam tikro išmatuoto drėgnio lygio);

— 20 % kaolino molio (patartina, kad kaolinito jame būtų daugiau kaip 30 %);

— 0,3–1,0 % kalcio karbonato (analiziškai grynų $CaCO_3$ miltelių), kad pradinis pH lygis būtų 6,0 ± 0,5;

— 70 % ore išdžiovinto kvarcinio smėlio (priklausomai nuo reikiamo $CaCO_3$ kiekio), daugiausia smulkaus, kad daugiau kaip 50 % dalelių jame būtų 50–200 μm dydžio.

1 pastaba. Reikiamas $CaCO_3$ kiekis priklausys nuo dirvožemio substrato sudedamųjų dalių, įskaitant pašarą, ir turėtų būti nustatytas prieš pat bandymą atliekant dalinių dirvožemio ėminių matavimus. pH matuojamas sumaišytame ėminyje, naudojant 1 M kalcio chlorido (KCl) tirpalą arba 0,01 M kalcio chlorido ($CaCl_2$) tirpalą (13).

2 pastaba. Organinės anglies kiekį dirbtiniame dirvožemyje galima sumažinti, pvz., iki 4–5 % sumažinant durpių kiekį ir atitinkamai padidinant smėlio kiekį. Taip mažinant organinės anglies kiekį, galima sumažinti tikimybę, kad bandomoji cheminė medžiaga įsigers į dirvožemį (dėl jame esančios organinės anglies), ir padidinti bandomosios cheminės medžiagos pasiekiamumą sliekams. Įrodyta, kad *Eisenia fetida* gali atitikti reprodukcijai taikomus bandymo tinkamumo kriterijus, bandymui naudojant iš lauko paimtą dirvožemį su mažesniu organinės anglies kiekiu (pvz., 2,7 %) (14), taip pat iš patirties žinoma, kad tai įmanoma pasiekti ir naudojant dirbtinį dirvožemį su 5 % durpių. Todėl, prieš naudojant tokį dirvožemį nustatomajam bandymui, nebūtina įrodyti dirbtinio dirvožemio tinkamumo tam, kad bandymas atitiktų tinkamumo kriterijus, nebent durpių kiekis būtų sumažintas daugiau negu čia nurodyta.

3 pastaba. Naudojant natūralų dirvožemį papildomiems (pvz., aukštesnės pakopos) bandymams, taip pat reikėtų įrodyti tokio dirvožemio tinkamumą ir atitiktį bandymo tinkamumo kriterijams.

12. Sausos dirvožemio sudedamosios dalys kruopščiai sumaišomos (pvz., naudojant didelį laboratorinį maišytuvą) gerai vėdinamoje vietoje. Prieš pradedant bandymą sausas dirbtinis dirvožemis sudrėkinamas įpilant pakankamai dejonizuoto vandens, kad būtų gauta maždaug pusė galutinio vandens kiekio, t. y. 40–60 % didžiausio vandens įmirkio (atitinkamai 50 ± 10 % drėgnis pagal sausą masę). Taip bus gautas substratas be stovinčio vandens, kurį suspaudus saujoje, iš jo neturėtų sunktis vanduo. Dirbtinio dirvožemio didžiausias vandens įmirkis nustatomas pagal 2 priedėlyje aprašytas procedūras, ISO 11274 (15) arba lygiavertį ES standartą.

13. Jeigu bandomąja chemine medžiaga padengiamas dirvožemio paviršius arba ji įmaišoma į dirvožemį nenaudojant vandens, galutinį reikiamą vandens kiekį galima įmaišyti ruošiant dirbtinį dirvožemį. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga įmaišoma į dirvožemį kartu su trupučiu vandens, reikiamą papildomą vandens kiekį galima supilti kartu su bandomąja chemine medžiaga (žr. 19 skirsnį).

14. Dirvožemio drėgnis nustatomas pradedant ir baigiant bandymą pagal ISO 11465 (16) arba lygiavertį ES standartą, o dirvožemio pH – pagal 3 priedėlį arba ISO 10390 (13) ar lygiavertį ES standartą. Juos reikėtų nustatyti naudojant kontrolinio dirvožemio ėminį ir kiekvienos bandomosios medžiagos koncentracijos dirvožemio ėminį. Dirvožemio pH neturėtų būti koreguojamas atliekant rūgštinių arba šarminių cheminių medžiagų bandymus.

▼M6

Dirvožemio drėgnį reikėtų stebėti per visą bandymą, reguliariai pasveriant indus (žr. 26 ir 30 skirsnius).

Bandomųjų gyvūnų atranka ir paruošimas

15. Bandymui naudojami *Eisenia fetida* arba *Eisenia andrei* rūšies sliekai (1), (2). Pradedant bandymą naudojami suaugę nuo dviejų mėnesių iki vienų metų amžiaus sliekai su kliteliumu. Sliekus bandymui reikėtų atrinkti iš sinchronizuotos, gana vienodo amžiaus sliekų kultūros (4 priedėlis). Bandomosios grupės individų amžiaus skirtumas neturėtų būti didesnis nei 4 savaitės.

16. Atrinkti sliekai turėtų būti bent vieną dieną aklimatizuojami tokiame pačiame dirbtinio dirvožemio substrate, koks bus naudojamas bandymui. Šiuo laikotarpiu sliekai turėtų būti šeriami tokiu pačiu pašaru, koks bus naudojamas per bandymą (žr. 31–33 skirsnius).

17. Pradedant bandymą, turėtų būti sudarytos grupės iš dešimties atskirai pasvertų sliekų, kurios atsitiktine tvarka paskirstomos į bandymo indus. Prieš sveriant sliekai nuplaunami (dejonizuotu vandeniu) ir vandens perteklius pašalinamas trumpam padedant sliekus ant filtravimo popieriaus. Kiekvieno slieko bendra masė turėtų būti 250–600 mg.

Bandymui pasirinktų koncentracijų terpių ruošimas

18. Bandomąją cheminę medžiagą galima naudoti dejopai: įmaišant į dirvožemį (žr. 19–21 skirsnius) arba padengiant ja dirvožemio paviršių (žr. 22–24 skirsnius). Tinkamo metodo pasirinkimas priklauso nuo bandymo tikslo. Paprastai patartina bandomąją cheminę medžiagą įmaišyti į dirvožemį, tačiau vietoj to gali reikėti ją naudoti taip, kaip įprasta pagal žemės ūkio praktiką (pvz., purkšti skystą preparatą arba naudoti specialius pesticidų preparatus, kaip antai granules ar sėklų beicus). Tirpiklius, kurie naudojami dirvožemio apdorojimui bandomąja chemine medžiaga palengvinti, reikėtų parinkti atsižvelgiant į nedidelį jų toksiškumą sliekams; bandymo plane turi būti numatyta tinkama tirpiklio kontrolė (žr. 27 skirsnį).

Bandomosios cheminės medžiagos įmaišymas į dirvožemį

Vandenyje tirpi bandomoji cheminė medžiaga

19. Bandomosios cheminės medžiagos tirpalas dejonizuotame vandenyje ruošiamas prieš pat pradedant bandymą – jo paruošiama tiek, kad pakaktų visiems vienos koncentracijos kartotiniams bandiniams. Kad būtų lengviau ruošti bandomąjį tirpalą, gali reikėti naudoti pagalbinį tirpiklį. Naudinga paruošti tokį tirpalo kiekį, kad jo pakaktų galutiniam dirvožemio drėgniui (40–60 % didžiausio vandens įmirkio) pasiekti. Tirpalas kruopščiai sumaišomas su dirvožemio substratu prieš dedant jį į bandymo indą.

Vandenyje netirpi bandomoji cheminė medžiaga

20. Bandomoji cheminė medžiaga ištirpinama mažame tinkamo organinio tirpiklio (pvz., acetono) kiekyje ir užpurškiama and trupučio smulkaus kvarcinio smėlio arba su juo sumaišoma. Tirpiklis pašalinamas bent kelias minutes garinant po traukos gaubtu, tada apdorotas smėlis kruopščiai sumaišomas su iš anksto sudrėkintu dirbtiniu dirvožemiu, įpilama (reikiamas kiekis) dejonizuoto vandens, kad galutinis dirvožemio drėgnis siektų 40–60 % didžiausio vandens įmirkio, ir sumaišoma. Taip apdorotas dirvožemis yra paruoštas dėti į bandymo indus. Reikėtų turėti omenyje, kad kai kurie tirpikliai gali būti nuodingi sliekams.

▼M6

Vandenyje ir organiniuose tirpikliuose netirpi bandomoji cheminė medžiaga

21. Paruošiamas mišinys į 10 g smulkiai sumalto pramoninio kvarcinio smėlio įdedant tokį bandomosios cheminės medžiagos kiekį, koks būtinas bandymui reikalingai koncentracijai dirvožemyje pasiekti. Gautas mišinys kruopščiai sumaišomas su iš anksto sudrėkintu dirbtiniu dirvožemiu. Tada įpilama dejonizuoto vandens iki reikiamo kiekio, kad galutinis dirvožemio drėgnis būtų 40–60 % didžiausio vandens įmirkio, ir sumaišoma. Taip paruoštas dirvožemis sudedamas į bandymo indus.

Dirvožemio paviršiaus padengimas bandomąja chemine medžiaga

22. Dirvožemis apdorojamas į jį sudėjus sliekus. Pirmiausia bandymo indai pripildomi sudrėkinto dirvožemio substrato ir jo paviršiuje padedami pasverti sliekai. Sveiki sliekai paprastai iškart įsirausia į substratą, todėl tuos, kurie lieka paviršiuje ilgiau kaip 15 minučių, reikia laikyti pažeistais ir pakeisti kitais sliekais. Keičiant sliekus kitais, naujus ir keičiamus sliekus reikėtų pasverti, kad bandymo pradžioje būtų žinoma bendra gyvų bandomosios grupės sliekų masė ir bendra indo su sliekais masė.

23. Tada dedama bandomoji cheminė medžiaga. Įdėjus sliekus, reikėtų palaukti pusvalandį (arba iki tol, kol sliekų neliks dirvožemio paviršiuje) prieš apdorojant dirvožemį bandomąja medžiaga, kad būtų išvengta bet kokio tiesioginio jos sąlyčio su gyvūnų oda. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga yra pesticidas, gali reikėti ją užpurkšti ant dirvožemio paviršiaus. Bandomąją cheminę medžiagą reikėtų stengtis kuo tolygiau paskirstyti dirvožemio paviršiuje naudojant tinkamą laboratorinį purškimo prietaisą, imituojant purškimą laukuose. Prieš naudojant bandomąją cheminę medžiagą, bandymo indo dangtį reikėtų nuimti ir pakeisti apsauginiu įdėklu, kad purškiamas skystis nepatektų ant indo sienelių. Šį įdėklą galima pasidaryti iš kito bandymo indo su išimtu dugnu. Dedant bandomąją cheminę medžiagą, temperatūra turėtų būti 20 ± 2 °C, o naudojant vandeninius tirpalus, emulsijas arba dispersijas, dedamo vandens norma turėtų būti 600–800 µl/m^2. Šią normą reikėtų patikrinti naudojant tinkamą kalibravimo įrangą. Specialius preparatus, kaip antai granules ar sėklų beicus, reikėtų tinkamai naudoti pagal žemės ūkio praktiką.

24. Bandymo indus reikėtų vieną valandą palikti atidengtus, kad išgaruotų visas kartu su bandomąja chemine medžiaga naudotas lakus tirpiklis, tačiau saugoti, kad per tą laiką iš bandymo indų neišsliaužtų sliekai.

PROCEDŪRA

Bandomosios ir kontrolinės grupės

25. Rekomenduojama į 500–600 g sausos dirbtinio dirvožemio masės dėti 10 sliekų (t. y. vienam sliekui tenka 50–60 g dirvožemio). Jeigu naudojami didesni dirvožemio kiekiai, kaip antai per specialiais būdais naudojamų pesticidų (pvz., sėklų beicų) bandymus, reikėtų palaikyti tokį santykį, pagal kurį vienam sliekui tektų 50–60 g dirvožemio, atitinkamai didinant sliekų skaičių. Į kiekvieną kontrolinės ir bandomosios grupių indą paruošiama dėti po 10 sliekų. Sliekai nuplaunami vandeniu, nusausinami ir trumpam padedami ant sugeriamojo popieriaus, siekiant pašalinti vandens perteklių.

26. Kad skirstant sliekus į bandymo indus nebūtų padaryta sisteminių klaidų, reikėtų nustatyti bandomosios populiacijos vientisumą, atskirai pasveriant 20 atsitiktine tvarka atrinktų sliekų iš tos populiacijos, iš kurios bus imami sliekai bandymui. Įsitikinus populiacijos vientisumu, atrinktos sliekų grupės pasveriamos ir atsitiktine tvarka paskirstomos į bandymo indus. Sudėjus bandymui atrinktus sliekus, kiekvieną bandymo indą reikėtų pasverti, siekiant užtikrinti, kad būtų žinoma pradinė masė, taigi būtų galima stebėti

▼M6

dirvožemio drėgnį per visą bandymą, kaip aprašyta 30 skirsnyje. Tada bandymo indai uždengiami, kaip aprašyta 9 skirsnyje, ir sudedami į bandymo kamerą.

27. Tinkami kontroliniai bandiniai paruošiami pagal kiekvieną iš 18–24 skirsniuose aprašytų bandomosios cheminės medžiagos naudojimo metodų. Ruošiant kontrolinius bandinius, taikomos tos pačios aprašytos procedūros, išskyrus tai, kad į juos nededama bandomosios cheminės medžiagos. Todėl, kai tinka, į kontrolinius bandinius dedama organinių tirpiklių, kvarcinio smėlio ar kitų nešiklių tokiomis pačiomis koncentracijomis (kiekiais), kaip ir į bandomosios grupės indus. Kai bandomoji cheminė medžiaga dedama naudojant tirpiklį ar kitą nešiklį, siekiant įsitikinti, kad nešiklis neturės poveikio bandymo rezultatui, taip pat reikėtų paruošti ir išbandyti papildomą kontrolinį bandinį be nešiklio ir be bandomosios cheminės medžiagos.

Bandymo sąlygos

28. Bandymas atliekamas 20 ± 2 °C temperatūroje. Atliekant bandymą reguliuojamas šviesos ir tamsos ciklas (geriausia, kad būtų 16 val. šviesos ir 8 val. tamsos) ir palaikomas bandymo indų apšvietimas 400–800 lx šviesa.

29. Bandymo indai bandymo metu neaeruojami, tačiau jų dangčiai turėtų būti tokios konstrukcijos, kad per juos vyktų dujų apykaita, bet būtų ribojamas drėgmės garavimas (žr. 9 skirsnį).

30. Per visą bandymą palaikomas reikiamas vandens kiekis dirvožemio substrate, bandymo indus reguliariai pasveriant (be dangčių). Sumažėjęs drėgnis, kai reikia, atkuriamas įpilant dejonizuoto vandens. Vandens kiekis induose nuo bandymo pradžios neturėtų pakisti daugiau kaip 10 %.

Šėrimas

31. Tinkamu laikomas bet koks kokybiškas pašaras, kuris, kaip įrodyta, tinka bent pastoviai sliekų masei palaikyti per bandymą. Iš patirties žinoma, kad tinkamas pašaras yra avižinės kruopos, karvių arba arklių mėšlas. Reikėtų patikrinti ir įsitikinti, kad karvės arba arkliai, kurių mėšlas naudojamas, nėra gydomi vaistais ar veikiami cheminių medžiagų, kaip antai augimą skatinančių medžiagų, nematocidų arba panašių veterinarinių vaistų, galinčių pakenkti sliekams per bandymą. Karvių mėšlą patartina rinkti patiems, nes iš patirties žinoma, kad daržams tręšti parduodamas karvių mėšlas sliekams gali pakenkti. Mėšlas turėtų būti išdžiovintas ore, smulkiai sumaltas ir prieš naudojant pasterizuotas.

32. Kiekviena šviežiai paruošto pašaro porcija, prieš naudojant ją bandymui, reikėtų pašerti bandymui nenaudojamus sliekus, siekiant įsitikinti, kad pašaras yra tinkamos kokybės. Tuo pašaru pašertų sliekų augimas ir kokonų susidarymas neturėtų sulėtėti, palyginti su kitais sliekais, laikomais substrate, į kurį naujojo pašaro nedėta (tokiomis sąlygomis, kaip nurodyta pagal C.8 bandymo metodą (4)).

33. Pašaro pirmą kartą duodama praėjus vienai dienai po to, kai įleisti sliekai ir dirvožemis apdorotas bandomąja chemine medžiaga. Maždaug 5 g pašaro paskleidžiama dirvožemio paviršiuje kiekviename inde ir sudrėkinama dejonizuotu vandeniu (į kiekvieną indą įpilama po 5–6 ml). Vėliau per 4 savaičių bandymo laikotarpį pašaro duodama kartą per savaitę. Jei lieka nesuvartoto pašaro, davinį reikėtų sumažinti, kad neįsiveistų grybelių arba pelėsių. Suaugę sliekai iš dirvožemio išimami 28 bandymo dieną, tada į

▼M6

kiekvieną bandymo indą įdedama dar po 5 g pašaro. Likusias 4 bandymo savaites sliekai papildomai nešeriami.

Tinkamų bandomosios medžiagos koncentracijų pasirinkimas

34. Turint išankstinių žinių apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą (pvz., atlikus ūmaus toksiškumo bandymą (4) ir (arba) intervalo nustatymo tyrimus), turėtų būti lengviau pasirinkti bandymui tinkamas jos koncentracijas. Kai reikia, atliekamas intervalo nustatymo bandymas pasirinkus, pvz., penkias bandomosios medžiagos koncentracijas – 0,1, 1,0, 10, 100 ir 1 000 mg vienam sauso dirvožemio masės kilogramui. Kiekvienoje bandomojoje ir kontrolinėje grupėje pakanka paruošti po vieną kartotinį bandinį. Intervalo nustatymo bandymas trunka dvi savaites, o gaištamumas įvertinamas baigus bandymą.

Bandymo planas

35. Kadangi per šį bandymą neįmanoma taikyti vienos bendros statistikos sistemos, pagal šį bandymo metodą galima nustatyti NOEC ir EC_x. Reguliavimo institucijos netolimoje ateityje tikriausiai pradės reikalauti nustatyti NOEC, o EC_x vertės netrukus gali būti pradėtos plačiau naudoti dėl statistinių ir ekologinių priežasčių. Todėl, remiantis rekomendacijomis, pateiktomis atlikus tarplaboratorinį bandymą pagal enchitrėjų reprodukcijos bandymo metodą, siūlomi trys bandymo planai (17).

36. Nustatant koncentracijų intervalą būtina turėti omenyje šiuos dalykus:

— nustatant NOEC, reikėtų bandymui rinktis bent penkias arba dvylika koncentracijos verčių, išdėstytų geometrine progresija. Rekomenduojama paruošti po keturis kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotinius bandinius ir dar aštuonis kontrolinius bandinius. Pasirinktos koncentracijos vertės turėtų skirtis pastoviu santykiu, neviršijančiu 2,0;

— nustatant EC_x (pvz., EC_{10}, EC_{50}), rekomenduojama parinkti tinkamą koncentracijų skaičių, kad būtų gauti mažiausiai keturi statistiškai pakankamai skirtingi vidutiniai atsakai į tų koncentracijų poveikį. Rekomenduojama paruošti bent po du kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotinius bandinius ir šešis kontrolinius kartotinius bandinius. Koncentracijos gali skirtis įvairiu santykiu, kuris, pvz., gali būti mažesnis ar lygus 1,8 tikėtino poveikio intervale arba viršyti 1,8, esant didesnėms arba mažesnėms koncentracijoms;

— NOEC ir EC_x galima kartu nustatyti pagal bendrą metodą. Pagal jį turėtų būti aštuonios bandomosios medžiagos koncentracijos, išdėstytos geometrine progresija. Rekomenduojama paruošti po keturis kiekvienos koncentracijos kartotinius bandinius, taip pat aštuonis kontrolinius bandinius. Pasirinktos koncentracijos vertės turėtų skirtis pastoviu santykiu, neviršijančiu 1.8.

Bandymo trukmė ir matavimai

37. 28 bandymo dieną gyvi suaugę sliekai apžiūrimi ir suskaičiuojami. Taip pat aprašomi bet kokie neįprasti elgsenos pokyčiai (pvz., sliekai neįstengia įsirausti į dirvožemį arba guli nejudėdami) ir morfologiniai pokyčiai (pvz., atviros žaizdos). Tada visi suaugę sliekai išimami iš bandymo indų, suskaičiuojami ir pasveriami. Gali būti lengviau surasti suaugusius sliekus, jeigu prieš vertinimą dirvožemis su sliekais perpilamas į švarų padėklą. Iš dirvožemio išimtus sliekus prieš sveriant reikėtų nuplauti (dejonizuotu vandeniu), tada pašalinti vandens perteklių, trumpam padedant sliekus ant filtravimo popieriaus. Visi tuo metu nerasti sliekai užrašomi kaip negyvi, nes reikia manyti, kad jie iki vertinimo nugaišo ir suiro.

▼M6

38. Jeigu dirvožemis buvo išimtas iš indų, jis sudedamas atgal (be suaugusių sliekų, bet su visais jame esančiais kokonais), tada dar keturias savaites inkubuojamas tomis pačiomis bandymo sąlygomis, tačiau pašaro duodama tik vieną kartą šio bandymo etapo pradžioje (žr. 33 skirsnį).

39. Antrajam 4 savaičių laikotarpiui pasibaigus, pagal 5 priedėlyje aprašytas procedūras nustatomas iš bandymui naudotame dirvožemyje buvusių kokonų išsiritusių jauniklių skaičius ir kokonų skaičius. Taip pat turėtų būti aprašyti bet kokios per visą bandymo laikotarpį sliekams padarytos žalos ar pažeidimo požymiai.

Ribų nustatymo bandymas

40. Jeigu jokio bandomosios medžiagos poveikio nenustatoma esant didžiausiai jos koncentracijai (t. y. 1 000 mg/kg) per intervalo nustatymo bandymą, reprodukcijos bandymą reikėtų atlikti kaip ribų nustatymo bandymą, pasirinkus 1 000 mg/kg koncentraciją. Per ribų nustatymo bandymą bus galima įrodyti, kad poveikio reprodukcijai NOEC viršija ribinę koncentraciją, ir kartu bandymui panaudoti minimalų sliekų kiekį. Reikėtų paruošti po aštuonis tiek bandomąja medžiaga apdoroto dirvožemio, tiek kontrolinius kartotinius bandinius.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų tvarkymas

41. Neskaitant 6 priedėlyje pateiktos apžvalgos, pagal šį bandymo metodą konkrečiai nenurodoma, kaip reikėtų atlikti statistinę bandymo rezultatų analizę.

42. Viena vertinamoji baigtis yra gaištamumas. Tačiau taip pat reikėtų aprašyti suaugusių sliekų elgsenos pokyčius (pvz., sliekai neįstengia įsirausti į dirvožemį arba nejudėdami guli prisišlieję prie stiklinės bandymo indo sienos), morfologinius pokyčius (pvz., atviras žaizdas) ir ar yra jauniklių. Nustatant LC_{50} paprastai reikėtų atlikti probito analizę (18) arba logistinę regresinę analizę. Tačiau tais atvejais, kai šis analizės metodas netinka (pvz., jeigu yra mažiau nei trys koncentracijos, kurioms esant dalis gyvūnų žūsta), galima taikyti alternatyvius metodus; tai gali būti slankiųjų vidurkių metodas (19), sutrumpintas Spearman-Karber metodas (20) arba paprastoji interpoliacija (pvz., LC_0 ir LC_{100} geometrinis vidurkis apskaičiuojamas LC_0 kvadratinę šaknį dauginant iš LC_{100}).

43. Kita vertinamoji baigtis yra vislumas (t. y. atvestų jauniklių skaičius), tačiau šio bandymo, kaip ir intervalo nustatymo bandymo, galutinėje ataskaitoje reikėtų aprašyti ir visus kitus kenksmingo poveikio sliekams požymius. Atliekant statistinę analizę būtina apskaičiuoti kiekvienos bandomosios ir kontrolinės grupės reprodukcijos aritmetinį vidurkį $\bar{x}$ ir standartinį nuokrypį.

44. Atlikus dispersinę analizę, standartinį nuokrypį *s* ir laisvės laipsnius *df* galima pakeisti suminiu dispersijos įverčiu, gautu taikant ANOVA metodą ir, atitinkamai, jo laisvės laipsnius, jeigu dispersija nepriklauso nuo koncentracijos. Tokiu atveju naudokite bendras kontrolinių ir bandomųjų grupių dispersijos vertes. Šios vertės paprastai apskaičiuojamos naudojant komercinę statistikos programinę įrangą, kiekvieno indo rezultatus naudojant kaip kartotinio bandinio rezultatus. Jeigu atrodo, kad galima pagrįstai sujungti neigiamų ir tirpiklio kontrolinių bandinių duomenis, užuot testams naudojus tik kuriuos nors iš jų, reikėtų testais nustatyti, kad tarp jų nėra reikšmingo skirtumo (dėl tinkamo testo žr. 47 skirsnį ir 6 priedėlį).

45. Tolesni statistiniai testai ir išvados priklauso nuo to, ar kartotinių bandinių vertės sudaro normalųjį skirstinį ir ar jų dispersija yra vienalytė.

▼M6

NOEC vertinimas

46. Turėtų būti taikomi patikimi statistiniai kriterijai. Reikėtų naudoti, pvz., iš ankstesnės tarplaboratorinių bandymų patirties arba kitų ankstesnių duomenų gautą informaciją apie tai, ar duomenys maždaug sudaro normalųjį skirstinį. Labiau lemiamą reikšmę turi dispersijos vienalytiškumas (homoskedastija). Iš patirties žinoma, kad dispersija dažnai didėja, didėjant vidurkiui. Šiais atvejais duomenų transformavimas gali lemti homoskedastiją. Tačiau toks transformavimas turėtų būti pagrįstas ankstesnių duomenų tvarkymo patirtimi, o ne tiriamais duomenimis. Turint vienalyčius duomenis, reikėtų taikyti kelis *t* kriterijus, kaip antai Williams kriterijų ($\alpha = 0{,}05$, vienpusis) (21), (22) arba, kai kuriais atvejais, Dunnett kriterijų (23), (24). Pažymėtina, kad netolygios replikacijos atveju lentelėje nurodytas *t* vertes būtina pataisyti, kaip tai siūlo Dunnett ir Williams. Kartais dėl didelės variacijos atsakai didėja arba mažėja netolygiai. Šiuo atveju, jeigu labai nukrypta nuo monotoniškumo, labiau tinka taikyti Dunnett kriterijų. Jeigu nukrypstama nuo homoskedastijos, gali būti pagrįsta atidžiau ištirti galimą poveikį dispersijoms siekiant nuspręsti, ar taikant *t* kriterijus per daug nesumažėtų patikimumas (25). Kitu atveju galima taikyti daugybinį U kriterijų, pvz., Bonferroni U kriterijų pagal Holm (26), arba, kai šiems duomenims būdinga heteroskedastija, tačiau kitais atžvilgiais jie atitinka monotonišką dozės ir atsako santykį, – bet kokį kitą neparametrinį kriterijų (pvz., Jonckheere-Terpstra (27), (28) arba Shirley (29), (30)), ir apskritai jam teiktina pirmenybė prieš nelygios dispersijos *t* kriterijus (taip pat žr. 6 priedėlyje pateiktą schemą).

47. Jeigu atliktas ribų nustatymo bandymas ir tenkinamos parametrinio kriterijaus procedūrų taikymo (normalumo, vienalytiškumo) sąlygos, galima taikyti porinį Student *t* kriterijų arba, kitu atveju, U kriterijaus procedūrą pagal Mann ir Whitney (31).

ECx vertinimas

48. Apskaičiuojant bet kokią EC_x vertę, kiekvienos bandomosios grupės vidurkiai naudojami atliekant (tiesinės arba netiesinės) regresijos analizę po to, kai gaunama tinkama dozės ir atsako santykio funkcija. Siekiant gauti sliekų augimą kaip nenutrūkstamą atsaką, EC_x- vertes galima nustatyti atliekant tinkamą regresinę analizę (32). Tarp dvireikšmiams kintamiesiems (gaištamumas arba išgyvenimas) ir atsivestų jauniklių skaičius tinkamų funkcijų yra įprastos sigmoidinės, logistinės arba Weibull funkcijos su dviem ar keturiais parametrais, iš kurių kai kurie taip pat gali sudaryti hormetinius atsakus. Jeigu dozės ir atsako funkcija buvo pritaikyta atlikus tiesinės regresijos analizę, prieš vertinant EC_x, kartu su regresine analize turėtų būti nustatytas reikšmingas r^2 (determinacijos koeficiento) dydis ir (arba) nuolydis, įrašant x % atitinkančią kontrolinės grupės vidurkio vertę į lygtį, sudarytą atlikus regresinę analizę. 95 % pasikliovimo ribos apskaičiuojamos pagal Fieller (cituojama Finney (18)) arba kitais tinkamais šiuolaikiniais metodais.

49. Kitu atveju atsakas modeliuojamas kaip pavyzdinio parametro procentinis dydis arba proporcija, aiškinama kaip vidutinis kontrolinės grupės atsakas. Šiais atvejais įprastą (logistinę, Weibull) sigmoidinę kreivę dažnai galima lengvai pritaikyti rezultatams pagal probito regresijos procedūrą (18). Tokiais atvejais svorinė funkcija turi būti pritaikyta metriniams atsakams, kaip nurodo Christensen (33). Tačiau pastebėjus hormezę, probito analizę reikėtų pakeisti keturių parametrų logistine arba Weibull funkcija, pritaikyta pagal netiesinės regresijos procedūrą (34). Jeigu duomenims neįmanoma pritaikyti tinkamos dozės ir atsako funkcijos, galima rinktis alternatyvius EC_x ir jos pasikliovimo ribų vertinimo metodus, kaip antai slankiųjų vidurkių metodą pagal Thompson (19) ir sutrumpintą Spearman-Karber procedūrą (20).

BANDYMO ATASKAITA

50. Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta toliau nurodyta informacija.

▼M6

Bandomoji cheminė medžiaga

— Tikslus bandomosios cheminės medžiagos apibūdinimas, jos partija, siunta, CAS numeris, grynumas.

— Bandomosios cheminės medžiagos savybės (pvz., log K_{ow}, tirpumas vandenyje, garų slėgis, Henrio dėsnio konstanta (H) ir informacija apie jos išliekamumą bei elgseną aplinkoje).

Bandomieji organizmai

— Naudojami bandomieji gyvūnai: rūšis, mokslinis pavadinimas, šaltinis, iš kurio gauti organizmai, ir jų veisimo sąlygos.

— Bandomųjų organizmų amžius, jų dydžio (masės) intervalas.

Bandymo sąlygos

— Informacija apie bandymui naudojamo dirvožemio paruošimą.

— Didžiausias dirvožemio vandens įmirkis.

— Dirvožemio apdorojimo bandomąja chemine medžiaga metodo aprašymas.

— Informacija apie kartu su bandomąja chemine medžiaga naudojamas pagalbines chemines medžiagas.

— Kai tinka, naudojamos purškimo įrangos kalibravimo duomenys.

— Bandymo plano ir eigos aprašymas.

— Bandymo indų dydis ir bandymui naudojamo dirvožemio tūris.

— Bandymo sąlygos: šviesos stipris, šviesos ir tamsos ciklų trukmė, temperatūra.

— Šėrimo tvarkos aprašymas, bandymui naudojamo pašaro rūšis ir kiekis, šėrimo dienos.

— Dirvožemio pH ir jame esančio vandens kiekis bandymo pradžioje ir pabaigoje.

Bandymo rezultatai

— Suaugusių sliekų gaištamumas (%), nustatytas kiekviename bandymo inde po pirmųjų 4 bandymo savaičių.

— Pradedant bandymą kiekviename bandymo inde buvusių suaugusių sliekų bendra masė.

— Gyvų suaugusių sliekų kūno masės pokytis (pradinės masės proc.), nustatytas kiekviename bandymo inde po pirmųjų keturių bandymo savaičių.

— Kiekviename bandymo inde atsivestų jauniklių skaičius bandymo pabaigoje.

— Pastebimų ar patologinių simptomų arba reikšmingų elgsenos pokyčių apibūdinimas.

— Bandymui naudojant etaloninę cheminę medžiagą gauti rezultatai.

— Poveikio reprodukcijai LC_{50}, NOEC ir (arba) EC_x (pvz., EC_{50}, EC_{10}), jeigu nustatytos kurios nors iš šių verčių, kartu su pasikliautinaisiais intervalais, ir grafikas su pritaikytu modeliu, naudotu joms apskaičiuoti, taip pat visa informacija bei pastabos, galinčios padėti aiškinti gautus rezultatus.

— Dozės ir atsako santykio grafikas.

— Kiekvieno bandymo indo rezultatai.

Ataskaitoje taip pat turėtų būti aprašyti bet kokie nukrypimai nuo nustatytų pagal šį bandymo metodą atliekamų procedūrų ir bet kokie per bandymą pastebėti nenumatyti reiškiniai.

NUORODOS

(1) Jaenicke, J. (1982). '*Eisenia foetida*' is two biological species. Megadrilogica 4, 6-8.

(2) Oien, N. and J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm – III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. Comp. Biochem. Physiol. 78c (2), 277 – 282.

▼M6

(3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida/Eisenia andrei* – comparison of two ringtests. In: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtsch. Berlin-Dahlem, 320, p. 50-82.

(4) Šio priedo C.8 skyrius. Toksiškumas sliekams.

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

(6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Geneve.

(7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., and L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 pp.

(8) EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, April 1996.

(9) Bouché, M.B. (1972). Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.

(10) Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.

(11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

(12) Edwards, C.A. and J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3rd Edition. Chapman and Hall, London.

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

(14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

(15) ISO (International Organization for Standardization) (1992). Soil Quality –Determination of water retention characteristics –Laboratory methods, No. 11274. ISO, Geneve.

(16) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.

(17) Römbke, J. and Th. Moser (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150+ 223 pp.

▼**M6**

(18) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

(19) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd, London.

(20) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

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

(22) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(23) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

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

(25) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361

(26) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(27) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(28) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

(29) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

(30) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

(31) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

(32) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494

(33) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

(34) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼M6

1 priedėlis

Sąvokų apibrėžtys

Toliau pateiktos taikant šį bandymo metodą vartojamų sąvokų apibrėžtys.

Cheminė medžiaga– medžiaga arba mišinys.

EC_x (x % poveikį sukelianti poveikio koncentracija)– bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant bandomieji organizmai patiria x % poveikį per atitinkamą tos medžiagos veikimo laikotarpį, palyginti su kontroliniu bandiniu. Pavyzdžiui, EC_{50} yra koncentracija, kuri, kaip įvertinta, iki bandymo vertinamosios baigties per nustatytą bandomosios medžiagos veikimo laikotarpį paveikia 50 % atitinkamos populiacijos. Atliekant šį bandymą poveikio koncentracijos išreiškiamos kaip bandomosios cheminės medžiagos masės santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase.

LC_0 (nemirtina koncentracija)– bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant per atitinkamą laikotarpį nežūsta jokie jos veikiami bandomieji organizmai. Atliekant šį bandymą LC_0 išreiškiama kaip bandomosios cheminės medžiagos masės santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase.

LC_{50} (vidutinė mirtina koncentracija)– bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant per atitinkamą laikotarpį žūsta 50 % jos veikiamų organizmų. Atliekant šį bandymą LC_{50} išreiškiama kaip bandomosios cheminės medžiagos masės santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase arba kaip bandomosios cheminės medžiagos masė, tenkanti vienetiniam dirvožemio plotui.

LC_{100} (visiškai mirtina koncentracija)– bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant per atitinkamą laikotarpį žūsta 100 % jos veikiamų bandomųjų organizmų. Atliekant šį bandymą LC_{100} išreiškiama kaip bandomosios cheminės medžiagos santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase.

LOEC (mažiausia pastebėto poveikio koncentracija)– mažiausia statistiškai reikšmingą poveikį ($p < 0,05$) turinti bandomosios cheminės medžiagos koncentracija. Atliekant šį bandymą LOEC išreiškiama kaip bandomosios cheminės medžiagos masės santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase arba kaip bandomosios cheminės medžiagos masė, tenkanti vienetiniam dirvožemio plotui. Esant visoms bandomosios medžiagos koncentracijoms, kurios yra didesnės negu LOEC, paprastai turėtų būti patirtas statistiškai reikšmingas poveikis, palyginti su kontroline grupe. Bet kokius nukrypimus nuo šios tvarkos būtina pagrįsti bandymo ataskaitoje.

NOEC (nepastebėto poveikio koncentracija)– didžiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuri yra tik truputį mažesnė negu LOEC ir kuriai esant jokio poveikio nepastebėta. Atliekant šį bandymą, NOEC atitinkanti koncentracija per nustatytą veikimo laikotarpį nepadaro statistiškai reikšmingo poveikio ($p < 0,05$), palyginti su kontroline grupe.

Reprodukcijos sparta– per bandymo laikotarpį atsivestų jauniklių vidutinis skaičius, tenkantis tam tikram suaugusių sliekų skaičiui.

Bandomoji cheminė medžiaga– naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

▼M6

2 priedėlis

Didžiausio dirvožemio vandens įmirkio nustatymas

Nustatyta, kad didžiausiam dirvožemio vandens įmirkiui įvertinti tinka šis metodas, apibūdintas standarto ISO DIS 11268-2 C priede (1).

Paimkite nustatytą bandomojo dirvožemio substrato kiekį (pvz., 5 g) naudodami ėminiams imti tinkamą prietaisą (vamzdelį su įvijomis ar kt.). Vamzdelio apačią uždenkite filtravimo popieriaus lapu ir, pripildę jį vandens, pastatykite ant stovo vandens vonelėje. Vamzdelis turėtų laipsniškai panirti, kol vanduo apsems dirvožemio paviršių, tada jį reikėtų palikti vandenyje maždaug 3 val. Kadangi ne visas į dirvožemio poras įsigėręs vanduo gali būti sulaikytas jame, reikėtų palikti dirvožemio ėminį dviem valandoms, kad pasišalintų vandens perteklius, padėjus vamzdelį ant stipriai sudrėkinto smulkiai sumalto kvarcinio smėlio pakloto uždengtame inde (kad neišdžiūtų). Tada ėminį reikėtų pasverti, prieš tai išdžiovinus iki pastovios masės 105 °C temperatūroje. Vandens įmirkį tada galima apskaičiuoti taip:

$$\text{Vandens įmirkis (sausosios medžiagos masės \%)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Šioje formulėje:

S = vandeniu sumirkęs substratas + vamzdelio masė + filtravimo popieriaus masė

T = tara (vamzdelio masė + filtravimo popieriaus masė)

D = sauso substrato masė

NUORODA

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

▼M6

3 priedėlis

Dirvožemio PH nustatymas

Šis dirvožemio pH nustatymo metodas yra pagrįstas standarte ISO DIS 10390 (Dirvožemio kokybė. pH nustatymas) pateiktu aprašymu (1).

Tam tikras nustatytas dirvožemio kiekis mažiausiai 12 valandų džiovinamas kambario temperatūroje. Tada iš šio dirvožemio paruošiama penkis kartus didesnio tūrio suspensija (joje turi būti mažiausiai 5 g dirvožemio) naudojant 1 M analiziškai gryno kalio chlorido (KCl) arba 0,01 M analiziškai gryno kalcio chlorido ($CaCl_2$) tirpalą. Tada suspensija penkias minutes kruopščiai purtoma, po to paliekama nusistovėti mažiausiai 2 valandas, bet ne ilgiau kaip 24 valandas. Tada išmatuojamas skystosios fazės pH naudojant pH matuoklį, kuris prieš kiekvieną matavimą kalibruojamas naudojant tinkamą buferinių tirpalų (pvz., pH = 4,0 ir 7,0) seriją.

NUORODA

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

▼M6

4 priedėlis

***Eisenia fetida* ir *Eisenia andrei* rūšių sliekų kultūrų auginimas**

Šių rūšių sliekus geriausia veisti reguliuojamo klimato kameroje palaikant 20 ± 2 °C temperatūrą. Esant šiai temperatūrai, gaudami pakankamai pašaro, sliekai subręsta per maždaug 2–3 mėnesius.

Abiejų rūšių sliekus galima auginti įvairių rūšių gyvūninėse atliekose. Rekomenduojama naudoti iš arklių ar galvijų mėšlo ir durpių (santykiu 50:50) paruoštą auginimo terpę. Reikėtų patikrinti ir įsitikinti, kad karvės arba arkliai, kurių mėšlas naudojamas, nėra gydomi vaistais ar veikiami cheminių medžiagų, kaip antai augimą skatinančių medžiagų, nematocidų arba panašių veterinarinių vaistų, galinčių pakenkti sliekams per bandymą. Mėšlą patartina rinkti patiems iš ekologinių ūkių, nes iš patirties žinoma, kad daržams tręšti parduodamas mėšlas sliekams gali pakenkti. Terpės pH vertė turėtų būti maždaug 6–7 (tikslinama naudojant kalcio karbonatą), joninis laidis turėtų būti mažas (mažesnė negu 6 mS/cm arba 0,5 % druskų koncentracija) ir ji neturėtų būti per daug užteršta amoniaku ar gyvūnų šlapimu. Substratas turėtų būti drėgnas, bet ne per šlapias. Sliekams veisti tinka naudoti 10–50 litrų talpos dėžes.

Siekiant gauti vienodo standartinio amžiaus ir dydžio (masės) sliekus, geriausia išsiauginti jų kultūrą iš kokonų. Įveista kultūra toliau prižiūrima 14–28 paroms įleidžiant suaugusius sliekus į veisimui skirtą dėžę su šviežiu substratu, kad susidarytų dar daugiau kokonų. Tada suaugę individai išimami, o iš kokonų išsiritę jaunikliai naudojami naujai kultūrai veisti. Sliekai nepaliaujamai šeriami gyvūninėmis atliekomis ir kartkartėmis perkeliami į šviežią substratą. Iš patirties žinoma, kad tinkamas pašaras yra ore išdžiovintas smulkiai sumaltas karvių ar arklių mėšlas arba avižinės kruopos. Reikėtų įsitikinti, kad karvės arba arkliai, kurių mėšlas naudojamas, nėra gydomi vaistais ar veikiami cheminių, kaip antai augimą skatinančių, medžiagų, galinčių pakenkti ilgą laiką auginamoms sliekų kultūroms. Iš kokonų išsiritę sliekai naudojami bandymams, kai jie yra 2–12 mėnesių amžiaus ir laikomi suaugusiais individais.

Sliekus galima laikyti sveikais, jeigu jie rausiasi substrate, nemėgina iš jo iššliaužti ir nepaliaujamai dauginasi. Jeigu sliekai juda labai lėtai ir jų užpakalinis galas pageltęs, tai reiškia, kad substratas yra išeikvotas. Šiuo atveju rekomenduojama įdėti šviežio substrato ir (arba) sumažinti sliekų tankį substrate.

▼M6

5 priedėlis

Iš kokonų išsiritusių jauniklių sliekų skaičiavimo metodai

Iš dirvožemio substrato išimtų sliekų rūšiavimas rankiniu būdu labai ilgai trunka, todėl vietoj to siūloma taikyti du alternatyvius metodus.

a) Bandymo indai įdedami į vandens vonelę, kurioje vandens temperatūra iš pradžių yra 40 °C, tačiau pamažu didinama iki 60 °C. Po maždaug 20 minučių jaunikliai sliekai turėtų pasirodyti dirvožemio paviršiuje ir tada juos lengva išimti ir suskaičiuoti.

b) Bandymui naudotą dirvožemį galima perplauti per sietą pagal K. van Gestel ir kt. sukurtą metodą (1), jeigu į dirvožemį dėtos durpės ir mėšlas arba avižinės kruopos buvo smulkiai sumalti. Du 0,5 mm dydžio akučių (30 cm skersmens) sietai padedami vienas ant kito, tada bandymo indo turinys perplaunamas per sietus stipria srove leidžiant vandenį iš čiaupo. Taip dauguma jaunų sliekų ir kokonų lieka viršutiniame siete. Įsidėmėtina, kad visas viršutinio sieto paviršius per šią procedūrą turėtų būti šlapias, kad jaunikliai sliekai plūduriuotų susidariusios vandens plėvelės paviršiuje ir negalėtų iššliaužti per sieto akutes. Geriausi rezultatai gaunami leidžiant vandenį per dušo antgalį.

Per sietą perplovus visą dirvožemio substratą, sliekų jauniklius ir kokonus nuo viršutinio sieto galima nuplauti į dubenį. Tada dubens turinys paliekamas nusistovėti, kad tušti kokonai išplauktų į vandens paviršių, o pilni kokonai ir jauni sliekai nugrimztų į dugną. Po to stovintį vandenį galima nupilti, o jaunus sliekus ir kokonus perkelti į Petri lėkštelę, kurioje įpilta truputį vandens. Iš jos sliekus galima išimti naudojant adatą arba pincetą ir suskaičiuoti.

Iš patirties žinoma, kad *a* metodas yra tinkamesnis rinkti jaunikliams sliekams, kurie gali būti išplauti net per 0,5 mm dydžio akučių sietą.

Visada reikėtų nustatyti pasirinkto metodo, pagal kurį sliekai (ir, kai tinka, sliekų kokonai) išrenkami iš dirvožemio substrato, efektyvumą. Jeigu sliekų jaunikliai renkami ir rūšiuojami rankomis, patartina taip po du kartus apdoroti visus bandinius.

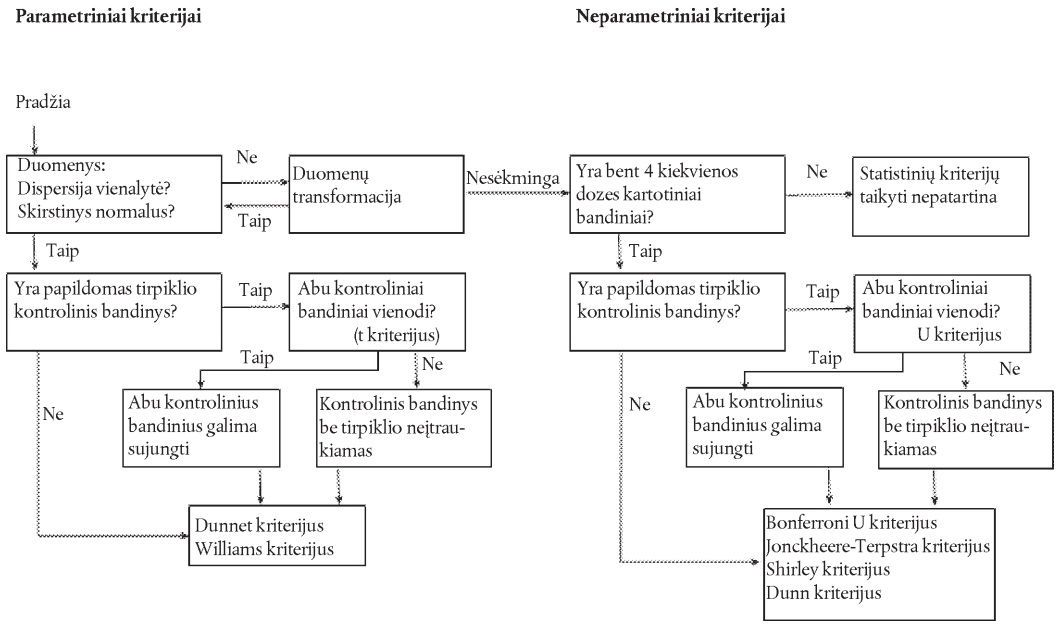
NUORODA

(1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. Pedobiologia 32:367-371.

▼M6

6 priedėlis

Statistinio duomenų vertinimo apžvalga (NOEC nustatymas)



▼M6

C.34. ANAEROBINIŲ BAKTERIJŲ AKTYVUMO SLOPINIMO NUSTATYMAS. ANAEROBIŠKAI (NUOTEKAS) SKAIDANČIO DUMBLO DUJŲ IŠSKYRIMO SUMAŽĖJIMAS

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 224 (2007). Į vandens aplinką išleidžiamos cheminės medžiagos prasiskverbia per aerobinę ir anaerobinę zonas, kuriose jos gali būti suskaidytos ir (arba) gali slopinti bakterijų aktyvumą; kai kada jos gali likti nejudinamos anaerobinėse zonose ištisus dešimtmečius ir ilgiau. Pirmojo etapo valymas – pirminis nusodinimas – nuotekų valymo įrenginyje yra aerobinis procesas, vykstantis paviršiniame skystyje, ir anaerobinis procesas dumblo nuosėdose. Antrajame etape nuotekos apdorojamos aerobinėje zonoje, kuri yra aktyviojo dumblo aeracijos rezervuare, ir anaerobinėje zonoje – dumblo nuosėdose antrinio nusodinimo rezervuare. Per abu šiuos etapus gautas dumblas paprastai anaerobiškai apdorojamas ir išskiria metaną bei anglies dioksidą, kurie įprastai naudojami elektros energijos gamybai. Išleistos į aplinką cheminės medžiagos, patekusios į įlankų, estuarijų ar jūrų dugno nuosėdas, gali neribotą laiką likti tose anaerobinėse zonose, jeigu nėra biologiškai skaidžios. Tikėtina, kad į tas zonas patenka didesni kai kurių cheminių medžiagų kiekiai dėl jų fizikinių savybių, kaip antai mažo tirpumo vandenyje, didelės įgerties (adsorbcijos) į suspenduotas kietąsias medžiagas ir aerobinio biologinio neskaidumo.

2. Pageidautina, kad į aplinką išleidžiamos cheminės medžiagos būtų biologiškai skaidžios tiek aerobinėmis, tiek anaerobinėmis sąlygomis, tačiau itin svarbu, kad tokios medžiagos neslopintų mikroorganizmų aktyvumo nė vienoje iš šių zonų. Žinomi keli atvejai Jungtinėje Karalystėje, kai metano išskyrimą visiškai nuslopino, pavyzdžiui, pramoninėse nuotekose buvęs pentachlorfenolis, todėl teko organizuoti labai brangiai kainavusį nuslopinto dumblo gabenimą iš metantankų į „saugias“ vietas ir „sveiko“ nuotekas skaidančio dumblo atvežimą iš gretimų įrenginių. Tačiau būta ir daug kitų atvejų, kai nuotekų skaidymo procesus kiek mažiau sutrikdė kelios kitos cheminės medžiagos, tarp jų alifatiniai angliavandeniliai (naudojami sausajam valymui) ir plovikliai, dėl kurių labai sumažėjo nuotekų skaidymo metantankų efektyvumas.

3. Bakterijų aktyvumo (aktyviojo dumblo kvėpavimo) slopinimas tiriamas pagal vienintelį bandymo metodą C.11 (1), pagal kurį vertinamas bandomųjų cheminių medžiagų poveikis deguonies sugerties spartai substrate. Šis metodas plačiai taikomas siekiant iš anksto perspėti apie galimą kenksmingą cheminių medžiagų poveikį aerobiniam nuotekų valymui, taip pat nustatyti neslopinančias bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijas, tinkamas įvairiems biologinio skaidumo bandymams. Pagal C.43 bandymo metodą (2) galima iš dalies nustatyti bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą anaerobinio dumblo dujų išskyrimui, jo kietąsias medžiagas atskiedžiant iki 1/10 įprastos koncentracijos, kad būtų pasiektas reikiamas procentinio biologinio skaidumo vertinimo tikslumas. Kadangi atskiestas dumblas gali jautriau reaguoti į slopinančias chemines medžiagas, ISO grupė nusprendė parengti metodą, pagal kurį būtų naudojamas neskiestas dumblas. Buvo išnagrinėti mažiausiai trys mokslo darbai (iš Danijos, Vokietijos ir Jungtinės Karalystės) ir galiausiai parengti du ISO standartai – pagal vieną iš jų, ISO 13 641-1 (3), naudojamas neskiestas dumblas, o pagal kitą – ISO 13 641-2 (4) – iki 1/100 atskiestas dumblas; toks santykis atitinka dumblą ir dugnines nuosėdas su nedidelėmis bakterijų populiacijomis. Pagal abu metodus buvo atliktas tarplaboratorinis bandymas (5); pirmasis iš šių standartų buvo patvirtintas kaip tinkamas, tačiau dėl antrojo nesutarta. Jungtinės Karalystės manymu, kadangi nemažai bandymo dalyvių pranešė, jog dujų susidarė labai nedaug arba jų visai nebuvo, nes procentinė dujoms skirta erdvės dalis buvo per didelė (75 %) optimaliam jautriui, šį metodą reikia tirti papildomai.

4. Ankstesniuose Jungtinės Karalystės mokslo darbuose (6), (7) aprašytas manometrinis metodas, pagal kurį naudotas neskiestas nuotekas skaidantis dumblas ir žalių nuotekų dumblas kaip substratas 500 ml tūrio kolbose; tokio bandymo aparatūra buvo nepatogi naudoti, o žalio dumblo dvokas nepakenčiamas. Vėliau Wilson ir kt. (10) sėkmingai pritaikė bandymams kompaktiškesnį ir patogesnį Shelton ir Tiedje aparatą (8), patobulintą Battersby ir Wilson (9). Kawahara ir kt. (11) laboratorijoje sėkmingai paruošė labiau standartizuotus dumblo ėminius, skirtus naudoti įvairių

▼M6

cheminių medžiagų anaerobinio biologinio skaidumo ir slopinamojo poveikio bandymams. Taip pat žalio dumblo substratas bandymams pakeistas iki 1/100 atskiestu anaerobiniu dumblu arba mažo bakterijų aktyvumo dumblu, dugninėmis nuosėdomis ir kt.

5. Pagal šį metodą galima gauti informacijos, naudingos prognozuojant tikėtiną bandomosios cheminės medžiagos poveikį dujų susidarymui anaerobiniuose metantankuose. Tačiau tik atliekant ilgesnius bandymus, per kuriuos tiksliau modeliuojamas metantankų veikimas, galima nustatyti, ar mikroorganizmai geba prisitaikyti prie bandomosios cheminės medžiagos ir ar į dumblą arba dumblo paviršių linkusios įsigerti cheminės medžiagos gali jame susikaupti iki toksiškos koncentracijos per ilgesnį laiką, negu trunka šis bandymas.

BANDYMO PRINCIPAS

6. Anaerobiškai nuotekas skaidančio dumblo (iš viso 20–40 g/l kietųjų medžiagų) ir skaidaus substrato tirpalo mišinio alikvotinės dalys sandariai uždarytuose induose iki 3 dienų inkubuojamos atskirai ir kartu su įvairių koncentracijų bandomąja chemine medžiaga. Išsiskyrusių (metano ir anglies dioksido) dujų kiekis matuojamas pagal slėgio padidėjimą (išreikštą paskaliais, Pa) buteliuose. Įvairių bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų sukeltas dujų išskyrimo slopinimas procentais apskaičiuojamas pagal atitinkamuose bandymo ir kontrolinės grupės buteliuose susidariusių dujų kiekius. EC_{50} ir kitos efektyviosios koncentracijos apskaičiuojamos pagal grafikus, kuriuose procentinis slopinimo lygis parodomas kaip bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos, arba, įprasčiau, jos logaritmo funkcija.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

7. Bandomosios cheminės medžiagos paprastai turėtų būti naudojamos pačiu gryniausiu pavidalu, kokiu įmanoma jas gauti, nes kai kuriose cheminėse medžiagose esančios priemaišos, kaip antai chlorfenoliai, gali būti kur kas toksiškesnės nei pati bandomoji cheminė medžiaga. Tačiau reikėtų apsvarstyti, ar tinka bandyti chemines medžiagas tokiu pavidalu, kokiu jos gaminamos ir (arba) parduodamos rinkoje. Naudoti apibrėžtos sutarties produktų paprastai nepatartina, tačiau kai bandomos mažai tirpios cheminės medžiagos, gali būti tinkama naudoti jų preparatus. Reikėtų žinoti šias bandomosios cheminės medžiagos savybes: jos tirpumą vandenyje ir kai kuriuose organiniuose tirpikliuose, garų slėgį, įgerties (adsorbcijos) koeficientą, hidrolizę ir biologinį skaidumą anaerobinėmis sąlygomis.

METODO TAIKOMUMAS

8. Šis bandymo metodas taikytinas vandenyje tirpioms arba netirpioms cheminėms medžiagoms, įskaitant lakiąsias chemines medžiagas. Vis dėlto su vandenyje mažai tirpiomis (12) ir labai lakiomis medžiagomis reikia elgtis itin atsargiai. Taip pat galima naudoti dumblo pasėlius, paimtus iš kitų vietų, kuriose yra anaerobinės sąlygos, pvz., natūralaus dumblo, įmirkusio dirvožemio ar dugninių nuosėdų. Anaerobinių bakterijų sistemos, kurios jau yra patyrusios nuodingųjų cheminių medžiagų poveikį, gali būti prie jo prisitaikiusios, taigi jų aktyvumas gali nesumažėti veikiant ksenobiotinėms cheminėms medžiagoms. Iš prisitaikiusių bakterijų sistemų paimti pasėliai gali būti atsparesni bandomosioms cheminėms medžiagoms negu pasėliai, paimti iš neprisitaikiusių sistemų.

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

9. Siekiant patikrinti bandymo procedūrą, atliekamas bandymas naudojant etaloninę cheminę medžiagą, atitinkamus bandymo indus paruošiant taip pat, kaip ir per įprastus bandymus. Įrodyta, kad 3,5-dichlorfenolis nuolat slopina anaerobinį dujų išskyrimą, taip pat aktyviojo dumblo deguonies sugertį ir kitas biochemines reakcijas. Įrodyta, kad dar labiau negu 3,5-dichlorfenolis metano išskyrimą slopina kitos dvi cheminės medžiagos – metilen-bis-tiocianatas ir pentachlorfenolis, tačiau bandymų su šiomis medžiagomis rezultatai nepatvirtinti. Pentachlorfenolio naudoti nerekomenduojama, nes jo gryno gauti sunku.

▼M6

REZULTATŲ ATKURIAMUMAS

10. Per tarptautinį tarplaboratorinį bandymą (5) pakankamas EC_{50} verčių atkuriamumas dešimtyje dalyvavusių laboratorijų gautas naudojant tik 3,5-dichlorfenolį ir 2-brometansulfonrūgštį (pirmosios medžiagos EC_{50} verčių intervalas buvo 32–502 mg/l, antrosios – 220–2 190 mg/l).

Laboratorijų skaičius	mg/l			mg /l g dumblo		
	vidurkis	standartinis nuokrypis	variaciojos koeficientas (proc.)	vidurkis	standartinis nuokrypis	variacijos koeficientas (proc.)
	3,5-dichlorfenolis					
10	153	158	103	5	4,6	92
	2-brometansulfonrūgštis					
10	1 058	896	85	34	26	76

EC_{50} duomenys, gauti per tarplaboratorinį bandymą naudojant neskiestą dumblą.

11. Dideli variacijos koeficientai tarp laboratorijų daugiausia gaunami dėl nevienodo dumblo mikroorganizmų jautrio, kuris priklauso nuo to, ar tie mikroorganizmai jau pirmiau yra patyrę bandomosios cheminės medžiagos arba kitų chemiškai artimų medžiagų poveikį. EC_{50} vertė pagal dumblo koncentraciją buvo nustatyta tik truputį tiksliau negu „tūrinė“ vertė (mg/l). Visų trijų laboratorijų, pranešusių apie savo nustatytų 3,5-dichlorfenolio EC_{50} verčių tikslumą, nurodyti variacijos koeficientai (atitinkamai 22, 9 ir 18 % EC_{50} mg/g) buvo kur kas mažesni negu visų dešimties laboratorijų vidurkių. Šių trijų laboratorijų atskiri vidurkiai atitinkamai buvo 3,1, 3,2 ir 2,8 mg/g. Mažesni, priimtini variacijos koeficientai, nustatyti atskirose laboratorijose (9–22 %), palyginti su kur kas didesniais koeficientais, gautais gretinant įvairių laboratorijų nustatytas vertes (92 %), reiškia, kad atskiri dumblo ėminiai turi labai skirtingų savybių.

METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

12. Bandymui reikalinga įprasta laboratorinė įranga ir reikmenys:

a) inkubatorius – pagamintas iš nekibirkščiuojančių medžiagų, reguliuojamos 35 ± 2 °C temperatūros;

b) iš aukštam slėgiui atsparaus stiklo pagaminti bandymo indai – tinkamų vardinių matmenų ([1]), su dujoms nelaidžiais dengtais sandarikliais, galintys atlaikyti apie 2 bar arba 2×10^5 Pa slėgį (sandarikliai turėtų būti padengti, pvz., politetrafluoretenu, PTFE). Rekomenduojama naudoti stiklinius serumo buteliukus, kurių vardinis tūris 125 ml, o faktinis tūris apie 160 ml, užkemšamus serumo buteliukams skirtais sandarikliais ([2]), kurie sutvirtinami rangytais aliuminio žiedais; tačiau taip pat sėkmingai galima naudoti butelius, kurių bendras tūris yra 0,1–1 l;

([1]) Rekomenduojama naudoti 0,1–1 l tūrio indus.

([2]) Patartina naudoti dujoms nelaidžius silikoninius sandariklius. Taip pat patartina patikrinti butelių dangtelių, ypač butilkaučiuko sandariklių, nelaidumą dujoms, nes kai kurie rinkoje parduodami sandarikliai nėra pakankamai sandarūs ir praleidžia metano dujas, o kai kurie sandarikliai netenka sandarumo, bandymo sąlygomis pradūrus juos adata.

— Rekomenduojama naudoti dujoms nelaidžius dengtus sandariklius. Jie yra būtini atliekant lakiųjų cheminių medžiagų bandymus (kai kurie rinkoje parduodami sandarikliai yra gana ploni, mažiau nei 0,5 cm storio, ir netenka sandarumo, kai praduriami švirkšto adata).

— Butilkaučiuko (apie 1 cm storio) sandariklius rekomenduojama naudoti, kai bandomosios cheminės medžiagos nėra lakios (jie paprastai lieka nelaidūs dujoms ir po to, kai praduriami adata).

— Rekomenduojama prieš bandymą kruopščiai patikrinti, ar adata pradurti sandarikliai lieka nelaidūs dujoms.

▼M6

c) ypač tikslus slėgmatis [1] su įtaisu adatai;

bendras išskiriamų dujų (metano ir anglies dioksido) kiekis matuojamas slėgmačiu, pritaikytu susidariusioms dujoms matuoti ir išleisti iš indo. Tinkamo prietaiso pavyzdys – rankoje laikomas tikslusis slėgmatis su prijungta švirkšto adata ir įtaisytas trieigis dujoms nelaidus vožtuvas per dideliam slėgiui sumažinti (1 priedėlis). Svarbu, kad slėgio keitlio vamzdelių ir vožtuvo vidaus tūris būtų kuo mažesnis, taigi, neatsižvelgiant į įrangos vidaus tūrį, nebūtų padaryta reikšmingų klaidų;

d) izoliuotos talpos, skirtos nuotekas skaidančiajam dumblui transportuoti;

e) trieigiai slėgio reguliavimo vožtuvai;

f) sietas, pagamintas iš 1 mm dydžio kvadratinių akučių tinklelio;

g) talpa nuotekas skaidančiajam dumblui laikyti – iš stiklo arba didelio tankio polietileno pagamintas apie 5 l talpos butelis su įtaisytu maišikliu ir įranga azoto dujų srautui leisti (žr. 13 skirsnį) per viršerdvę;

h) membraniniai filtrai (0,2 μm dydžio akučių) substratui sterilizuoti;

i) mikrošvirkštai, naudojami slėgio keitliui sandariai prijungti (žr. 12 skirsnio c punktą) prie butelių viršerdvės (žr. 12 skirsnio b punktą), taip pat netirpioms skystoms bandomosioms medžiagoms įšvirkšti į butelius;

j) boksas (kamera su pirštinėmis) – jį naudoti rekomenduojama, bet neprivaloma. Jame turi būti palaikomas nedidelis teigiamas azoto dujų slėgis.

Cheminiai reagentai

13. Per visą bandymą turi būti naudojami analiziškai gryni cheminiai reagentai. Per visą bandymą reikėtų naudoti itin grynas azoto dujas, kuriose būtų mažiau nei 5 μl/l deguonies.

Vanduo

14. Jeigu reikia ką nors atskiesti, skiedimui naudokite dejonizuotą vandenį, kurį prieš naudojant būtina deaeruoti. Šio vandens tikrinti analizės metodais nebūtina, tačiau reikia užtikrinti vandens dejonizavimo aparato reguliarią techninę priežiūrą. Dejonizuotas vanduo turi būti naudojamas ir pradiniams tirpalams ruošti. Prieš dėdami anaerobinio dumblo pasėlį į bet kokius bandomosios medžiagos tirpalus arba skiedinius, įsitikinkite, kad juose nėra deguonies. Šiuo tikslu vieną valandą prieš dedant pasėlį per skiedimui skirtą vandenį (arba per skiedinius) pučiamas azoto dujų srautas arba skiedimui skirtas vanduo pakaitinamas iki virimo ir bedeguonėje aplinkoje ataušinamas iki kambario temperatūros.

Suskaidytas dumblas

15. Aktyvųjį nuotekas skaidantį dumblą imkite iš nuotekų valymo įrenginio metantanko arba, kitu atveju, iš laboratorinio metantanko, kuriame apdorojamas daugiausia buitinių nuotekų dumblas. Praktinės informacijos apie

[1] Slėgmatis turėtų būti naudojamas ir reguliariai kalibruojamas pagal gamintojo nurodymus. Jeigu naudojamas nustatyto tikslumo slėgmatis, pvz., su plieniniu aptaisu, laboratorijoje jo kalibruoti nereikia. Jį kalibruoti rekomenduojamais intervalais turėtų licenciją turintis institutas. Kalibravimo tikslumą galima patikrinti laboratorijoje atliekant matavimą viename taške, esant 1×10^5 Pa slėgiui, ir sutikrinant gautus rodmenis su kito slėgmačio mechaninio indikatoriaus rodmenimis. Jeigu matavimas tame taške atliekamas tiksliai, matavimo tiesiškumas taip pat nesikeičia. Jeigu naudojami kiti matavimo prietaisai (be gamintojo patvirtinto kalibravimo), patartina reguliariai perskaičiuoti visą jų rodmenų intervalą (2 priedėlis).

▼M6

dumblą iš laboratorinių metantankų galima rasti literatūroje (11). Jeigu ketinate naudoti adaptuoto dumblo pasėlį, apsvarstykite galimybę naudoti nuotekas skaidantį dumblą iš pramoninių nuotekų valymo įrenginio. Dumblą rinkite į plačiakaklius butelius, pagamintus iš didelio tankio polietileno ar iš panašios gebančios plėstis medžiagos. Į ėminiams skirtus butelius dumblo dėkite tiek, kad iki butelio viršaus liktų maždaug 1 cm tarpas, sandariai užkimškite, geriausia su apsauginiu vožtuvu (12 skirsnio e punktas), ir sudėkite į izoliuotas talpas (12 skirsnio d punktas), kad temperatūros svyravimai būtų kuo mažesni iki tol, kol dumblas bus perkeltas į inkubatorių, kuriame bus palaikoma 35 ± 2 °C temperatūra. Prieš atidarydami butelius, būtinai sumažinkite susikaupusių dujų slėgį, atsargiai išimdami kamštį arba naudodami trieigį slėginį vožtuvą (12 skirsnio e punktas). Dumblą patartina sunaudoti per kelias valandas nuo tada, kai jis surinktas, o jei ne, laikykite jį 35 ± 2 °C temperatūroje, viršerdvę virš dumblo pripildę azoto dujų, iki 3 dienų, per kurias dumblo aktyvumas paprastai nedaug tesumažėja.

Įspėjimas. Nuotekas skaidantis dumblas išskiria degias dujas, todėl kyla gaisro ir sprogimo pavojus. Dumble taip pat gali būti patogeninių mikroorganizmų, todėl dirbdami su dumblu naudokite tinkamas apsaugos priemones. Saugos tikslais nedėkite renkamo dumblo į stiklinius indus.

Pasėlis

16. Prieš pat naudodami dumblą, atsargiai jį pamaišykite ir perkoškite per 1 mm^2 dydžio akučių sietą (12 skirsnio f punktas) į tinkamą butelį (12 skirsnio g punktas), per kurio viršerdvę turi būti leidžiamas azoto dujų srautas. Paimkite dumblo pavyzdį bendrajai sausų kietųjų medžiagų koncentracijai išmatuoti (žr., pvz., ISO 11 923 (13) arba lygiavertį ES standartą). Apskritai reikėtų naudoti neskiestą dumblą. Įprasta kietųjų medžiagų koncentracija dumble yra 2–4 % (masės proc.). Patikrinkite dumblo pH vertę ir prireikus ją patikslinkite iki 7 ± 0,5.

Bandymo substratas

17. Dejonizuotame vandenyje ištirpinkite 10 g mitybinių medžiagų sultinio koncentrato (pvz., „Oxoid“), 10 g mielių ekstrakto ir 10 g D-gliukozės ir atskieskite iki 100 ml tūrio. Sterilizuokite perfiltruodami per 0,2 μm dydžio akučių membraninį filtrą (12 skirsnio h punktas) ir naudokite iškart arba ne ilgiau kaip 1 dieną laikykite 4 °C temperatūroje.

Bandomoji cheminė medžiaga

18. Kiekvienai vandenyje tirpiai bandomajai cheminei medžiagai paruoškite atskirą pradinį tirpalą, pvz., 10 g cheminės medžiagos 1 litre skiedimui tinkamo vandens, iš kurio pašalintas deguonis (14 skirsnis). Tinkamus šių pradinių tirpalų kiekius naudokite nustatytų koncentracijų reakcijos mišiniams ruošti. Kitu atveju iš kiekvieno pradinio tirpalo paruoškite atskiestų tirpalų seriją, kad į bandymo butelius pilamo skysčio tūris būtų vienodas kiekvienai reikiamai galutinei koncentracijai pasiekti. Jeigu reikia, pradinių tirpalų pH turėtų būti patikslintas iki 7 ± 0,2.

19. Atlikdami vandenyje nepakankamai tirpių cheminių medžiagų bandymus remkitės ISO 10 634 (12) arba lygiaverčiu ES standartu. Jeigu reikia naudoti organinį tirpiklį, venkite tokių tirpiklių kaip chloroformas ir anglies tetrachloridas, kurie, kaip žinoma, itin slopina metano išskyrimą. Vandenyje netirpios cheminės medžiagos reikiamos koncentracijos tirpalą paruoškite naudodami tinkamą lakų tirpiklį, pvz., acetoną ar dietileterį. Reikiamus tirpiklio tirpalo kiekius įpilkite į tuščius bandymo butelius (12 skirsnio b punktas) ir, prieš dėdami dumblą, tirpiklį išgarinkite. Kitas procedūras atlikite pagal ISO 10 634 (12) arba lygiavertį ES standartą, tačiau atminkite, kad bet kokios emulsijoms ruošti naudojamos paviršinio aktyvumo medžiagos gali slopinti anaerobinį dujų išskyrimą. Jeigu manoma, kad naudojant organinius tirpiklius ir emulsiklius atsirastų artefaktų, bandomąją cheminę medžiagą galima dėti tiesiai į bandomąjį mišinį miltelių arba skystu pavidalu. Lakias ir vandenyje netirpias skystas chemines medžiagas galima įšvirkšti į serumo buteliukus su pasėliu naudojant mikrošvirkštus (12 skirsnio i punktas).

▼M6

20. Sudėję bandomąsias chemines medžiagas į butelius, turėtumėte gauti geometrinę koncentracijos verčių progresiją, pvz., 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l ir 15,6 mg/l. Jeigu panašių cheminių medžiagų toksiškumo intervalas nežinomas, pirmiausia atlikite išankstinį intervalo nustatymo bandymą, naudodami 1 000 mg/l, 100 mg/l ir 10 mg/l bandomosios medžiagos koncentracijas, kad nustatytumėte tinkamą intervalą.

Etaloninė cheminė medžiaga

21. Paruoškite 3,5-dichlorfenolio vandeninį tirpalą (10 g/l) – pamažu užpilkite kietąją medžiagą minimaliu 5 mol/l natrio hidroksido tirpalo kiekiu ir purtykite, kol ištirps. Tada įpilkite skiedimui tinkamo vandens, iš kurio pašalintas deguonis (14 skirsnis), iki reikiamo tūrio; tirpimą gali palengvinti apdorojimas ultragarsu. Kitas etalonines chemines medžiagas galima naudoti tada, kai yra nustatytas vidutinis jų EC_{50} verčių intervalas per mažiausiai tris bandymus, naudojant skirtingus pasėlius (gautus iš skirtingų šaltinių arba surinktus skirtingu laiku).

TRUKDŽIAI IR KLAIDOS

22. Manoma, kad kai kurios dumblo sudedamosios dalys gali reaguoti su potencialiais inhibitoriais ir padaryti juos neprieinamus mikroorganizmams, todėl jų slopinamasis poveikis būtų mažesnis arba jo visai nebūtų. Taip pat klaidingi rezultatai būtų gauti tuo atveju, jeigu dumble jau yra slopinamąjį poveikį turinčios cheminės medžiagos, kai ta pati cheminė medžiaga naudojama atliekant bandymą. Klaidingų rezultatų galima gauti ne tik šiais atvejais, bet ir dėl kelių kitų nustatytų veiksnių. Jie išvardyti 3 priedėlyje kartu su metodais, kaip galima išvengti klaidų ar bent jas sumažinti.

BANDYMO PROCEDŪRA

23. Reikiamų kartotinių bandinių skaičius priklauso nuo to, kiek preciziški turi būti slopinimo rodikliai. Jeigu butelių kamščiai yra pakankamai sandarūs ir per visą bandymo trukmę nepraleidžia dujų, pakanka paruošti po vieną kiekvienos reikiamos koncentracijos bandymo butelių partiją (bent po tris kartotinius bandinius). Taip pat paruoškite vieną butelių partiją su etalonine chemine medžiaga ir vieną kontrolinių bandinių grupę. Tačiau jeigu butelių kamščiai lieka sandarūs pradūrus juos tik vieną ar kelis kartus, paruoškite po atskirą bandymo butelių partiją (pvz., po tris kartotinius bandinius) kiekvienam intervalui (*t*), kuriam reikia gauti visų bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų rezultatus. Taip pat paruoškite *t* butelių partijas su etalonine chemine medžiaga ir kontroliniais bandiniais.

24. Rekomenduojama naudoti boksą (12 skirsnio j punktas). Likus bent 30 min. iki bandymo pradžios, pradėkite leisti azoto dujų srautą per boksą, kuriame turi būti surinkta visa reikiama įranga. Užtikrinkite, kad tvarkant ir užkemšant butelius dumblo temperatūra visą laiką būtų 35 ± 2 °C.

Išankstinis bandymas

25. Jeigu dumblo aktyvumas nežinomas, rekomenduojama atlikti išankstinį bandymą. Paruoškite kontrolinius bandinius, kuriuose kietųjų medžiagų koncentracijos būtų, pvz., 10 g/l, 20 g/l ir 40 g/l, į juos įdėkite substrato, tačiau nedėkite bandomosios cheminės medžiagos. Taip pat naudokite nevienodus reakcijos mišinio kiekius, kad gautumėte tris arba keturis skirtingus butelio viršerdvės ir skysčio tūrio santykius. Pagal įvairiais laiko intervalais susidariusių dujų kiekius nustatomos tinkamiausios sąlygos, kuriomis galima dukart per dieną atlikti matavimus, susidarius pakankamiems dujų kiekiams, ir išleisti slėgį kartą per dieną, užtikrinant optimalų jautrį ([1]) ir nerizikuojant, kad buteliai susprogs.

Bandomųjų cheminių medžiagų dėjimas

26. Vandenyje tirpias bandomąsias chemines medžiagas į tuščius bandymo butelius (12 skirsnio b punktas) įpilkite vandeninių tirpalų sudėtyje (18 punktas). Kiekvienos pasirinkto intervalo koncentracijos kartotinių bandinių butelių turėtų būti ne mažiau kaip po tris (20 skirsnis). Vandenyje netirpių ir mažai tirpių bandomųjų medžiagų, ištirpintų organiniuose tirpikliuose, tirpalus įšvirkškite į tuščius butelius naudodami mikrošvirkštą, kad gautumėte kiekvienos iš penkių bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų

([1]) Tai tokios pasirengimo bandymui ir bandymo sąlygos, kai susidariusius dujų kiekius tuščiuose kontroliniuose bandiniuose ir induose, kuriuose vyksta 70–80 % slopinimas, galima įvertinti su priimtino dydžio paklaidomis.

▼M6

kartotinių bandinių rinkinius. Tirpiklį iš bandymo butelių išgarinkite leisdami azoto dujų srautą virš tirpalų paviršiaus. Kitu atveju pasvertus tinkamus netirpių kietųjų cheminių medžiagų kiekius įdėkite tiesiai į bandymo butelius.

27. Jeigu vandenyje netirpios ir mažai tirpios skystos bandomosios cheminės medžiagos dedamos nenaudojant tirpiklio, įšvirkškite jas mikrošvirkštu tiesiai į bandymo butelius po to, kai į juos įdėtas pasėlis ir bandymo substratas (žr. 30 skirsnį). Lakias bandomąsias chemines medžiagas galima įleisti į butelius tokiu pačiu būdu.

Pasėlio ir substrato dėjimas

28. Sumaišykite reikiamą per sietą perkošto nuotekas skaidančio dumblo kiekį (žr. 16 skirsnį) 5 litrų butelyje (12 skirsnio g punktas), per jo viršerdvę leisdami azoto dujų srautą. Į bandymo butelius, į kuriuos supilti bandomųjų cheminių medžiagų vandeniniai tirpalai arba tirpalai, kuriuose naudotas ir vėliau išgarintas tirpiklis, pūskite azoto dujų srautą maždaug dvi minutes, kad pašalintumėte orą. Į bandymo butelius paskirstykite gerai sumaišyto dumblo alikvotines dalis, pvz., po 100 ml, naudodami pipetę dideliu antgaliu arba matavimo cilindrą. Svarbu vienu kartu įtraukti į pipetę reikiamą dumblo kiekį, nes kietosios dumblo dalelės greitai nugrimzta į dugną. Jei paėmėte daugiau dumblo, negu reikia, ištuštinkite pipetę ir pradėkite iš naujo.

29. Tada, tebepūsdami azoto dujas, įpilkite pakankamą substrato tirpalo kiekį (17 skirsnis), kad mišinyje būtų po 2 g/l mitybinių medžiagų sultinio, mielių ekstrakto ir D-gliukozės koncentracija. Toliau pateiktas bandinių partijų ruošimo pavyzdys.

Galutinė bandomosios cheminės medžiagos masės koncentracija bandymo buteliuose (mg/l)	Bandomosios cheminės medžiagos tūris (ml)		Reagentai ir terpės (ml)		
	Pradinis tirpalas a) 10 g/l 18 skirsnis	Pradinis tirpalas b) 1 g/l 18 skirsnis	Skiedimui tinkamas vanduo 14 skirsnis	Pasėlis 16 skirsnis	Substratas 17 skirsnis
0	—	0	1,0	100	2
1	—	0,1	0,9	100	2
3,3	—	0,33	0,67	100	2
10	0,1	—	0,9	100	2
33	0,33	—	0,67	100	2
100	1,0	—	0	100	2

Bendras butelio tūris – 160 ml. Skysčio tūris – 103 ml.
Dujų tūris – 57 ml, arba 35,6 % bendrojo tūrio.

30. Taip pat paruoškite pakankamai tuščių bandymo butelių ir pūskite per juos azoto dujas, kai naudojate bet kokią lakią arba netirpią skystą bandomąją cheminę medžiagą (žr. 27 skirsnį).

▼M6

Kontroliniai bandiniai ir etaloninė cheminė medžiaga

31. Paruoškite mažiausiai trijų kartotinių butelių rinkinius tik su dumblu ir substratu, kaip kontrolinius bandinius. Taip pat paruoškite papildomų kartotinių bandinių butelius su dumblu ir substratu, į kuriuos būtų įpilta pakankamai etaloninės cheminės medžiagos 3,5-dichlorfenolio (21 skirsnis) pradinio tirpalo, kad būtų gauta galutinė 150 mg/l koncentracija. Tokia koncentracija turėtų apie 50 % slopinti dujų išskyrimą. Kitu atveju sudarykite etaloninės cheminės medžiagos koncentracijų intervalą. Be to, paruoškite keturis papildomus butelius pH matuoti – į juos turi būti dedama dumblo, vandens, iš kurio pašalintas deguonis, ir substrato. Į du iš šių butelių įdėkite didžiausią bandymui pasirinktą bandomosios medžiagos koncentraciją, o į likusius du butelius įpilkite vandens, iš kurio pašalintas deguonis.

32. Įsitikinkite, kad visuose – bandomosios bei etaloninės cheminių medžiagų ir kontrolinių bandinių – buteliuose skysčio tūris (V_R) yra vienodas; kai reikia, įpilkite dejonizuoto vandens, iš kurio pašalintas deguonis (14 skirsnis), iki reikiamo tūrio. Viršerdvė turėtų sudaryti 10–40 % butelio tūrio; tikslus santykis nustatomas remiantis išankstinio bandymo duomenimis. Sudėję visas sudedamąsias dalis į butelius, ištraukite adatą, per kurią pučiamos dujos, ir užkimškite kiekvieną butelį guminiu kamščiu su aliuminio gaubteliu (12 skirsnio b punktas), sudrėkinę kamštį dejonizuoto vandens lašu, kad jį būtų lengviau įstatyti. Sumaišykite kiekvieno butelio turinį jį papurtydami.

Butelių inkubavimas

33. Perkelkite butelius į termostatu reguliuojamą inkubatorių (geriausia su purtykle) ir palaikykite jame 35 ± 2 °C temperatūrą Buteliai inkubuojami tamsoje. Praėjus maždaug 1 valandai, suvienodinkite slėgį buteliuose su atmosferos slėgiu: paeiliui pradurkite prie slėgmačio pritvirtinta švirkšto adata (12 skirsnio c punktas) kiekvieno butelio kamštį, atidarykite vožtuvą, palaukite, kol slėgmačio rodmuo pasieks nulį, ir galiausiai vėl uždarykite vožtuvą. Adatą reikėtų įstatyti maždaug 45° kampu, kad iš butelių neišeitų dujos. Jeigu butelių inkubatorius yra be purtyklės, rankomis juos papurtykite dukart per dieną per visą inkubacinį periodą, taip palaikydami sistemos pusiausvyrą. Inkubuojamus butelius apverskite, kad per sandariklį neišeitų dujų, tačiau apversti butelius netinka tais atvejais, kai netirpios bandomosios cheminės medžiagos gali prikibti prie butelio dugno.

Slėgio matavimas

34. Kai buteliuose pasiekiama 35 ± 2 °C temperatūra, išmatuokite ir užrašykite dviejų iš keturių šiam tikslui paruoštų butelių turinio pH ir tada jų turinį pašalinkite; likusius butelius toliau inkubuokite tamsoje. Per vėlesnį 48–72 val. laikotarpį dukart per dieną išmatuokite ir užrašykite slėgį buteliuose, paeiliui įsmeigdami slėgmačio adatą per kiekvieno butelio kamštį, tarp matavimų adatą išdžiovindami. Atliekant matavimus, visos butelio dalys turi būti laikomos toje pačioje temperatūroje, kaip ir per inkubaciją; matavimą reikėtų stengtis atlikti kuo greičiau. Palaukite, kol nusistovės slėgio rodmuo, ir jį užrašykite, tada atidarykite vožtuvą, kad išleistumėte dujų perteklių, ir vėl uždarykite, kai slėgio rodmuo pasieks nulį. Bandymas paprastai tęsiamas 48 valandas po pirmojo slėgio suvienodinimo (pažymėto kaip „nulinis laikas“). Per lakiųjų cheminių medžiagų bandymus matavimą ir dujų išleidimą reikėtų atlikti tik vieną kartą (inkubacinio periodo pabaigoje) arba du kartus, kad būtų prarasta kuo mažiau bandomosios cheminės medžiagos (10).

35. Jeigu slėgio rodmuo yra neigiamas, vožtuvo neatidarykite. Kartais švirkšto adatoje ir vamzdelyje susikaupia šiek tiek drėgmės, todėl slėgmačio rodmuo parodo mažą neigiamą slėgį. Tokiu atveju išimkite adatą, papurtykite vamzdelį, nusausinkite servetėle ir įdėkite naują adatą.

pH matavimas

36. Po paskutinio slėgio matavimo išmatuokite ir užrašykite kiekvieno butelio turinio pH vertę.

▼M6

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų išraiška

37. Apskaičiuokite per kiekvieną laiko intervalą kiekviename kartotinių bandinių butelių rinkinyje nustatytų ir užrašytų slėgio rodmenų sumą bei vidurkį ir apskaičiuokite kiekvieno kartotinių bandinių rinkinio bendrąjį vidutinį dujų slėgį per kiekvieną laiko intervalą. Nubrėžkite kontrolinės, bandomosios ir etaloninės grupių butelių bendrojo vidutinio dujų išskyrimo (išreikšto paskaliais, Pa) kreives kaip laiko funkciją. Tiesinėje kreivės dalyje pažymėkite tam tikrą laiko vienetą, paprastai 48 valandas, ir apskaičiuokite kiekvienos bandomosios medžiagos koncentracijos sukeltą procentinį slopinimą (I) pagal lygtį [1]:

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

kurioje:

I procentinis slopinimas (%);

P_t naudojant bandomąją medžiagą susidariusių dujų slėgis pasirinktu laiku, išreikštas paskaliais (Pa);

P_c kontrolinėje grupėje susidariusių dujų slėgis tuo pačiu laiku, išreikštas paskaliais (Pa);

Patartina nubrėžti abu grafikus, t. y. I grafiką kaip koncentracijos funkciją ir kartu grafiką kaip koncentracijos logaritmo funkciją, kad būtų galima pasirinkti tiesiškumui artimiausią kreivę. Įvertinkite EC_{50} (mg/l) vertę iš akies arba atlikdami regresinę analizę pagal tiesiškumui artimesnę kreivę. Siekiant palyginamumo, cheminės medžiagos koncentraciją gali būti naudingiau išreikšti kaip tos cheminės medžiagos kiekio (mg) ir bendro sausų kietųjų medžiagų kiekio (g) santykį. Šią koncentraciją gausite padaliję bandomosios medžiagos tūrinę koncentraciją (mg/l) iš sausų dumblo kietųjų medžiagų tūrinės koncentracijos (g/l) (16 skirsnis).

38. Apskaičiuokite procentinį slopinimą, esant vienintelei pasirinktai etaloninės cheminės medžiagos koncentracijai, arba EC_{50}, jeigu tyrimui pasirinkta pakankamai koncentracijos verčių.

39. Vidutinį kontroliniame bandinyje susidariusių dujų slėgį P_c(Pa) paverskite tūriu remdamiesi slėgmačio kalibravimo kreive (2 priedėlis) ir pagal tai apskaičiuokite dujų išeigą, kuri išreiškiama dujų tūriu, susidariusiu per 48 valandas iš 100 ml neskiesto dumblo, kurio kietųjų medžiagų koncentracija yra nuo 2 % (20 g/l) iki 4 % (40 g/l).

Tinkamumo kriterijai

40. Iš ISO tarplaboratorinio bandymo (5) rezultatų žinoma, kad etaloninė cheminė medžiaga (3,5-dichlorfenolis) 50 % nuslopino dujų išskyrimą esant 32–510 mg/l koncentracijų intervalui ir 153 mg/l vidurkiui (10 skirsnis). Tai toks platus intervalas, kad neįmanoma patikimai nustatyti aiškių slopinimo ribinių verčių kaip bandymo tinkamumo kriterijų; tai turėtų būti įmanoma tada, kai bus sužinota, kaip gauti vienodesnius pasėlius. Kontrolinės grupės buteliuose per 48 valandas susidariusių dujų tūris siekė nuo 21 ml/g iki 149 ml vienam kietos dumblo medžiagos gramui (vidurkis – 72 ml/g). Nenustatyta aiškaus ryšio tarp susidariusių dujų kiekio ir atitinkamos EC_{50} vertės; bandymo pabaigoje išmatuotas pH buvo nuo 6,1 iki 7,5.

41. Bandymas pripažįstamas tinkamu, kai etaloniniame kontroliniame bandinyje, į kurį dėta 150 mg/l 3,5-dichlorfenolio, nustatytas slopinimas yra didesnis negu 20 %, tuščiame kontroliniame bandinyje susidaro daugiau kaip 50 ml dujų vienam kietosios medžiagos gramui, o pH vertė bandymo pabaigoje yra nuo 6,2 iki 7,5.

Bandymo ataskaita

42. Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta toliau nurodyta informacija.

Bandomoji cheminė medžiaga

— Bendrinis pavadinimas, cheminis pavadinimas, CAS numeris, struktūrinė formulė, atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės.

▼M6

— Bandomosios cheminės medžiagos grynumas (priemaišos).

Bandymo sąlygos

— Bandymo induose esančio skysčio ir viršerdvės tūrio santykis.

— Bandymo indų ir dujų matavimo aprašymai (pvz., kokios rūšies slėgmatis naudojamas).

— Bandomosios cheminės medžiagos ir etaloninės cheminės medžiagos naudojimas bandymo sistemoje, bandymui pasirinktos koncentracijos ir bet kokių tirpiklių naudojimas.

— Informacija apie naudotą pasėlį: nuotekų valymo įrenginio pavadinimas, jame valomų nuotekų šaltinio aprašymas (pvz., įrenginio eksploatavimo temperatūra, dumblo laikymo trukmė, ar tai daugiausia buitinės nuotekos, ar pramonės atliekos, ir t. t.), dumblo kietųjų medžiagų koncentracija, dujų susidarymo aktyvumas anaerobiniame metantanke, ankstesnis nuodingųjų cheminių medžiagų poveikis ar galimas prisitaikymas prie jų arba, jeigu naudojamas natūralus dumblas, nuosėdos ar kt. – iš kokios vietos paimti tie ėminiai.

— Inkubacijos temperatūra ir trukmė.

— Kartotinių bandinių skaičius.

Rezultatai

— Bandymo pabaigoje nustatytos pH vertės.

— Visi matavimais nustatyti bandomosios grupės, tuščių kontrolinių bandinių ir etaloninės cheminės medžiagos kontrolinių bandinių indų duomenys, tinkamai pateikti (pvz., slėgis išreikštas paskaliais arba milibarais) lentelėse.

— Buteliuose su bandomąja medžiaga ir etalonine medžiaga nustatytas procentinis slopinimas ir slopinimo bei koncentracijos santykio kreivės.

— EC_{50} verčių, išreiškiamų mg/l ir mg/g, apskaičiavimas.

— Vienam gramui dumblo per 48 valandas susidariusių dujų kiekis.

— Jei kurie nors bandymo rezultatai atmesti kaip netinkami – jų atmetimo priežastys.

— Rezultatų aptarimas, be kita ko, paaiškinant bet kokius nukrypimus nuo šio bandymo metodo procedūrų ir aptariant bet kokius atvejus, kai bandymo rezultatai neatitinka prognozių dėl įvairių trukdžių ir klaidų.

— Taip pat nurodykite, ar per bandymą siekta išmatuoti bandomosios medžiagos toksiškumą tos medžiagos jau pirmiau paveiktiems, ar jos poveikio dar nepatyrusiems mikroorganizmams.

NUORODOS

(1) Šio priedo C.11 skyrius. Aktyviojo dumblo kvėpavimo slopinimo bandymas.

(2) Šio priedo C.43 skyrius. Organinių junginių anaerobinis biologinis skaidumas suskaidytame dumble. Dujų susidarymo matavimo metodas.

(3) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1: General Test.

(4) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-2 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 2: Test for low biomass concentrations.

(5) ISO (2000) Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.

▼**M6**

(6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. Wat. Pollut. Control, 70, 58-70.

(7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, In: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.

(8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Env. Microbiol. 47 850-857.

(9) Battersby NS and Wilson V (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. Chemosphere 17, 2441-2460.

(10) Wilson V, Painter HA and Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods, GSF Forschungzentrum, Neuherberg, Germany (1990). Eds. Steinberg C and Kettrup A, pp117-132 (1992).

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

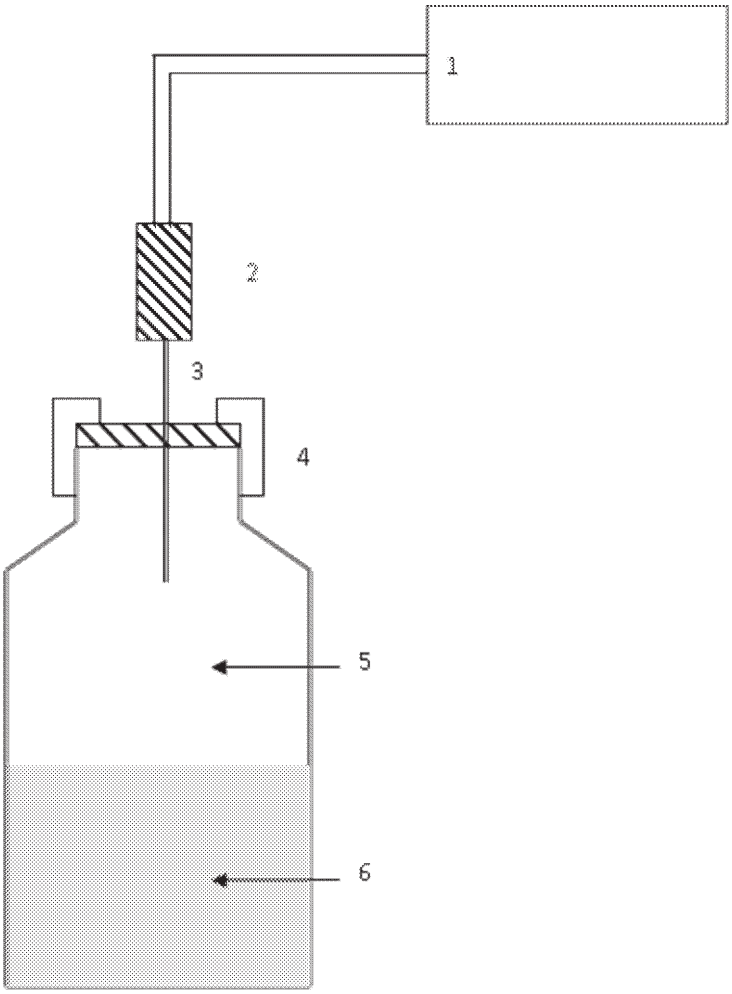
(12) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(13) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

1 priedėlis

Biodujų susidarymui matuoti pagal dujų slėgį skirto aparato pavyzdys



Paaiškinimas:

1 – slėgmatis

2 – trieigis dujoms nelaidus vožtuvas

3 – švirkšto adata

4 – dujoms nelaidus kamštis (rangytos vielos dangtelis ir sandariklis)

5 – viršerdvė

6 – suskaidyto dumblo pasėlis

Bandymo indai laikomi 35 ± 2 °C temperatūros aplinkoje.

▼M6

2 priedėlis

Slėgmačio rodmenų perskaičiavimas

Slėgmačio rodmenis galima susieti su dujų tūrio vertėmis naudojant standartinę kreivę ir taip galima apskaičiuoti vienam sauso dumblo gramui (g) per 8 valandas tenkantį susidariusių dujų tūrį. Šis dumblo aktyvumo rodiklis naudojamas kaip vienas iš kriterijų, pagal kuriuos vertinamas bandymo rezultatų tinkamumas. Kalibravimo kreivė gaunama įšvirkščiant žinomo tūrio dujų kiekius, esant 35 ± 2 °C temperatūrai, į serumo buteliukus su vandeniu, kurio tūris yra lygus reakcijos mišinio tūriui V_R;

— į penkis serumo buteliukus išpilstykite V_R ml alikvotines dalis 35 ± 2 °C temperatūroje laikyto vandens. Buteliukus užkimškite ir pastatykite į 35 ± 2 °C temperatūros vandens vonelę vienai valandai, kad nusistovėtų pusiausvyra;

— įjunkite slėgmatį, palaukite, kol nusistovės rodmenys, ir nustatykite nulį;

— įsmeikite švirkšto adatą per vieno iš buteliukų kamštį, atidarykite vožtuvą, palaukite, kol slėgmačio rodmuo pasieks nulį, ir uždarykite vožtuvą;

— pakartokite tą pačią procedūrą likusiuose buteliukuose;

— į kiekvieną buteliuką įšvirkškite po 1 ml 35 ± 2 °C temperatūros oro. Įbeskite (matuoklio) adatą per vieno iš buteliukų kamštį ir palaukite, kol nusistovės slėgio rodmuo. Užrašykite slėgį, atidarykite vožtuvą, palaukite, kol slėgio rodmuo pasieks nulį, ir uždarykite vožtuvą;

— pakartokite tą pačią procedūrą likusiuose buteliukuose;

— pakartokite visą šią procedūrą naudodami 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml ir 50 ml oro;

— nubrėžkite slėgio (Pa) perskaičiavimo pagal įleistų dujų tūrį (ml) kreivę. Gautas instrumento atsakas yra tiesinis 0–70 000 Pa intervale ir nuo 0 ml iki 50 ml susidariusių dujų tūrio.

▼M6

3 priedėlis

Nustatyti veiksniai, dėl kurių gali būti gauti klaidingi rezultatai

a) *Butelių dangtelių kokybė*

Rinkoje parduodami įvairių rūšių sandarikliai serumo buteliukams; daugelis jų, įskaitant butilkaučiuko sandariklius, netenka sandarumo, kai praduriami adata šio bandymo sąlygomis. Kartais, pradūrus sandariklį švirkšto adata, slėgis mažėja labai lėtai. Kad nebūtų nuotėkio, rekomenduojama naudoti dujoms nelaidžius sandariklius (12 skirsnio b punktas).

b) *Švirkšto adatoje susikaupusi drėgmė*

Kartais švirkšto adatoje ir vamzdelyje susikaupia šiek tiek drėgmės, todėl slėgmačio rodmuo parodo mažą neigiamą slėgį. Tokiu atveju išimkite adatą, papurtykite vamzdelį, nusausinkite servetėle ir įdėkite naują adatą (12 skirsnio c punktas ir 35 skirsnis).

c) *Deguonies priemaišos*

Atliekant bandymus anaerobiniais metodais, galima padaryti klaidų, jeigu yra deguonies priemaišų, dėl kurių gali sumažėti dujų išskyrimas. Taikant šį metodą, tokių klaidų tikimybę reikėtų sumažinti, griežtai laikantis anaerobinių technologijų, be kita ko, naudojant boksą (kamerą su pirštinėmis).

d) *Stambios dalelės dumblo substratuose*

Anaerobiniam dujų išskyrimui ir dumblo jautriui daro įtaką substratai, kartu su pasėliu dedami į bandymo butelius. Suskaidytame dumble, paimtame iš buitinių nuotekų anaerobinio valymo metantankų, dažnai tebėra neasimiliuotų medžiagų, kaip antai plaukų ir augalinių celiuliozės liekanų, dėl kurių paimti reprezentatyvius ėminius paprastai yra sunku. Šias netirpias kietąsias medžiagas galima pašalinti perkošiant dumblą per sietą – taip labiau tikėtina, kad pavyks paimti reprezentatyvius ėminius (16 skirsnis).

e) *Lakios bandomosios cheminės medžiagos*

Lakios bandomosios cheminės medžiagos bandymo buteliuose išsiskiria į viršerdvę, todėl dalis bandomosios cheminės medžiagos gali pasišalinti iš sistemos išleidžiant dujas po slėgio matavimų. Dėl to gali būti gautos klaidingai didelės EC_{50} vertės. Tokių klaidų tikimybę galima sumažinti pasirinkus tinkamą viršerdvės ir skysčio tūrio santykį ir neišleidžiant dujų po slėgio matavimų (10).

f) *Dujų susidarymo kreivės netiesiškumas*

Jeigu vidutinio bendrojo dujų susidarymo per inkubacinį periodą grafiko kreivė 48 val. laikotarpiu nėra artima tiesei, tai reiškia, kad gali būti sumažėjęs bandymo tikslumas. Siekiant išspręsti šią problemą, gali būti patartina naudoti nuotekas skaidantį dumblą iš kito šaltinio ir (arba) padidinti bandymo substrato ir mitybinių medžiagų sultinio, mielių ekstrakto ir gliukozės koncentraciją (29 skirsnis).

▼M6

4 priedėlis

Šio bandymo metodo taikymas mažos biomasės koncentracijos ėminiams, paimtiems iš aplinkos – natūralaus anaerobinio dumblo, dugninių nuosėdų ir kt.

ĮVADAS

A.1 Gamtoje natūraliai susidariusio anaerobinio dumblo, dugninių nuosėdų, dirvožemio ir kt. savitasis mikroorganizmų aktyvumas (vienam sausų kietųjų medžiagų gramui susidariusių dujų tūris) apskritai yra kur kas mažesnis negu iš nuotekų gauto anaerobinio dumblo aktyvumas. Todėl, kai reikia vertinti cheminių medžiagų slopinamąjį poveikį šio mažiau aktyvaus dumblo ėminiams, būtina pakeisti kai kurias bandymo sąlygas. Bandymus su šiais mažiau aktyviais ėminiais apskritai galima atlikti dvejopai:

a) atlikti iš dalies pakeistą išankstinį bandymą (25 skirsnis) naudojant neskiestą natūralaus dumblo, dirvožemio ar kt. ėminį, palaikant 35 ± 2 °C temperatūrą arba tokią pačią temperatūrą, kokia buvo toje vietoje, iš kurios paimtas ėminys, siekiant tiksliau imituoti aplinkos sąlygas (kaip tai daroma pagal ISO 13 641 standarto 1 dalį); arba

b) atlikti bandymą naudojant atskiestą (1:100 santykiu) iš metantanko paimtą dumblą, imituojant mažą iš aplinkos paimtam ėminiui būdingą aktyvumą, tačiau palaikant 35 ± 2 °C temperatūrą (kaip tai daroma pagal ISO 13 641 standarto 2 dalį).

A.2 Pagal čia aprašytąjį metodą galima rinktis a variantą (atitinkantį ISO 13 641 standarto 1 dalį), tačiau būtina atlikti išankstinį bandymą (25 skirsnis), siekiant nustatyti optimalias bandymo sąlygas, nebent jos būtų jau žinomos iš ankstesnių bandymų. Natūralaus dumblo arba dugninių nuosėdų ėminys turėtų būti kruopščiai sumaišytas, pvz., maišytuvu, ir, jei reikia, atskiestas nedideliu deaeruoto skiedimui tinkamo vandens kiekiu (14 skirsnis), kad būtų pakankamai skystas, taigi jį būtų galima perkelti naudojant pipetę stambiu galu arba matavimo cilindrą. Jeigu manoma, kad gali pritrūkti mitybinių medžiagų, natūralaus dumblo ėminį galima centrifuguoti (anaerobinėmis sąlygomis) ir resuspenduoti mineralinėje terpėje, į kurią dėta mielių ekstrakto (A.11).

A.3 Pasirinkus b variantą, pakankamai tiksliai imituojamas mažas iš aplinkos paimtų ėminių aktyvumas, tačiau tokiuose ėminiuose nėra didelės suspenduotų kietųjų medžiagų koncentracijos. Šių kietųjų medžiagų įtaka cheminės medžiagos slopinamajam poveikiui nežinoma, tačiau įmanoma, kad bandomosioms cheminėms medžiagoms reaguojant su natūralaus dumblo sudedamosiomis dalimis ir įsigeriant į kietųjų medžiagų paviršių, gali sumažėti tų bandomųjų cheminių medžiagų toksiškumas.

A.4 Kitas svarbus veiksnys yra temperatūra: siekiant tiksliai imituoti aplinkos sąlygas, bandymus reikėtų atlikti tokioje temperatūroje, kokia yra toje vietoje, iš kurios paimtas ėminys, nes yra žinoma, kad įvairių metaną išskiriančių bakterijų populiacijų aktyvumo temperatūros intervalai skiriasi, t. y. jos skirstomos į šilumamėges (~ 30–35 °C), vidutinę temperatūrą mėgstančias (20–25 °C) ir šaltamėges (< 20 °C) bakterijas ir tai gali lemti skirtingus slopinimo duomenis.

A.5 Trukmė. Atliekant bendrąjį bandymą (1 dalis), naudojant neskiestą dumblą, dujų per 2–4 dienas visada susidarydavo pakankamai, o atliekant bandymą pagal 2 dalį, naudojant iki 1/100 atskiestą dumblą, tuo pačiu laikotarpiu per tarplaboratorinį bandymą dujų susidarė nepakankamai daug arba jų visai nebuvo. Kaip pastarojo bandymo apibūdinime nurodė Madsen ir kt. (1996), jam reikėtų skirti bent 7 paras.

Mažos biomasės koncentracijos bandymai (b variantas)

Šiuo atveju reikėtų atlikti toliau aprašytus pakeitimus ir pataisas, papildant arba pakeičiant kai kurias pagrindinio teksto dalis ir punktus.

▼**M6**

A.6 6 skirsnis „BANDYMO PRINCIPAS“ papildomas šiuo tekstu:

„Pagal šį metodą galima naudoti 1:100 santykiu atskiestą anaerobinį dumblą, iš dalies siekiant imituoti mažą natūralaus dumblo ir dugninių nuosėdų aktyvumą. Inkubavimo temperatūra gali būti 35 °C arba tokia pati, kokia buvo toje vietoje, iš kurios paimtas ėminys. Kadangi bakterijų aktyvumas yra kur kas mažesnis negu neskiestame dumble, inkubacinį periodą reikėtų pratęsti bent iki 7 parų.“

A.7 12 skirsnio a punktas papildomas šiuo tekstu:

„inkubatoriaus temperatūros intervalo žemutinė riba turėtų siekti iki 15 °C“.

A.8 Po 13 skirsnio įrašomas papildomas reagentas:

„Fosforo rūgštis (H_3PO_4), 85 % (masės) vandeninis tirpalas.“

A.9 16 skirsnio pabaigoje įrašoma:

„Galutinė bendra sausų kietųjų medžiagų koncentracija per bandymą turėtų būti 0,20 ± 0,05 g/l.“

A.10 17 skirsnis. Bandymo substratas

Šio substrato naudoti nereikia, jis pakeičiamas mielių ekstraktu (žr. 17 skirsnį; A.11, A.12, A.13).

A.11 Anaerobiniam dumblui skiesti būtina naudoti mineralinių medžiagų terpę su mikroelementais. Dėl patogumo į šią terpę dedama organinio substrato – mielių ekstrakto.

Po 17 skirsnio įterpiamas toks tekstas:

„a) bandymo mineralinė terpė su mielių ekstraktu.

Ji ruošiama iš 10 kartų didesnės koncentracijos bandymo terpės (17 skirsnio b punktas; A.12) su mikroelementų tirpalu (17 skirsnio c punktas; A.13). Naudokite ką tik gautą šviežią natrio sulfido nonahidratą (17 skirsnio b punktas; A.12) arba prieš naudodami jį išplaukite ir išdžiovinkite, kad užtikrintumėte pakankamą jo redukuojamąją gebą. Jeigu bandymas atliekamas nenaudojant bokso (12 skirsnio j punktas), natrio sulfido koncentraciją pradiniame tirpale (1 g/l) reikėtų padidinti iki 2 g/l. Taip pat galima įdėti natrio sulfido iš tinkamo pradinio tirpalo, įleidžiant jį per užkimštų bandymo butelių sandariklį, taip sumažinant oksidacijos riziką; galutinė jo koncentracija turi būti 0,2 g/l. Kitu atveju galima naudoti titano (III) citratą (17 skirsnio b punktas) – jis įleidžiamas per užkimštų bandymo butelių sandariklį ir jo koncentracija turi būti 0,8–1,0 mmol/l. Titano (III) citratas yra labai veiksmingas ir mažai toksiškas reduktorius, kuris ruošiamas taip: 2,94 g trinatrio citrato dihidrato ištirpinama 50 ml skiedimui tinkamo vandens, iš kurio pašalintas deguonis (14 dalis) (taip gaunamas 200 mmol/l tirpalas) ir įpilama 5 ml titano (III) chlorido tirpalo (15 g / 100 ml skiedimui tinkamo vandens). Neutralizuokite pH iki 7 ± 0,5 naudodami natrio karbonatą ir, pūsdami azoto dujų srautą, supilkite gautą skystį į reikiamą serumo buteliuką. Titano (III) citrato koncentracija šiame pradiniame tirpale yra 164 mmol/l. Šią terpę bandymui naudokite iškart arba ne ilgiau kaip 1 dieną laikykite 4 °C temperatūroje.

A.12 b) 10 kartų didesnės koncentracijos bandymo terpė, paruošta iš šių medžiagų:

bevandenio kalio dihidrogenfosfato (KH_2PO_4)	2,7 g
dinatrio vandenilio fosfato (Na_2HPO_4)	4,4 g
(arba 11,2 g dodekahidrato)	5,3 g
amonio chlorido (NH_4Cl)	

▼**M6**

kalcio chlorido dihidrato ($CaCl_2$ $2H_2O$)	0,75 g
magnio chlorido heksahidrato ($MgCl_2$ $6H_2O$)	1,0 g
geležies (II) chlorido tetrahidrato ($FeSO_4$ $4H_2O$)	0,2 g
resazūrino (oksidacijos-redukcijos indikatoriaus)	0,01 g
natrio sulfido nonahidrato (Na_2S $9H_2O$)	1,0 g
(arba titano (III) citrato), galutinė koncentracija	0,8–1,0 mmol/l
mikroelementų tirpalas (žr. 17 skirsnio c punktą; A.13)	10,0 ml
mielių ekstraktas	100 g
Ištirpinkite skiedimui tinkamame vandenyje (14 skirsnis) ir papildykite iki	1 000 ml

A.13 c) Mikroelementų tirpalas, ruošiamas iš šių medžiagų:

mangano (II) chlorido tetrahidrato ($MnCl_2$ · $4H_2O$)	0,5 g
ortoboro rūgšties (H_3BO_3)	0,05 g
cinko chlorido ($ZnCl_2$)	0,05 g
vario (II) chlorido ($CuCl_2$)	0,03 g
natrio molibdato dihidrato (Na_2MoO_4 · $2H_2O$)	0,01 g
kobalto (II) chlorido heksahidrato ($CoCl_2$ · $6H_2O$)	1,0 g
nikelio (II) chlorido heksahidrato ($NiCl_2$ · $6H_2O$)	0,1 g
dinatrio selenito (Na_2SeO_3)	0,05 g
Ištirpinkite skiedimui tinkamame vandenyje (14 skirsnis) ir papildykite iki	1 000 ml“

A.14 25 skirsnis. Išankstinis bandymas

Būtina atlikti išankstinį bandymą 24 skirsnyje aprašyta tvarka, išskyrus tai, kad dumblo kietųjų medžiagų koncentracija per šį bandymą turėtų būti 1/100 nurodytų koncentracijų, t. y. 0,1 g/l, 0,2 g/l ir 0,4 g/l. Inkubacinis periodas turėtų trukti bent 7 paras.

Pastaba. Per tarplaboratorinį bandymą (5) viršerdvės tūris – 75 % bendro tūrio – buvo gerokai per didelis; rekomenduojamas intervalas yra 10–40 %. Atitinkamas kriterijus yra tai, kad dujų, susidariusių esant maždaug 80 % slopinimui, tūris turėtų būti matuojamas pakankamai preciziškai (pvz., su ±5–10 % paklaida).

A.15 26–30 skirsniai. Bandomosios cheminės medžiagos, pasėlio ir substrato dėjimas

Šios medžiagos dedamos į bandymo indus taip pat, kaip aprašyta nurodytuose skirsniuose, tačiau substrato tirpalas (17 skirsnis) pakeičiamas bandymo terpe, į kurią dėta mielių ekstrakto substrato (A.11).

Galutinė sausų kietųjų dumblo medžiagų koncentracija taip pat sumažinama nuo 2–4 g/l iki 0,2 ± 0,05 g/l (A.9). Du sudedamųjų dalių dėjimo į bandomąjį mišinį pavyzdžiai pateikti A.1 lentelėje, kuria pakeičiama 29 skirsnio lentelė.

A.16 33 skirsnis. Butelių inkubacija

Dėl numatomos mažesnės dujų išskyrimo spartos inkubacinis periodas trunka bent 7 paras.

▼M6

A.17 34 skirsnis. Slėgio matavimai

Jeigu reikia nustatyti dujinės fazės medžiagų kiekius, butelių viršerdvės slėgis matuojamas pagal tą pačią procedūrą, kaip aprašyta 34 skirsnyje. Jeigu reikia išmatuoti bendrą CO_2 ir CH_4 kiekį, skystosios fazės pH sumažinamas iki maždaug 2, į kiekvieną atitinkamą butelį įšvirkščiant H_3PO_4 ir išmatuojant slėgį po 30 minučių purtymo tokioje pačioje temperatūroje, kokia palaikoma per bandymą. Tačiau daugiau informacijos apie pasėlio kokybę galima gauti išmatuojant slėgį kiekviename butelyje prieš rūgštinimą ir po jo. Pavyzdžiui, kai CO_2 išskyrimo sparta yra kur kas didesnė negu metano, gali pasikeisti fermentuojančiųjų bakterijų jautris ir (arba) bandomoji cheminė medžiaga pirmiausia paveikia metaną išskiriančias bakterijas.

A.18 36 skirsnis. pH matavimas

Jeigu naudojama H_3PO_4, reikėtų paruošti papildomų pH matuoti skirtų butelių, į kuriuos nededama H_3PO_4.

NUORODA.

Madsen, T, Rasmussen, HB; and Nilsson, L (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No.336, Water Quality Institute, Danish Environment Protection Agency, Copenhagen.

A.1 lentelė.

Bandinių partijų ruošimo bandymui pavyzdžiai

Reakcijos mišinio sudedamosios dalys	1 pavyzdys	2 pavyzdys	Įprasta dėjimo eilės tvarka
Paruošto pasėlio koncentracija (g/1)	0,42	2,1	—
Įdėto pasėlio tūris (ml)	45	9	4
Pasėlio koncentracija bandymo buteliuose (g/1)	0,20	0,20	—
Įdėtos bandymo terpės tūris (ml)	9	9	2
Įpilto skiedimui skirto vandens tūris (ml)	36	72	3
Mielių ekstrakto koncentracija bandymo buteliuose (g/1)	9,7	9,7	—
Bandomosios cheminės medžiagos pradinio tirpalo tūris (ml)	3	3	1
Bendras skysčio tūris (ml)	93	93	—

▼M6

5 priedėlis

Sąvokų apibrėžtys

Toliau pateiktos taikant šį bandymo metodą vartojamų sąvokų apibrėžtys.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

▼M6

C.35. TOKSIŠKUMO *LUMBRICULUS* DUGNINIŲ NUOSĖDŲ IR VANDENS SISTEMOJE BANDYMAS NAUDOJANT DUGNINES NUOSĖDAS SU ĮTERPTA BANDOMĄJA MEDŽIAGA

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 225 (2007). Vandens telkinių dugno nuosėdas ryjantys podugnio gyvūnai gali patirti didelį dugninėse nuosėdose besikaupiančių cheminių medžiagų poveikį, todėl reikėtų jiems skirti ypač daug dėmesio, kaip rašoma literatūroje, pvz., (1), (2), (3). Iš šių dugninės nuosėdas ryjančių gyvūnų itin svarbios vandens telkinių dugno nuosėdų ekosistemoms yra vandens mažašerės žieduotosios kirmėlės (*Oligochaeta*). Nuo šių dugninės nuosėdas biologiškai perdirbančių gyvūnų, kuriais minta kiti plėšrieji gyvūnai, gali labai priklausyti tokių cheminių medžiagų biologinis prieinamumas kitiems organizmams, pvz., bentosu mintančioms žuvims. Kitaip negu dugno paviršiaus organizmai, podugnyje gyvenančios vandens mažašerės žieduotosios kirmėlės (pvz., *Lumbriculus variegatus*) įsirausia į dugninės nuosėdas ir minta rydamos po dugno paviršiumi esančias nuosėdų daleles. Taip bandomoji cheminė medžiaga iš tiesų paveikia bandomuosius organizmus visais įmanomais jos įsisavinimo būdais (pvz., per sąlytį su ja ir praryjant ja užterštų dugninių nuosėdų dalelių, tačiau taip pat per dugno porų vandenį ir virš dugno esančio vandens sluoksnį).

2. Pagal šį bandymo metodą siekiama įvertinti ilgalaikį dugninėse nuosėdose esančių cheminių medžiagų poveikį podugnio mažašerėms žieduotosioms kirmėlėms *Lumbriculus variegatus* (Müller). Jis pagrįstas esamais dugninių nuosėdų toksiškumo ir biologinio kaupimosi bandymų protokolais, pvz., (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Šis metodas skirtas taikyti stacionariojo bandymo sąlygomis. Pagal šį bandymo metodą pasirinktas bandomosios cheminės medžiagos poveikio scenarijus yra jos įterpimas į dugninės nuosėdas. Dugninės nuosėdos su įterpta bandomąja chemine medžiaga naudojamos siekiant imituoti ta medžiaga užterštas nuosėdas.

3. Cheminės medžiagos, kurių poveikį dugninėse nuosėdose gyvenantiems organizmams reikia ištirti, paprastai lieka šiame sluoksnyje ilgą laiką. Dugninėse nuosėdose gyvenantys organizmai gali patirti šių medžiagų poveikį keliais būdais. Kiekvieno poveikio būdo santykinė reikšmė ir trukmė, reikalinga bendram toksiniam poveikiui pasiekti, priklauso nuo atitinkamos cheminės medžiagos fizikinių bei cheminių savybių ir nuo jos galutinės baigties gyvūno organizme. Jeigu tai lengvai įsigeriančios (adsorbuojamos) cheminės medžiagos (pvz., kurių *log* K_{ow} > 5) arba kovalentinių ryšių su dugninėmis nuosėdomis saistomos cheminės medžiagos, reikšmingą jų poveikį gyvūnai gali patirti prarydami jomis užteršto pašaro. Siekiant nenuvertinti tokių cheminių medžiagų toksiškumo, bandomiesiems organizmams daugintis ir augti reikalingas pašaras dedamas į dugnines nuosėdas prieš dedant bandomąją cheminę medžiagą (11). Šis bandymo metodas aprašytas pakankamai išsamiai, kad būtų galima atlikti bandymą ir kartu atitinkamai keisti bandymo planą, atsižvelgiant į konkrečiose laboratorijose esamas sąlygas ir įvairias bandomųjų cheminių medžiagų savybes.

4. Bandymu pagal šį metodą siekiama nustatyti bandomosios cheminės medžiagos poveikį bandomųjų organizmų reprodukcijai ir biomasei. Vertinami biologiniai parametrai yra bendras išgyvenusių kirmėlių skaičius ir biomasė (sausosios medžiagos masė) bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pabaigoje. Šie duomenys išanalizuojami taikant regresijos modelį, siekiant įvertinti, kokiai koncentracijai esant būtų patirtas x % poveikis (pvz., EC_{50}, EC_{25} ir EC_{10}), arba tikrinant hipotezę pagal statistinius kriterijus, siekiant nustatyti nepastebėto poveikio koncentraciją (NOEC) ir mažiausią pastebėto poveikio koncentraciją (LOEC).

5. Šio priedo C.27 skyriuje „Toksiškumo bandymas su chironomidais nuosėdose ir vandenyje, naudojant nuosėdas su įterpta bandomąja chemine medžiaga“ (6) pateikta daug būtinos ir naudingos informacijos apie tai, kaip atlikti bandymus pagal aprašytąjį dugninių nuosėdų toksiškumo bandymo metodą. Taigi, remiantis šiuo dokumentu, buvo parengti pakeitimai, reikalingi toksiškumo *Lumbriculus variegatus* dugninėse nuosėdose bandymams atlikti. Papildomi dokumentai, į kuriuos daromos nuorodos, yra, pvz., *ASTM Standard Guide for Determination of the Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants by Benthic Invertebrates* (3), *U.S. EPA Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates* (7) ir *ASTM Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for selection of samplers used to*

▼M6

collect benthic invertebrates (12). Be to, svarbūs informacijos šaltiniai rengiant šį dokumentą buvo praktinė patirtis, sukaupta atliekant tarplaboratorinius bandymus pagal šį metodą ((13), tarplaboratorinio bandymo ataskaita), ir literatūros šaltiniuose pateikta informacija.

BŪTINA INFORMACIJA IR GAIRĖS

6. Informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą, kaip antai įspėjimus dėl saugos, tinkamas tos medžiagos laikymo sąlygas ir analizės metodus, reikėtų gauti prieš pradedant ją tirti. Gairių dėl bandomųjų cheminių medžiagų, kurių bandymus sunku atlikti dėl jų fizikinių ir cheminių savybių, pateikta (14).

7. Prieš pradedant bandymą, turėtų būti žinoma tokia informacija apie bandomąją cheminę medžiagą:

   — bendrinis pavadinimas, cheminis (geriausia IUPAC) pavadinimas, struktūrinė formulė, CAS registro numeris, grynumas;

   — garų slėgis;

   — tirpumas vandenyje.

8. Prieš pradedant bandymą, naudinga turėti papildomos informacijos apie bandomosios medžiagos:

   — oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientą K_{ow};

   — organinės anglies / vandens pasiskirstymo koeficientą K_{oc};

   — hidrolizę;

   — fotocheminį virsmą vandenyje;

   — biologinį skaidumą;

   — paviršiaus įtemptį.

9. Prieš pradedant bandymą, reikėtų gauti informaciją apie tam tikras naudojamų dugninių nuosėdų savybes (7). Apie tai išsamiau skaitykite 22–25 skirsniuose.

BANDYMO PRINCIPAS

10. Panašios fiziologinės būklės (sinchronizuotos, kaip aprašyta 5 priedėlyje) kirmėlės patiria nuodingųjų medžiagų, kurių tam tikros koncentracijos dedamos į dugninių nuosėdų ir vandens sistemos nuosėdų fazę, poveikį. Bandymo terpėms reikėtų naudoti dirbtines dugnines nuosėdas ir regeneruotą vandenį. Kontroliniai bandiniai yra bandymo indai, į kuriuos nededama bandomosios cheminės medžiagos. Ruošiant kiekvieno koncentracijos lygio bandinius, bandomoji cheminė medžiaga bendrai dedama į dar nepaskirstytas dugnines nuosėdas, taip siekiant sumažinti kiekvieno koncentracijos lygio kartotinių bandinių kintamumą, o tada bandomieji organizmai įleidžiami į bandymo indus, kuriuose nustatyta reikiama dugninių nuosėdų ir vandens koncentracijų pusiausvyra (žr. 29 skirsnį). Šiose dugninių nuosėdų ir vandens sistemose bandomieji gyvūnai yra 28 paras veikiami bandomosios cheminės medžiagos. Kadangi dirbtinėse dugninėse nuosėdose mitybinių medžiagų yra nedaug, reikėtų į jas įdėti papildomo pašaro (žr. 22–23 skirsnius ir 4 priedėlį), siekiant užtikrinti, kad kirmėlės kontroliuojamomis sąlygomis augtų ir daugintųsi. Taip užtikrinama, kad bandomieji gyvūnai bandomosios medžiagos poveikį patirtų tiek per vandenį ir dugnines nuosėdas, tiek per pašarą.

11. Pageidautina šio pobūdžio tyrimo vertinamoji baigtis yra reprodukcijos arba, atitinkamai, biomasės EC_x (pvz., EC_{50}, EC_{25} ir EC_{10} – poveikio koncentracija, kuriai esant poveikį patiria x % bandomųjų organizmų), palyginti su kontroline grupe. Tačiau reikia pažymėti, jog turint omenyje didelį mažų EC_x verčių (pvz., EC_{10}, EC_{25}) neapibrėžtumą su itin aukštomis 95 % pasikliovimo ribomis (pvz., (15)) ir statistinį patikimumą, apskaičiuotą tikrinant hipotezę, EC_{50} laikoma patikimiausia vertinamąja baigtimi. Taip pat galima

▼M6

apskaičiuoti nepastebėto poveikio koncentraciją (NOEC) ir mažiausią pastebėto poveikio koncentraciją (LOEC) biomasei ir reprodukcijai, jeigu bandymo planas ir duomenys tinka šiems skaičiavimams (žr. 34–38 skirsnius). Bandymo planas priklausys nuo tyrimo tikslo – gauti EC_x arba NOEC.

ETALONINIŲ MEDŽIAGŲ BANDYMAI

12. Naudojant kontrolinius organizmus, turėtų būti pakankamai patikimai įrodytas laboratorijos gebėjimas atlikti šį bandymą ir, jeigu yra ankstesnių duomenų, bandymo pakartojamumas. Be to, galima reguliariais intervalais atlikti etaloninius toksiškumo bandymus, naudojant etaloninę nuodingąją medžiagą, siekiant įvertinti bandomųjų organizmų jautrį. Bandomųjų gyvūnų jautrį ir būklę tinkamai nustatyti galima tik atliekant 96 val. trukmės etaloninės medžiagos toksiškumo vandenyje bandymus (4), (7). Informacijos apie pentachlorfenolio (PCP) toksiškumą, nustatytą išsamiais bandymais (per kuriuos 28 paras tirtas į dugnines nuosėdas įterptos bandomosios medžiagos poveikis), pateikta 6 priedėlyje ir pagal šį bandymo metodą atlikto tarplaboratorinio bandymo ataskaitoje (13). Ūmus pentachlorfenolio toksinis poveikis, patiriamas tik vandenyje, aprašytas literatūroje, pvz., (16). Šia informacija galima remtis lyginant bandomųjų organizmų jautrį per etaloninius bandymus, naudojant etaloninę nuodingąją medžiagą pentachlorfenolį. Bandymams su *L. variegatus* rekomenduojama naudoti etalonines nuodingąsias medžiagas kalcio chloridą (KCl) arba vario sulfatą ($CuSO_4$) (4), (7). Kol kas sunku nustatyti bandymo kokybės kriterijus, remiantis KCl toksiškumo duomenimis, nes literatūroje trūksta duomenų apie *L. variegatus*. Informacijos apie vario toksiškumą *L. variegatus* galima rasti literatūroje (17)–(21).

BANDYMO TINKAMUMAS

13. Bandymas pripažįstamas tinkamu, jeigu tenkinami šie reikalavimai:

— per tarplaboratorinį bandymą (13) nustatyta, kad naudojant *Lumbriculus variegatus*, vidutinis gyvų kirmėlių skaičius kiekviename kartotiniame kontrolinės grupės bandinyje iki bandomosios medžiagos poveikio laikotarpio pabaigos turėtų padidėti bent 1,8 karto, palyginti su poveikio laikotarpio pradžioje kiekviename kartotiniame bandinyje buvusių kirmėlių skaičiumi;

— paviršinio vandens pH per visą bandymą turėtų būti 6–9;

— deguonies koncentracija paviršiniame vandenyje bandymo metu, esant bandymo temperatūrai, turėtų būti ne mažesnė negu 30 % oro soties vertės.

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Bandymo sistema

14. Rekomenduojama naudoti stacionariąsias sistemas, nekeičiant paviršinio vandens sluoksnio. Jeigu dugninių nuosėdų ir vandens santykis (žr. 15 skirsnį) yra tinkamas, paprastai pakanka nestipriai aeruoti vandenį, kad jo kokybė būtų tinkama bandomiesiems organizmams (pvz., būtų palaikomas optimalus ištirpusio deguonies lygis ir mažinamas šalinimo produktų kaupimasis). Pusiau stacionarias arba dinamines sistemas, kuriose paviršinis vanduo kartkartėmis arba nuolat atnaujinamas, reikėtų naudoti tik išimtiniais atvejais, nes manoma, kad reguliarus paviršinio vandens keitimas veikia cheminę pusiausvyrą (pvz., iš bandymo sistemos išplaunama bandomoji cheminė medžiaga).

Bandymo indai ir aparatūra

15. Bandomosios medžiagos poveikis turėtų būti tiriamas naudojant, pvz., 250 ml tūrio (6 cm skersmens) chemines stiklines (pagamintas iš stiklo). Galima naudoti ir kitus tinkamus stiklinius indus, jeigu juose palaikomi tinkamo storio paviršinio vandens ir dugninių nuosėdų sluoksniai. Kiekviename inde turėtų būti maždaug 1,5–3 cm storio paruoštų dugninių nuosėdų sluoksnis. Dugninių nuosėdų ir paviršinio vandens sluoksnių gylio santykis

▼M6

turėtų būti 1:4. Indai turėtų būti tinkamos talpos, turint omenyje jų įkrovą, t. y. dugninių nuosėdų svorio vienetui tenkantį bandomųjų kirmėlių skaičių (taip pat žr. 39 skirsnį).

16. Bandymo indai ir kita su bandomąja chemine medžiaga besiliečianti aparatūra turėtų būti pagaminta tik iš stiklo ar kitos chemiškai inertinės medžiagos. Reikėtų stengtis, kad visos naudojamos įrangos dalys būtų be medžiagų, galinčių tirpdyti ar sugerti bandomąsias chemines medžiagas arba išskirti kitas chemines medžiagas ir pakenkti bandomiesiems gyvūnams. Bet kokia su bandymo terpėmis besiliečianti įranga turėtų būti pagaminta iš politetrafluoretileno (PTFE), nerūdijančio plieno ir (arba) stiklo. Organinėms cheminėms medžiagoms, kurios, kaip žinoma, yra linkusios įsigerti į stiklo paviršių, gali reikėti naudoti silanizuoto stiklo indus. Šiais atvejais panaudotą įrangą reikia pašalinti.

Bandomoji rūšis

17. Šio pobūdžio tyrimui naudojama bandomųjų gyvūnų rūšis yra gėlavandenės mažašerės žieduotosios kirmėlės *Lumbriculus variegatus* (Müller). Šios rūšies kirmėlės pakenčia labai įvairių rūšių dugnines nuosėdas ir plačiai naudojamos dugninių nuosėdų toksiškumo ir biologinio kaupimosi bandymams [pvz., (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)]. Bandymo ataskaitoje reikėtų nurodyti bandomųjų gyvūnų kilmę, patikimai identifikuoti rūšį (pvz., (36)) ir aprašyti bandomųjų kultūrų auginimo sąlygas. Rūšies identifikuoti prieš kiekvieną bandymą nebūtina, jeigu organizmai bandymui imami iš toje pačioje laboratorijoje auginamos kultūros.

Bandomųjų organizmų kultūrų auginimas

18. Siekiant turėti pakankamai kirmėlių dugninių nuosėdų toksiškumo bandymams, naudinga laboratorijoje nuolat turėti auginamų ir veisiamų kirmėlių kultūrą. 5 priedėlyje pateikta gairių, kokiais metodais *Lumbriculus variegatus* kultūros gali būti auginamos laboratorijose, ir nurodyti pradinių kultūrų tiekimo šaltiniai. Išsamios informacijos apie šios rūšies kultūrų auginimą pateikta literatūroje (3), (7), (27).

19. Siekiant užtikrinti, kad bandymams būtų naudojami tos pačios rūšies gyvūnai, labai patartina veisti vienarūšes kultūras. Reikia užtikrinti, kad auginamos kultūros ir ypač bandymams naudojamos kirmėlės būtų be pastebimų ligų ir anomalijų.

Vanduo

20. Kaip paviršinį vandenį atliekant bandymus rekomenduojama naudoti regeneruotą vandenį pagal šio priedo C.1 skyrių (37); jį taip pat galima naudoti laboratorijoje auginamoms kirmėlių kultūroms (kaip jį paruošti, skaitykite 2 priedėlyje). Kai reikia, galima naudoti gamtinį vandenį. Pasirinktas vanduo turi būti tokios kokybės, kad bandomosios rūšies gyvūnai per aklimatizacijos ir bandymo laikotarpius jame augtų ir daugintųsi be išvaizdos ar elgsenos pakitimų. Įrodyta, kad *Lumbriculus variegatus* gali gyventi, augti ir daugintis tokiame vandenyje (30), kurį naudojant užtikrinamos itin standartizuotos bandymo ir kultūrų auginimo sąlygos. Jeigu naudojamas regeneruotas vanduo, reikėtų nurodyti jo sudėtį ir prieš naudojant vandenį ištirti, nustatant bent jo pH, deguonies kiekį ir kietumą (išreiškiamą $CaCO_3$ kiekiu, mg/l). Naudingos informacijos galima gauti išanalizavus numatomame naudoti vandenyje esančius mikroteršalus (žr. pvz., 3 priedėlį).

21. Paviršinio vandens pH turėtų būti nuo 6,0 iki 9,0 (žr. 13 skirsnį). Jeigu numatoma, kad per bandymą susidarys daugiau amoniako, patartina palaikyti 6,0–8,0 pH, o atliekant, pvz., nestiprių organinių rūgščių bandymus, patartina patikslinti pH, į bandymui naudojamą vandenį įpilant buferinio tirpalo, kaip aprašyta literatūroje, pvz., (16). Bendrasis bandymui naudojamo vandens kietumas turėtų būti toks, kad viename gamtinio vandens litre būtų 90–300 mg $CaCO_3$. 3 priedėlyje apibendrinti papildomi kriterijai, taikomi skiedimui tinkamam vandeniui pagal EBPO gaires Nr. 210 (38).

▼M6

Dugninės nuosėdos

22. Kadangi neužterštų natūralių dugninių nuosėdų iš tam tikro šaltinio gali būti įmanoma gauti ne visus metus ir kadangi tose nuosėdose esantys vietiniai organizmai bei mikroteršalai gali daryti įtaką bandymui, patartina naudoti paruoštas nuosėdas (taip pat vadinamas perdirbtomis, dirbtinėmis arba sintetinėmis nuosėdomis). Naudojant paruoštas nuosėdas, mažiau kinta bandymo sąlygos ir nuosėdose neįsiveisia vietinės faunos. Toliau aprašytos dugninės nuosėdos, ruošiamos dirbtinių nuosėdų pagrindu pagal literatūros šaltinius (6), (39), (40). Jas rekomenduojama naudoti šio pobūdžio bandymams ((6), (10), (30), (41), (42), (43)):

a) 4–5 % kiminų durpių (sausosios medžiagos masės); durpes svarbu naudoti miltelių pavidalu, vidutinio suirimo lygio, smulkiai sumaltas (dalelių dydis ≤ 0,5 mm) ir tik ore išdžiovintas.

b) 20 ± 1 % kaolino molio (sausosios medžiagos masės) (patartina, kad kaolinito jame būtų daugiau kaip 30 %);

c) 75–76 % kvarcinio smėlio (sausosios medžiagos masės) (naudojamas smulkus smėlis, kurio dalelių dydis ≤ 2 mm, tačiau daugiau kaip 50 % dalelių jame turėtų būti 50–200 μm dydžio).

d) Kartu su dugninių nuosėdų sausosiomis sudedamosiomis dalimis įpilama dejonizuoto vandens (30–50 % nuosėdų sausosios medžiagos masės).

e) Galutinio nuosėdų mišinio pH vertė patikslinama įdedant chemiškai gryno kalcio karbonato (CaCO3).

f) Bendrosios organinės anglies kiekis galutiniame mišinyje turėtų būti 2 % (± 0,5 %) nuosėdų sausosios medžiagos masės; šis kiekis turėtų būti tikslinamas įdedant tinkamus durpių ir smėlio kiekius pagal a–c punktus.

g) Kartu su sausosiomis nuosėdų sudedamosiomis dalimis įdedama pašaro, pvz., maltų didžiosios dilgėlės lapų (*Urtica* sp., žaliava turi būti tinkama vartoti žmonėms pagal farmacijos standartus) arba maltų *Urtica* sp. lapų, sumaišytų su alfa celiulioze santykiu 1:1; dedamo pašaro kiekis turi būti 0,4–0,5 % nuosėdų sausosios medžiagos masės; daugiau apie tai skaitykite 4 priedėlyje.

23. Reikėtų žinoti, iš kokio šaltinio gautos durpės, kaolino molis, pašarinės medžiagos ir smėlis. Kartu su tuo, kas nurodyta g punkte, šio priedo C.27 skyriuje (6) išvardyti augaliniai pakaitalai, tinkami naudoti kaip pašaro šaltinis: džiovinti baltojo šilkmedžio (*Morus alba*) lapai, baltieji dobilai (*Trifolium repens*), daržiniai špinatai (*Spinacia oleracea*) arba javų želmenys.

24. Pasirinkto pašaro turėtų būti dedama į dugnines nuosėdas prieš įterpiant bandomąją cheminę medžiagą arba kartu su ja. Reikėtų rinktis tokį pašarą, kad būtų galima užtikrinti bent pakankamą reprodukcijos lygį kontroliniuose bandiniuose. Naudingos informacijos galima gauti išanalizavus numatomose naudoti dirbtinėse nuosėdose ar jų sudedamosiose dalyse esančius mikroteršalus. Sintetinių nuosėdų ruošimo pavyzdys pateiktas 4 priedėlyje. Taip pat galima sumaišyti sausas sudedamąsias dugninių nuosėdų dalis, jei galima įrodyti, kad užpylus paviršinio vandens sluoksnį nuosėdų sudedamosios dalys neatsiskiria (pvz., durpių dalelės neišplaukia į paviršių) ir kad durpės arba nuosėdos yra pakankamai kondicionuotos (taip pat žr. 25 skirsnį ir 4 priedėlį). Apibūdinant dirbtines nuosėdas, reikėtų nurodyti bent jų sudedamųjų dalių kilmę, granuliometrinę sudėtį (procentines smėlio, dumblo ir molio dalis), bendrosios organinės anglies kiekį, vandens kiekį ir pH. Oksidacijos-redukcijos potencialo matuoti nebūtina.

25. Kai reikia, pvz., konkretiems bandymo tikslams pasiekti, bandymui ir (arba) kultūrų auginimui galima naudoti natūralias dugnines nuosėdas, paimtas iš neužterštų vietų (3). Tačiau jeigu naudojamos natūralios nuosėdos, jas apibūdinant reikėtų nurodyti bent jų kilmę (surinkimo vietą), porų vandens pH ir amoniako kiekį, bendrosios organinės anglies ir azoto kiekius, granuliometrinę sudėtį (procentines smėlio, dumblo ir molio dalis) ir vandens procentinį kiekį (7). Jose neturėtų būti jokių teršalų ir kitų organizmų,

▼M6

galinčių konkuruoti su bandomaisiais organizmais arba jais maitintis. Oksidacijos-redukcijos potencialo ir katijonų mainų talpos matuoti nebūtina. Taip pat rekomenduojama, prieš įterpiant bandomąją cheminę medžiagą, natūralias dugnines nuosėdas septynias paras kondicionuoti tokiomis pačiomis, kaip būsimo bandymo, sąlygomis. Šio kondicionavimo periodo pabaigoje paviršinį vandenį reikėtų nupilti ir pašalinti.

26. Dugninės nuosėdos turi būti tokios kokybės, kad kontroliniai organizmai per visą bandomosios medžiagos poveikio laikotarpį jose išgyventų ir daugintųsi be išvaizdos ar elgsenos pakitimų. Kontrolinės grupės kirmėlės turėtų įsirausti į nuosėdas ir maitintis jas rydamos. Kontrolinių organizmų reprodukcija turėtų bent atitikti 13 skirsnyje nurodytą tinkamumo kriterijų. Reikėtų užrašyti, ar nuosėdų paviršiuje yra, ar nėra išmatų kruopelių – iš to galima spręsti, ar kirmėlės ryja nuosėdas, ir tai gali padėti aiškinti su bandomosios medžiagos poveikio būdais susijusius bandymo rezultatus. Papildomos informacijos apie nuosėdų rijimą galima gauti taikant literatūros šaltiniuose (24), (25), (44), (45) aprašytus metodus, pagal kuriuos apibūdinamas bandomųjų organizmų nuosėdų rijimas arba dalelių atranka.

27. Natūralių nuosėdų apdorojimo, prieš naudojant jas laboratorijoje, procedūros aprašytos literatūros šaltiniuose (3), (7), (12). Per *Lumbriculus* bandymą rekomenduojamų naudoti dirbtinių nuosėdų ruošimas ir laikymas aprašyti 4 priedėlyje.

Bandomosios cheminės medžiagos naudojimas

28. Bandomoji cheminė medžiaga įterpiama į dugnines nuosėdas. Kadangi dauguma bandomųjų cheminių medžiagų yra mažai tirpios vandenyje, reikėtų paruošti jų pradinį tirpalą, ištirpinant jas kuo mažesniame tinkamo organinio tirpiklio (pvz., acetono, n-heksano, cikloheksano) kiekyje. Pradinį tirpalą reikėtų atskiesti tuo pačiu tirpikliu, kuris naudojamas ruošiant bandomuosius tirpalus. Renkantis tinkamą soliubilizavimo priemonę, pagrindiniai kriterijai turėtų būti tirpiklio toksiškumas bei lakumas ir bandomosios cheminės medžiagos tirpumas pasirinktame tirpiklyje. Kiekvienam koncentracijos lygiui turėtų būti naudojamas vienodas atitinkamo tirpalo kiekis. Ruošiant kiekvieno koncentracijos lygio bandinius, bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti bendrai dedama į dar nepaskirstytas dugnines nuosėdas, taip siekiant sumažinti kiekvieno bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos lygio kartotinių bandinių kintamumą. Tada kiekvienas bandomasis tirpalas sumaišomas su kvarciniu smėliu, kaip aprašyta 22 skirsnyje (pvz., po 10 g kvarcinio smėlio į kiekvieną bandymo indą). Nustatyta, jog vienam kvarcinio smėlio gramui pakanka 0,20–0,25 ml tirpalo, kad smėlis visiškai permirktų. Vėliau tirpiklis turi būti išgarintas iki sausos masės. Kad kuo mažiau bandomosios cheminės medžiagos būtų prarasta dėl garavimo kartu su tirpikliu (pvz., priklausomai nuo tos cheminės medžiagos garų slėgio), ja padengtą išdžiovintą smėlį reikėtų naudoti iškart. Sausas smėlis sumaišomas su tinkamu paruoštų atitinkamo koncentracijos lygio nuosėdų kiekiu. Ruošiant dugnines nuosėdas reikia atsižvelgti į bandomosios cheminės medžiagos ir smėlio mišinyje esantį smėlio kiekį (t. y. ruošiant nuosėdas reikėtų atitinkamai mažiau dėti smėlio). Svarbiausias šios procedūros pranašumas yra tai, kad į dugnines nuosėdas visai nepatenka tirpiklio (7). Kitu atveju, pvz., naudojant iš lauko paimtas dugnines nuosėdas, bandomąją cheminę medžiagą galima dėti įterpiant į išdžiovintų ir smulkiai sumaltų nuosėdų dalį, kaip pirmiau nurodyta kalbant apie kvarcinį smėlį, arba įmaišant bandomąją medžiagą į šlapias dugnines nuosėdas ir bet kokią naudotą soliubilizavimo priemonę vėliau išgarinant. Reikėtų stengtis užtikrinti, kad į dugnines nuosėdas dedama bandomoji cheminė medžiaga būtų jose kruopščiai ir tolygiai paskirstyta. Jei reikia, siekiant patikrinti tikslines medžiagos koncentracijas nuosėdose ir nustatyti jų vienalytiškumą, galima atlikti dalinių ėminių analizę. Taip pat, siekiant patvirtinti tikslines koncentracijas nuosėdose, gali būti naudinga išanalizuoti dalinius bandymo tirpalų ėminius. Kadangi kvarciniam smėliui padengti bandomąja chemine medžiaga naudojamas tirpiklis, reikėtų naudoti tirpiklio kontrolinį bandinį, kuris paruošiamas naudojant tokį patį tirpiklio kiekį, koks dėtas į bandomąja medžiaga apdorotas nuosėdas. Bandymo ataskaitoje reikėtų nurodyti, pagal kokį metodą bandomoji medžiaga įterpta į nuosėdas, ir dėl kokių priežasčių

▼M6

pasirinkta ta, o ne kita iš pirmiau aprašytų jos įterpimo procedūrų. Bandomosios cheminės medžiagos įterpimo metodą galima pritaikyti atsižvelgiant į tos medžiagos fizikines ir chemines savybes, pvz., siekiant išvengti jos nuostolių dėl garavimo ją įterpiant arba reguliuojant pusiausvyrą. Papildomų gairių dėl bandomųjų cheminių medžiagų įterpimo procedūrų pateikta *Environment Canada* (1995) (46).

29. Paruoštas nuosėdas su įterpta bandomąja chemine medžiaga paskirsčius į kartotinių bandinių indus ir užpylus bandymui tinkamu vandeniu, patartina palaukti, kol dalis bandomosios cheminės medžiagos iš dugno nuosėdų išsiskirs į vandeninę fazę (žr., pvz., (3), (7), (9)). Pageidautina, kad tai vyktų bandymo temperatūros ir aeracijos sąlygomis. Tinkama pusiausvyros nusistovėjimo trukmė priklauso nuo naudojamų nuosėdų ir cheminių medžiagų – tai gali trukti kelias valandas ar dienas arba, retais atvejais, ilgiausiai kelias (4–5) savaites (žr., pvz., (27), (47)). Atliekant šį bandymą nelaukiama, kol visiškai nusistovės pusiausvyra, tačiau patartina pusiausvyros nusistovėjimui skirti laiko tarpą nuo 48 valandų iki 7 parų. Taip sutrumpinamas bandomosios cheminės medžiagos skaidymo laikas. Priklausomai nuo tyrimo tikslo, pvz., kai reikia imituoti gamtines aplinkos sąlygas, nuosėdas su įterpta chemine medžiaga galima palikti iki tol, kol nusistovės pusiausvyra, ar brandinti dar ilgesnį laiką.

30. Šiam pusiausvyros nusistovėjimo periodui pasibaigus, reikėtų paimti bent paviršinio vandens ir jungtinius dugninių nuosėdų (bent pačios didžiausios ir vienos mažesnės koncentracijos) ėminius bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos analizei. Po šių bandomosios cheminės medžiagos analizinių nustatymų turėtų būti įmanoma apskaičiuoti masės balansą ir išreikšti rezultatus remiantis išmatuotomis pradinėmis koncentracijomis. Apskritai, imant ėminius, dugninių nuosėdų ir vandens sistema suardoma arba sunaikinama, todėl tų pačių kartotinių bandinių paprastai neįmanoma naudoti nuosėdų ir kirmėlių ėminiams tirti. Reikia paruošti papildomus analizei skirtus bandinius tinkamų matmenų induose, kurie būtų tvarkomi taip pat, kaip ir kiti bandiniai (į juos taip pat dedama bandomųjų organizmų), tačiau nenaudojami biologiniams stebėjimams. Reikėtų rinktis tokių matmenų indus, kad iš jų būtų galima imti pagal taikomą analizės metodą reikiamo dydžio ėminius. Apie ėminių ėmimą išsamiau rašoma 53 skirsnyje.

BANDYMO EIGA

Išankstinis bandymas

31. Jeigu nėra informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą *Lumbriculus variegatus*, gali būti naudinga atlikti išankstinį bandymą, siekiant parinkti nustatomajam bandymui tinkamą koncentracijų intervalą ir pagerinti nustatomojo bandymo sąlygas. Šiuo tikslu sudaroma labai besiskiriančių bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos verčių eilutė. Kirmėlės yra tam tikrą laiko tarpą (pvz., 28 paras, kaip ir per nustatomąjį bandymą) veikiamos kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, taigi galima įvertinti bandymui tinkamas koncentracijas; kartotinių bandinių paruošti nereikia. Per išankstinį bandymą reikėtų stebėti ir aprašyti kirmėlių elgseną, pvz., jeigu pastebima, kad jos vengia nuosėdų (taip gali būti dėl bandomosios cheminės medžiagos ir (arba) pačių nuosėdų). Per išankstinį bandymą nereikėtų rinktis bandomosios medžiagos koncentracijų, viršijančių 1 000 mg vienam sausosios nuosėdų medžiagos masės kilogramui.

Nustatomasis bandymas

32. Per nustatomąjį bandymą reikėtų naudoti mažiausiai penkias koncentracijos vertes, kurios pasirenkamos, pvz., remiantis išankstinio intervalo nustatymo bandymo rezultatu (31 skirsnis) ir 35, 36, 37 bei 38 skirsniuose aprašyta tvarka.

▼M6

33. Kartu su bandomąja grupe paruošiama kontrolinė grupė (dėl kartotinių bandinių žr. 36, 37 ir 38 skirsnius) naudojant visas tas pačias sudedamąsias dalis, tačiau nededant bandomosios cheminės medžiagos. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga dedama naudojant kokią nors soliubilizuojančią medžiagą, pastaroji medžiaga neturėtų reikšmingai paveikti bandomųjų organizmų (tokį poveikį parodytų papildomas kontrolinis bandinys, į kurį dėta tik tirpiklio).

Bandymo planas

34. Sudarant bandymo planą, parenkamas bandomosios medžiagos koncentracijų skaičius ir intervalas, kiekvienos koncentracijos bandinių indų skaičius ir kirmėlių skaičius kiekviename inde. Kokia tvarka reikia įvertinti EC_x arba NOEC ir atlikti ribų nustatymo bandymą, rašoma 35, 36, 37 ir 38 skirsniuose.

35. Efektyviosios koncentracijos vertės (pvz., EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) ir koncentracijų, kurioms esant patiriamas reikšmingas bandomosios cheminės medžiagos poveikis, intervalas turėtų patekti į bandymui pasirinktų koncentracijos verčių intervalą. Nereikėtų ekstrapoliuoti iki kur kas mažesnių negu mažiausioji poveikį bandomiesiems organizmams daranti koncentracija arba kur kas didesnių nei didžiausia bandomoji koncentracija verčių. Jeigu išimtiniais atvejais atliekama tokia ekstrapoliacija, būtina tai išsamiai paaiškinti ataskaitoje.

36. Jeigu reikia įvertinti EC_x, per bandymą reikėtų pasirinkti bent penkias koncentracijos vertes ir paruošti bent po tris kiekvienos koncentracijos kartotinius bandinius; kontrolinėje grupėje arba tirpiklio (jeigu naudojamas) kontrolinėje grupėje patartina paruošti šešis kartotinius bandinius, kad būtų galima tiksliau įvertinti kontrolinės grupės kintamumą. Bet kokiu atveju patartina bandymui pasirinkti pakankamą koncentracijos verčių skaičių, kad būtų atliktas patikimas modelio įvertinimas. Koncentracijos turėtų skirtis pastoviu santykiu, neviršijančiu 2 (išimtį galima daryti tais atvejais, kai koncentracijos ir atsako kreivės nuolydis yra nedidelis). Kiekvienos koncentracijos kartotinių bandinių skaičių galima sumažinti, jeigu padidinamas 5–95 % atsaką sukeliančių bandymo koncentracijos verčių skaičius. Didinant kartotinių bandinių skaičių arba siaurinant bandymo koncentracijų intervalus, paprastai per bandymą gaunami siauresni pasikliautinieji intervalai.

37. Jeigu reikia įvertinti LOEC (NOEC), per bandymą reikėtų pasirinkti bent penkias koncentracijos vertes ir paruošti bent po keturis kiekvienos koncentracijos kartotinius bandinius (kontrolinėje grupėje arba tirpiklio (jeigu naudojamas) kontrolinėje grupėje patartina paruošti šešis kartotinius bandinius, kad būtų galima tiksliau įvertinti kontrolinės grupės kintamumą). Pasirinktos koncentracijos vertės turėtų skirtis pastoviu santykiu, neviršijančiu 2. 6 priedėlyje pateikta informacijos apie statistinį patikimumą, nustatytą tikrinant hipotezę per tarplaboratorinį bandymą pagal šį bandymo metodą.

38. Ribų nustatymo bandymą (naudojant vieną bandomosios medžiagos koncentraciją ir kontrolinius bandinius) galima atlikti tada, kai nesitikima jokio poveikio, koncentracijai esant iki 1 000 mg vienam sausosios nuosėdų medžiagos masės kilogramui (pvz., kaip nustatyta per išankstinį intervalo nustatymo bandymą), arba kai reikiamai NOEC vertei patvirtinti pakanka atlikti vienos bandomosios medžiagos koncentracijos bandymą. Pastaruoju atveju ribinės koncentracijos pasirinkimą reikėtų išsamiai pagrįsti bandymo ataskaitoje. Atliekant ribų nustatymo bandymą, tikslas yra pasirinkti pakankamai didelę bandomosios medžiagos koncentraciją, kad už sprendimų priėmimą atsakingi asmenys galėtų išskirti galimą toksinį bandomosios cheminės medžiagos poveikį ir būtų nustatyta ribinė jos koncentracijos vertė, kurios jokiais būdais negalima viršyti. Rekomenduojama koncentracija per ribų nustatymo bandymą – 1 000 mg bandomosios medžiagos vienam (sausosios medžiagos masės) kilogramui. Paprastai būtina paruošti ne mažiau kaip šešis kartotinius tiek bandomųjų grupių, tiek kontrolinius bandinius. 6 priedėlyje pateikta informacijos apie statistinį patikimumą, nustatytą tikrinant hipotezę per tarplaboratorinį bandymą pagal šį bandymo metodą.

Bandomosios medžiagos poveikio sąlygos

Bandomieji organizmai

39. Atliekant bandymą kiekviename kartotiniame bandinyje, naudojamame biologiniams parametrams nustatyti, turi būti bent 10 kirmėlių. Šis kirmėlių

▼M6

skaičius atitinka maždaug 50–100 mg šviežios biomasės. Jei daroma prielaida, kad sausosios medžiagos joje yra 17,1 % (48), tai reiškia, kad kiekviename inde yra apie 9–17 mg sausos biomasės. JAV aplinkos apsaugos agentūra (2000) (7) rekomenduoja, kad bandinių įkrova (sausos biomasės ir bendrosios organinės anglies santykis) neviršytų 1:50. Naudojant 22 skirsnyje aprašytas paruoštas nuosėdas, tokį santykį atitinka maždaug 43 g nuosėdų (sausosios medžiagos masės) ir 10 kirmėlių, bendrosios organinės anglies kiekiui esant 2,0 % sausų nuosėdų. Tais atvejais, kai į indą dedama daugiau kaip 10 kirmėlių, nuosėdų ir paviršinio vandens kiekius reikėtų atitinkamai patikslinti.

40. Visos bandymui naudojamos kirmėlės turėtų būti iš to paties šaltinio gauti, panašios fiziologinės būklės gyvūnai (žr. 5 priedėlį). Bandymui reikėtų atrinkti panašaus dydžio kirmėles (žr. 39 dalį). Rekomenduojama prieš bandymą pasverti dalinį kirmėlių, paimtų iš turimos kultūros partijos ar atsargų, ėminį, siekiant įvertinti jų masės vidurkį.

41. Bandymui atrinktos kirmėlės išimamos iš auginamos kultūros indo (apie tai išsamiau skaitykite 5 priedėlyje). Dideli (suaugę) gyvūnai, neturintys neseno dalijimosi požymių, perkeliami į stiklinius indelius (pvz., Petri lėkšteles) su švariu vandeniu. Tada jie sinchronizuojami, kaip aprašyta 5 priedėlyje. Po 10–14 parų regeneracijos laikotarpio reikėtų naudoti bandymui sveikas nepažeistas panašaus dydžio kirmėles, kurios, reaguodamos į nestiprų mechaninį dirgiklį, aktyviai plaukia arba šliaužia. Jeigu bandymo sąlygos (pvz., temperatūra, apšvietimo režimas ir paviršinis vanduo) skiriasi nuo kultūros auginimo sąlygų, turėtų pakakti, pvz., 24 val. trukmės aklimatizacijos tarpsnio esant bandymo temperatūrai, apšvietimo režimui ir naudojant tą patį paviršinį vandenį, kaip ir per bandymą, kad kirmėlės prisitaikytų prie bandymo sąlygų. Adaptuotos mažašerės žieduotosios kirmėlės turėtų būti atsitiktine tvarka paskirstytos į bandymo indus.

Šėrimas

42. Kadangi pašaro į nuosėdas dedama prieš dedant bandomąją cheminę medžiagą (arba kartu su ja), bandymo metu kirmėlės papildomai nešeriamos.

Šviesa ir temperatūra

43. Įprasta apšvietimo trukmė kultūros auginimo ir bandymo metu yra 16 valandų per parą (3), (7). Šviesa turėtų būti ne per daug stipri (pvz., 100–500 lx), imituojant natūralias sąlygas dugninių nuosėdų paviršiuje; šviesos stipris matuojamas bent kartą per bandomosios medžiagos veikimo laikotarpį. Per visą bandymą turėtų būti palaikoma pastovi 20 ± 2 °C temperatūra. Pasirinktą matavimo dieną bandymo indų temperatūra neturėtų skirtis daugiau kaip ± 1 °C. Bandymo indus reikėtų atsitiktine tvarka sudėti į bandymo inkubatorių ar bandymo vietą siekiant, pvz., sumažinti reprodukcijos skirtumą, kuris gali atsirasti dėl indų padėties.

Aeravimas

44. Paviršinis vanduo bandymo induose turėtų būti nestipriai aeruojamas (pvz., pučiant 2–4 oro burbuliukus per sekundę) per Pastero pipetę, įstatytą maždaug 2 cm atstumu iki dugninių nuosėdų paviršiaus, kad nuosėdos būtų kuo mažiau judinamos. Reikėtų stebėti, kad vandenyje ištirpusio deguonies koncentracija būtų ne mažesnė kaip 30 % oro soties vertės. Oro tiekimas turėtų būti kontroliuojamas ir, jei reikia, patikslinamas bent kartą per dieną darbo dienomis.

Vandens kokybės matavimai

45. Turėtų būti matuojami šie paviršinio vandens kokybės parametrai:

Temperatūra	Matuojama bent viename kiekvieno koncentracijos lygio bandymo inde ir viename kontrolinės grupės bandinių inde kartą per savaitę ir bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžioje bei pabaigoje; jeigu įmanoma, galima papildomai, pvz., kas valandą, užrašyti aplinkos terpės (aplinkos oro ar vandens vonelės) temperatūrą.

▼M6

Ištirpusio deguonies kiekis	Matuojamas bent viename kiekvieno koncentracijos lygio bandymo inde ir viename kontrolinės grupės bandinių inde kartą per savaitę ir bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžioje bei pabaigoje; išreiškiamas mg/l ir oro soties vertės proc.
Oro tiekimas	Turėtų būti tikrinamas bent kartą per dieną darbo dienomis ir, jei reikia, patikslinamas.
pH	Matuojamas bent viename kiekvieno koncentracijos lygio bandymo inde ir viename kontrolinės grupės bandinių inde kartą per savaitę ir bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžioje bei pabaigoje.
Bendrasis vandens kietumas	Matuojamas bent viename kartotiniame kontrolinės grupės bandinyje ir viename didžiausios koncentracijos bandymo inde bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžioje ir pabaigoje; išreiškiamas mg/l $CaCO_3$.
Bendrasis amoniako kiekis	Matuojamas bent viename kartotiniame kontrolinės grupės bandinyje ir viename kiekvieno koncentracijos lygio bandymo inde bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžioje ir vėliau 3 kartus per savaitę; išreiškiamas mg/l NH_4^+ ar NH_3 arba bendru amoniakinio azoto kiekiu.

Jeigu, matuojant vandens kokybės parametrus, reikia paimti iš indų nemažus vandens ėminius, gali būti patartina paruošti atskirus bandinių indus vandens kokybei matuoti, kad bandymo induose nepakistų vandens ir nuosėdų tūrio santykis.

Biologiniai stebėjimai

46. Bandomosios medžiagos veikimo laikotarpiu reikėtų stebėti bandymo indus, siekiant iš akies įvertinti bet kokius kirmėlių elgsenos pokyčius (pvz., nuosėdų vengimą, nuosėdų paviršiuje matomas išmatų kruopeles), lyginant su kontrolinės grupės kirmėlėmis. Stebėjimų duomenis reikėtų užrašyti.

47. Bandymo pabaigoje patikrinamas kiekvienas kartotinis bandinys (papildomų cheminei analizei skirtų bandinių indų galima netikrinti). Reikėtų tinkamu būdu išrinkti visas kirmėles iš bandymo indo, stengiantis jų nesužaloti. Vienas galimas būdas yra kirmėlių išsijojimas iš nuosėdų. Tam galima naudoti tinkamo dydžio akučių sietą iš nerūdijančio plieno. Didžioji dalis paviršinio vandens atsargiai nupilama, likusios nuosėdos ir vanduo suplakami, kad susidrumstų, ir tada drumzles galima perkošti per sietą. Naudojant 500 μm dydžio akučių sietą, dauguma nuosėdų dalelių per jį prasiskverbia labai greitai, tačiau perkošti reikėtų sparčiai, kad kirmėlės nejšliaužtų į sieto akutes ar per jas neišlįstų. Naudojant 250 μm dydžio akučių sietą, kirmėlės negalėtų įšliaužti į akutes ar per jas išlįsti, tačiau tokiu atveju reikėtų stengtis, kad siete liktų kuo mažiau nuosėdų dalelių. Perkoštas drumzles iš kiekvieno kartotinio bandinio indo galima perkošti per sietą dar kartą, kad tikrai būtų surinktos visos kirmėlės. Kitas būdas yra sušildyti nuosėdas, pastačius bandymo indus į 50–60 °C temperatūros vandens vonelę; taip kirmėlės iššliaužia iš nuosėdų ir jas galima surinkti nuo nuosėdų paviršiaus naudojant plačiaangę grūdinto stiklo pipetę. Dar vienas alternatyvus būdas yra suplakti nuosėdų drumzles ir jas išpilti į negilų tinkamo dydžio padėklą. Iš šio seklaus drumzlių sluoksnio kirmėles galima išrinkti plienine adata arba laikrodininko pincetu (naudojant jį kaip šakutę, o ne kaip chirurgines žnyples, stengiantis nesužeisti kirmėlių) ir įdėti į švarų vandenį. Iš nuosėdų drumzlių išimtos kirmėlės nuplaunamos bandymui naudotos terpės skysčiu ir suskaičiuojamos.

48. Bet kuriuo būdu išrenkant kirmėles, reikėtų įsitikinti, kad laboratorijos darbuotojai geba iš visų nuosėdų išrinkti vidutiniškai bent 90 % jose buvusių organizmų. Pavyzdžiui, tam tikrą bandomųjų organizmų kiekį

▼M6

galima įdėti į kontrolei ar bandymui naudojamas nuosėdas ir po 1 val. nustatyti, kiek jų pavyksta išimti (7).

49. Reikėtų užrašyti ir įvertinti bendrą gyvų ir negyvų individų kiekviename kartotiniame bandinyje skaičių. Negyvomis laikomos kirmėlės, kurios:

a) nereaguoja į nestiprų mechaninį dirgiklį;

b) turi irimo požymių (kartu su *a* punktu);

c) yra dingusios.

Be to, gyvas kirmėles galima suskirstyti į tris grupes:

a) didelės (suaugusios) sveikos kirmėlės be regeneruotų kūno dalių;

b) suaugusios kirmėlės, turinčios regeneruotų, šviesesnės spalvos kūno dalių (pvz., naują užpakalinę dalį, naują priekinę dalį arba naujas užpakalinę ir priekinę dalis);

c) kirmėlės, kurioms trūksta kai kurių kūno dalių (pvz., neseniai pasidalijusios kirmėlės, kurių trūkstamos kūno dalys dar neataugusios).

Šie papildomi stebėjimai nėra privalomi, tačiau gali būti naudingi papildomai aiškinant biologinius rezultatus (pvz., jeigu daug kirmėlių priskiriama *c* grupei, tai gali reikšti, kad atitinkamas poveikis pavėlino kirmėlių reprodukcijos arba regeneracijos procesą. Taip pat jeigu pastebima bandomosios ir kontrolinės grupių kirmėlių išvaizdos skirtumų (pvz., apvalkalo įtrūkių, pabrinkusių kūno dalių), reikėtų juos aprašyti.

50. Suskaičiuotos ir įvertintos kiekviename kartotiniame bandinyje rastos gyvos kirmėlės iškart perkeliamos į sausus, iš anksto pasvertus ir paženklintus svėrimo padėklus (po vieną kiekvienam kartotiniam bandiniui) ir numarinamos, į kiekvieną svėrimo padėklą įlašinant po lašą etanolio. Svėrimo padėklai įdedami į 100 ± 5 °C temperatūros džiovinimo spintą, kad per naktį išdžiūtų, po to ataušinami eksikatoriuje, pasveriami ir nustatoma kirmėlių sausosios medžiagos masė (geriausia gramais, bent dešimttūkstantųjų tikslumu).

51. Kartu su bendra sausosios medžiagos mase galima nustatyti sausosios medžiagos masę be pelenų, kaip aprašyta literatūroje (49), siekiant atsižvelgti į kirmėlių virškinamajame trakte likusias jų prarytų nuosėdų neorganines daleles.

52. Nustatomas bendras kiekvieno kartotinio bandinio biomasės kiekis, įskaitant suaugusias ir jaunikles kirmėles. Nustatant kiekvieno kartotinio bandinio biomasę, nereikėtų įskaityti negyvų kirmėlių.

Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų patikrinimas

Ėminių paėmimas

53. Bent pusiausvyros nusistovėjimo etapo pabaigoje (prieš įdedant bandomuosius organizmus) ir bandymo pabaigoje reikėtų paimti bent pačios didžiausios ir vienos mažesnės bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos ėminius cheminei analizei. Analizei reikėtų paimti bent sujungtų nuosėdų ir paviršinio vandens ėminius. Kiekvieną dieną, kurią imami ėminiai analizei, reikėtų paimti bent po du kiekvienos terpės ir bandomosios grupės ėminius. Vieną iš dviejų kartotinių ėminių galima palikti atsargai (kad jį būtų galima išanalizuoti, pvz., tuo atveju, jeigu per pradinę analizę būtų nustatytas didesnis nei ± 20 % nuokrypis nuo vardinės koncentracijos). Atsižvelgiant į konkrečias cheminių medžiagų savybes, pvz., jeigu tikėtina, kad bandomoji cheminė medžiaga bus greitai suskaidyta, analizės tvarkaraštį galima patikslinti (pvz., dažniau imti ėminius, analizuoti daugiau koncentracijos lygių)

▼M6

remiantis ekspertų vertinimu. Tokiu atveju ėminius galima imti ir tarpinėmis dienomis (pvz., septintąją dieną nuo bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžios).

54. Paviršinio vandens ėminius reikėtų imti atsargiai nupilant (dekantuojant) arba nusiurbiant dalį paviršinio vandens, stengiantis kuo mažiau sujudinti nuosėdas. Reikėtų užrašyti paimtų ėminių tūrį.

55. Pašalinus paviršinį vandenį, nuosėdas reikėtų sumaišyti iki vienalytės masės ir perkelti į tinkamą talpą. Užrašoma šlapių nuosėdų ėminio masė.

56. Jeigu reikia papildomai išanalizuoti nuosėdų porų vandenyje buvusią bandomąją cheminę medžiagą, porų vanduo gaunamas centrifuguojant iki vienalytės masės sumaišytų ir pasvertų nuosėdų ėminius. Pavyzdžiui, galima įpilti į centrifugavimo stiklines apie 200 ml šlapių nuosėdų, tada, siekiant atskirti porų vandenį, pavyzdžiai turėtų būti centrifuguojami nefiltruojant, pvz., 10 000 ± 600 × *g* intensyvumu 30–60 min., neviršijant bandymo metu buvusios temperatūros. Po centrifugavimo paviršinis skystis dekantuojamas arba nusiurbiamas pipete stengiantis, kad į jį nepatektų nuosėdų dalelių, ir užrašomas jo tūris. Taip pat užrašoma likusio nuosėdų gumulo masė. Įvertinti masės balansą arba regeneruoti bandomąją cheminę medžiagą iš vandens ir dugninių nuosėdų sistemos gali būti lengviau, jeigu nuosėdų sausosios medžiagos masė nustatoma kiekvieną ėminių ėmimo dieną. Kai kuriais atvejais gali būti neįmanoma išanalizuoti nuosėdų porų vandenyje esančių bandomosios medžiagos koncentracijų, nes ėminys tam yra per mažas.

57. Jei nepavyksta iškart atlikti analizės, visus ėminius reikėtų tinkamai laikyti, pvz., rekomenduojamomis laikymo sąlygomis, kad atitinkamos bandomosios cheminės medžiagos skilimas būtų minimalus (pvz., iš aplinkos paimti ėminiai paprastai laikomi tamsoje, – 18 °C temperatūroje). Prieš pradėdami tyrimą, gaukite informaciją apie tinkamas bandomosios cheminės medžiagos laikymo sąlygas, pavyzdžiui, laikymo trukmę ir temperatūrą, ekstrahavimo procedūras ir t. t.

Analizės metodas

58. Kadangi visa procedūra iš esmės priklauso nuo bandomajai cheminei medžiagai taikomo analizės metodo tikslumo, preciziškumo ir jautrumo, eksperimento būdu patikrinkite, ar pagal konkretų pasirinktą metodą atliekamos cheminės analizės preciziškumas ir atkuriamumas, taip pat bandomosios cheminės medžiagos regeneravimas iš vandens ir nuosėdų ėminių yra pakankami esant bent mažiausiai ir didžiausiai bandomosios medžiagos koncentracijoms. Taip pat įsitikinkite, kad kontroliniuose induose nėra bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų, viršijančių jos kiekybinio nustatymo ribą. Jeigu reikia, patikslinkite vardines koncentracijas, kai regeneruojant nustatomos kokybės kontrolės pikinės vertes (pvz., kai regeneruotas medžiagos kiekis yra mažesnis negu 80 % arba viršija 120 % pikinės vertės). Visus ėminius per visą bandymą tvarkykite taip, kad jie kuo mažiau užsiterštų ir būtų prarasta kuo mažiau bandomosios medžiagos (pvz., dėl jos įgerties (adsorbcijos) į ėminių ėmimo prietaiso paviršių).

59. Reikėtų užrašyti ir ataskaitoje nurodyti bandomosios cheminės medžiagos regeneravimo duomenis, kiekybinio nustatymo ribą ir aptikimo ribą dugninėse nuosėdose bei vandenyje.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų tvarkymas

60. Pagrindiniai per šį bandymą privalomi taikyti atsako kintamieji, kuriuos reikia statistiškai įvertinti, yra biomasė ir bendras kiekvieno kartotinio bandinio kirmėlių skaičius. Taip pat galima pasirinkti vertinti reprodukciją (kirmėlių skaičiaus padidėjimą) ir augimą (biomasės padidėjimą, nustatomą matuojant sausą biomasę). Šiuo atveju reikėtų gauti kirmėlių sausosios medžiagos masės įvertį bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžioje, pvz., išmatuojant bandymui naudojamos sinchronizuotų kirmėlių partijos reprezentatyvaus dalinio ėminio sausąją masę.

▼M6

61. Nors gaištamumas nėra šio bandymo vertinamoji baigtis, reikėtų, kiek įmanoma, įvertinti kirmėlių gaištamumą. Vertinant gaištamumą, negyvomis reikėtų laikyti tas kirmėles, kurios nereaguoja į nestiprų mechaninį dirgiklį arba turi irimo požymių, taip pat dingusias kirmėles. Gaištamumo duomenis reikėtų bent užrašyti ir į juos atsižvelgti aiškinant bandymo rezultatus.

62. Efektyviosios koncentracijos turėtų būti išreiškiamos miligramais vienam nuosėdų sausosios medžiagos masės kilogramui (mg/kg). Jei regeneruojamas bandomosios cheminės medžiagos, išmatuotos dugninėse nuosėdose arba nuosėdose ir paviršiniame vandenyje jos veikimo laikotarpio pradžioje, kiekis siekia 80–120 % vardinių koncentracijos verčių, efektyviosios koncentracijos (EC_x, NOEC, LOEC) gali būti išreiškiamos remiantis vardinėmis koncentracijomis. Jei regeneruotas kiekis daugiau kaip ± 20 % skiriasi nuo vardinių koncentracijos verčių, efektyviąsias koncentracijas (EC_x, NOEC, LOEC) reikėtų nustatyti remiantis bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžioje išmatuotomis pradinėmis koncentracijomis, pvz., atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos masės balansą bandymo sistemoje (žr. 30 skirsnį). Šiais atvejais papildomos informacijos galima gauti išanalizavus pradinius ir (arba) bandymui naudojamus tirpalus, siekiant įsitikinti, kad bandymui naudotos nuosėdos buvo tinkamai paruoštos.

EC_x

63. EC_x vertės pagal 60 skirsnyje aprašytus parametrus apskaičiuojamos taikant tinkamus statistinius metodus (pvz., probito analizę, logistinę arba Weibull funkciją, sutrumpintą Spearman-Karber metodą arba paprastąją interpoliaciją). Statistinio vertinimo gairių pateikta literatūroje (15), (50). EC_x vertė gaunama į gautą lygtį įrašant vertę, atitinkančią x % kontrolinės grupės vidurkio. Apskaičiuojant EC_{50} ar bet kokią kitą EC_x vertę turėtų būti atlikta bandomųjų grupių vidurkių ($\overline{X}$) regresinė analizė.

NOEC (LOEC)

64. Jeigu, siekiant nustatyti NOEC (LOEC), reikia atlikti statistinę analizę, būtina turėti kiekvieno indo statistinius duomenis (kartotiniais bandiniais laikomi atskiri indai). Reikėtų taikyti tinkamus statistinius metodus. Apskritai bandomosios medžiagos neigiamas poveikis, palyginti su kontroline grupe, tiriamas atliekant vienpusį (mažesnįjį) hipotezės tikrinimą, kai $p \leq 0,05$. Tolesniuose skirsniuose pateikiama pavyzdžių. Gairių, kaip pasirinkti tinkamus statistinius metodus, pateikta literatūroje (15), (50).

65. Galima testuoti normalųjį duomenų skirstinį taikant, pvz., Kolmogorov-Smirnov suderinamumo kriterijų (angl. *goodness-of-fit test*), intervalo ir standartinio nuokrypio santykio kriterijų (angl. *range-to-standard-deviation ratio test*, R/s kriterijus) arba Shapiro-Wilk kriterijų (dvipusį, $p \leq 0,05$). Cochran kriterijus, Levene kriterijus arba Bartlett kriterijus (dvipusis, $p \leq 0,05$) gali būti taikomas testuojant dispersijos vienalytiškumą. Jei tenkinamos parametrinio kriterijaus procedūrų taikymo (normalumo, dispersijos vienalytiškumo) sąlygos, galima atlikti vienpusę dispersinę analizę (ANOVA) ir vėlesnius daugeriopo palyginimo testus. Galima, atliekant porinių duomenų palyginimus (pvz., pagal Dunnett *t* kriterijų) arba taikant žingsnio žemyn trendo kriterijus (pvz., Williams kriterijų), apskaičiuoti, ar yra reikšmingų skirtumų ($p \leq 0,05$) tarp kontrolinių bandinių ir įvairių bandomosios medžiagos koncentracijų. Kitu atveju NOEC ir LOEC reikėtų nustatyti neparametriniais metodais (pvz., taikant Bonferroni U kriterijų pagal Holm arba Jonckheere-Terpstra trendo kriterijų).

Ribų nustatymo bandymas

66. Jeigu atliktas ribų nustatymo bandymas (kontrolinė grupė palyginta su vienintelės koncentracijos bandiniais) ir tenkinamos parametrinio kriterijaus procedūrų taikymo (normalumo, vienalytiškumo) sąlygos, metrinius atsakus (bendrą kirmėlių skaičių ir biomasę, išreikštą kirmėlių sausosios medžiagos mase) galima įvertinti pagal Stjudento kriterijų (*t* kriterijus). Jeigu šie reikalavimai netenkinami, galima taikyti nelygios dispersijos *t* kriterijų (Welch *t* kriterijus) arba neparametrinį kriterijų, kaip antai Mann-Whitney U kriterijų. 6 priedėlyje pateikta informacijos apie statistinį patikimumą, nustatytą tikrinant hipotezę per tarplaboratorinį bandymą pagal šį metodą.

▼M6

67. Siekiant nustatyti reikšmingus skirtumus tarp kontrolinių (kontrolės ir tirpiklio kontrolės) grupių, kiekvienos kontrolinės grupės kartotinius bandinius galima testuoti ta pačia tvarka, kaip nurodyta per ribų nustatymo bandymą. Jeigu šiais testais nenustatoma reikšmingų skirtumų, galima sujungti visus kontrolinės ir tirpiklio kontrolinės grupių kartotinius bandinius. Kitu atveju visas bandomąsias grupes reikėtų lyginti su tirpiklio kontrolės grupe.

Rezultatų aiškinimas

68. Jeigu buvo nukrypta nuo šio bandymo metodo arba jeigu išmatuotos bandymo koncentracijos vertės yra artimos aptikimo ribai pagal taikomą analizės metodą, rezultatus reikėtų aiškinti atsargiai. Bet kokius nukrypimus nuo šio bandymo metodo būtina nurodyti.

Bandymo ataskaita

69. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikta bent toliau nurodyta informacija.

— *Bandomoji cheminė medžiaga*

— Cheminės medžiagos atpažinties duomenys (bendrinis pavadinimas, cheminis pavadinimas, struktūrinė formulė, CAS numeris ir t. t.), įskaitant grynumą, ir analizės metodas, taikytas bandomosios cheminės medžiagos kiekybiniam nustatymui; šaltinis, iš kurio gauta bandomoji cheminė medžiaga, taip pat bet koks naudotas tirpiklis ir jo koncentracija.

— Bet kokia turima iki bandymo gauta informacija apie bandomosios medžiagos fizikinę prigimtį ir fizikines bei chemines savybes (pvz., tirpumą vandenyje, garų slėgį, pasiskirstymo koeficientą dirvožemyje (arba dugninėse nuosėdose, jeigu žinoma), *log* K_{ow}, stabilumą vandenyje ir t. t.).

— *Bandomoji rūšis*

— Mokslinis pavadinimas, šaltinis, bet kokia išankstinė priežiūra, aklimatizacija, kultūros auginimo sąlygos ir t. t.

— *Bandymo sąlygos*

— Taikyta bandymo procedūra (pvz., stacionarusis, pusiau stacionarusis ar pratekamojo srauto bandymas).

— Bandymo planas (pvz., bandymo indų skaičius, dydis ir iš kokios medžiagos jie pagaminti, vandens talpa induose, nuosėdų masė ir tūris kiekviename inde (per pratekamojo srauto ar pusiau stacionariojo bandymo procedūras – vandens tūrio keitimo sparta), bet koks aeravimas prieš ir per bandymą, kartotinių bandinių skaičius, kirmėlių skaičius kiekviename kartotiniame bandinyje bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžioje, bandomosios medžiagos koncentracijų skaičius, kondicionavimo trukmė, pusiausvyros nusistovėjimo ir poveikio periodai, ėminių ėmimo dažnis).

— Dugninių nuosėdų ir paviršinio vandens sluoksnių gylis.

— Bandomosios cheminės medžiagos išankstinio apdorojimo ir įterpimo į nuosėdas (naudojimo) metodas.

— Bandomosios medžiagos vardinės koncentracijos, informacija apie ėminių ėmimą cheminei analizei ir analizės metodai, pagal kuriuos gautos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos.

— Nustatytos dugninių nuosėdų savybės, kaip aprašyta 24–25 skirsniuose, ir bet kokie kiti atlikti matavimai; sintetinių nuosėdų paruošimas.

— Bandymui naudojamo vandens paruošimas (jeigu naudojamas regeneruotas vanduo) ir savybės (deguonies koncentracija, pH, laidumas, kietumas ir bet kokių kitų atliktų matavimų duomenys) iki bandymo pradžios.

— Išsami informacija apie pašarą, įskaitant jo rūšį, paruošimą, kiekį ir šėrimo tvarką.

▼M6

— Šviesos stipris ir apšvietimo laikotarpis (-iai).

— Metodai, pagal kuriuos nustatyti visi biologiniai parametrai (pvz., imant ėminius, tikrinant, sveriant bandomuosius organizmus) ir visi abiotiniai parametrai (pvz., vandens ir nuosėdų kokybės parametrai).

— Visų cheminei analizei naudotų ėminių tūris ir (arba) masė.

— Išsami informacija apie visų ėminių apdorojimą cheminei analizei, įskaitant informaciją apie bandomosios cheminės medžiagos paruošimą, laikymą, įterpimo į nuosėdas tvarką, ekstrahavimą ir analizės procedūras, taip pat apie bandomosios cheminės medžiagos regeneravimą.

— *Rezultatai*

— Vandens kokybė bandymo induose (pH, temperatūra, ištirpusio deguonies koncentracija, kietumas, amoniako koncentracijos ir bet kokių kitų atliktų matavimų duomenys).

— Nuosėdų bendrosios organinės anglies kiekis, sausosios medžiagos masės ir šviežios medžiagos masės santykis, pH ir bet kokių kitų atliktų matavimų duomenys.

— Bendras bandymo pabaigoje kiekviename bandymo inde buvusių kirmėlių skaičius ir, jeigu nustatyta, sveikų ir pažeistų kirmėlių skaičius.

— Bandymo pabaigoje kiekviename bandymo inde buvusių kirmėlių sausosios medžiagos masė ir, jeigu išmatuota, dalinio kirmėlių ėminio sausosios medžiagos masė bandymo pradžioje.

— Bet kokios pastebėtos elgsenos anomalijos (pvz., nuosėdų vengimas, ar yra, ar nėra išmatų kruopelių), palyginti su kontrolinės grupės kirmėlėmis.

— Bet koks pastebėtas gaištamumas.

— Toksiškumo vertinamųjų baigčių (pvz., EC_x, NOEC ir (arba) LOEC) įverčiai ir pagal kokius statistinius metodus jie nustatyti.

— Bandomosios medžiagos vardinės koncentracijos, išmatuotos koncentracijos ir visų analizių, atliktų bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai bandymo induose nustatyti, rezultatai.

— Bet kokie nukrypimai nuo tinkamumo kriterijų.

— *Rezultatų vertinimas*

— Rezultatų atitiktis 13 skirsnyje išvardytiems tinkamumo kriterijams.

— Rezultatų aptarimas, be kita ko, paaiškinant bet kokių nukrypimų nuo šio bandymo metodo įtaką bandymo rezultatams.

NUORODOS

(1) EC (2003). Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I – IV. Office for Official Publications of the EC (European Commission), Luxembourg.

(2) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.

▼M6

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(6) Šio priedo C.27 skyrius. Toksiškumo bandymas su chironomidais nuosėdose ir vandenyje, naudojant nuosėdas su įterpta bandomąja chemine medžiaga.

(7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(8) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(9) Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (eds), 1993, Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8-10 November 1993, Renesse (NL).

(10) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

(11) Riedhammer C. & B. Schwarz-Schulz (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105-110.

(12) ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.

(13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

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

(15) Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; fifth draft, March 2003; Report EPS 1/RM/___

(16) Nikkilä A., Halme A., Kukkonen J.V.K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35-46.

(17) Baily H.C., & Liu D.H.W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. p. 205-215. In J.C. Eaton, P.R. Parrish, and A.C. Hendricks (eds). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.

▼M6

(18) Chapman K. K., Benton M. J., Brinkhurst R. O. & Scheuerman P. R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. Environmental Toxicology. 14(2): 271-278.

(19) Meyer J.S., Boese C.J. & Collyard S.A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. Comp. Biochem. Physiol. Part C 133:99-109.

(20) Schubauer-Berigan M.K., Dierkes J.R., Monson P.D. & Ankley G.T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxciol. Chem. 12(7):1261-1266.

(21) West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps & G.T. Ankley (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. Hydrobiol. 262:57-63.

(22) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

(23) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(24) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(25) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(26) Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg. M.S., & Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42: 292-302.

(27) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(28) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.

(29) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., & Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of ^{14}C-17α-ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. Chemosphere 59, 271-280.

(31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007.

(32) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

▼M6

(33) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

(34) Dermott R. & Munawar M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 235/236: 407-414.

(35) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

(36) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(37) Šio priedo C.1 skyrius. Ūmus toksiškumas žuvims.

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

(39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.

(40) Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel and B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety, 39, 10-20.

(41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes“, 26-27.4.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(42) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

(43) Naylor, C. and C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(44) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

(45) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.

(46) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(47) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Technol. 23, 588-595.

(48) Brooke, L.T., Ankley, G.T., Call, D.J. & Cook, P.M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. Environ. Toxicol. Chem. 15, 223-228.

(49) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

▼M6

(50) OECD 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OECD, Paris, France.

(51) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

Papildoma literatūra apie statistines procedūras

Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

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

Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction: Environ. Sci. Technol. 12 (1998), 417.

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

Miller, R.G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons. New York.

Shapiro S.S. & Wilk M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591-611.

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

Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519 531.

▼M6

1 priedėlis

Sąvokų apibrėžtys

Toliau pateiktos taikant šį bandymo metodą vartojamų sąvokų apibrėžtys.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Kondicionavimo periodas skirtas dugninėse nuosėdose esančių mikroorganizmų populiacijai stabilizuoti ir, pvz., iš nuosėdų sudedamųjų dalių išsiskyrusiam amoniakui pašalinti prieš įterpiant į nuosėdas bandomąją cheminę medžiagą. Naudotas paviršinis vanduo po kondicionavimo periodo paprastai pašalinamas.

EC_x – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija dugninėse nuosėdose, per nustatytą veikimo laikotarpį padaranti X % (pvz., 50 %) poveikį tam tikram biologiniam parametrui.

Pusiausvyros nusistovėjimo periodas reikalingas tam, kad bandomoji cheminė medžiaga pasiskirstytų tarp kietosios fazės, jos porų vandens ir paviršinio vandens sluoksnio, prieš įterpiant į nuosėdas bandomąją cheminę medžiagą ir prieš įdedant bandomuosius organizmus.

Bandomosios medžiagos veikimo etapas yra laikas, kurį bandomieji organizmai yra veikiami bandomosios cheminės medžiagos.

Paruoštos nuosėdos (arba perdirbtos, dirbtinės ar sintetinės nuosėdos) yra natūralių nuosėdų fizines sudedamąsias dalis atitinkančių medžiagų mišinys.

Mažiausia pastebėto poveikio koncentracija (LOEC) yra mažiausia bandymui pasirinkta bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant pastebimas reikšmingas toksinis poveikis ($p \leq 0,05$), palyginti su kontroliniais bandiniais; tačiau visų LOEC viršijančių bandymo koncentracijų poveikis turi būti lygus LOEC poveikiui arba didesnis. Jeigu šios dvi sąlygos netenkinamos, būtina išsamiai paaiškinti, kaip pasirinkta LOEC (taigi ir NOEC) vertė.

Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) – už LOEC tik truputį mažesnė bandomosios medžiagos koncentracija, kuri per nustatytą tos medžiagos veikimo laikotarpį nepadaro statistiškai reikšmingo poveikio ($p \leq 0,05$), palyginti su kontroline grupe.

Oktanolio / vandens pasiskirstymo koeficientas (K_{ow}; taip pat kartais išreiškiamas P_{ow}) – cheminės medžiagos tirpumo n-oktanolyje ir vandenyje, esant pusiausvyrai, santykis, atitinkantis cheminės medžiagos lipofiliškumą (šio priedo A.24 skyrius). K_{ow} arba K_{ow} logaritmas (*log* K_{ow}) naudojamas cheminės medžiagos biologinio kaupimosi vandens organizmuose potencialui apibūdinti.

Organinės anglies / vandens pasiskirstymo koeficientas (K_{oc}) – cheminės medžiagos koncentracijos dugninių nuosėdų organinės anglies dalyje ar prie jos santykis su tos cheminės medžiagos koncentracija vandenyje esant pusiausvyrai.

Paviršinis vanduo – bandymo inde virš dugninių nuosėdų esantis vanduo.

Porų vanduo ar laisvasis vanduo – ertmes tarp dugninių nuosėdų arba dirvožemio dalelių užpildantis vanduo.

Nuosėdos su įterpta bandomąja medžiaga – nuosėdos, į kurias dėta bandomosios cheminės medžiagos.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

▼M6

2 priedėlis

Rekomenduojamo naudoti regeneruoto vandens sudėtis

(parengta pagal šio priedo C.1 skyrių (1))

a) *Kalcio chlorido tirpalas*

Ištirpinkite 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ dejonizuotame vandenyje, papildomai įpilkite dejonizuoto vandens iki 1 l tūrio.

b) *Magnio sulfato tirpalas*

Ištirpinkite 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ dejonizuotame vandenyje, papildomai įpilkite dejonizuoto vandens iki 1 l tūrio.

c) *Natrio hidrokarbonato tirpalas*

Ištirpinkite 2,59 g $NaHCO_3$ dejonizuotame vandenyje, papildomai įpilkite dejonizuoto vandens iki 1 l tūrio.

d) *Kalio chlorido tirpalas*

Ištirpinkite 0,23 g KCl dejonizuotame vandenyje, papildomai įpilkite dejonizuoto vandens iki 1 l tūrio.

Visos cheminės medžiagos turi būti analiziškai grynos.

Distiliuoto arba dejonizuoto vandens elektrinis laidis neturėtų viršyti 10 μScm^{-1}.

Sumaišoma po 25 ml kiekvieno iš a–d tirpalų ir papildomai įpilama dejonizuoto vandens iki bendro 1 l tūrio. Šiuose tirpaluose esančių kalcio ir magnio jonų suma yra 2,5 mmol/l.

Ca ir Mg jonų santykis yra 4:1, o Na ir K jonų santykis lygus 10:1. Šio tirpalo rūgšties talpa $K_{S4,3}$ yra 0,8 mmol/l.

Skiedimui skirtas vanduo aeruojamas iki tol, kol prisisotina deguonies, po to laikomas maždaug dvi dienas; prieš naudojant papildomai neaeruojamas.

NUORODA

(1) Šio priedo C.1 skyrius. Ūmus toksiškumas žuvims.

▼**M6**

3 priedėlis

Skiedimui tinkamo vandens fizikinės ir cheminės savybės

Sudedamoji dalis	Koncentracijos
Kietosios dalelės	< 20 mg/l
Bendroji organinė anglis	< 2 µg/l
Nejonizuotas amoniakas	< 1 µg/l
Visuminis chloro kiekis	< 10 µg/l
Bendras fosforo organinių pesticidų kiekis	< 50 ng/l
Bendras chloro organinių pesticidų ir polichlorintų bifenilų kiekis	< 50 ng/l
Visuminis organinio chloro kiekis	< 25 ng/l
(parengta pagal EBPO (1992) (1))	

NUORODA

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

▼M6

4 priedėlis

Rekomenduojamų naudoti dirbtinių nuosėdų ruošimo ir laikymo gairės

Nuosėdų sudedamosios dalys

Sudedamoji dalis	Savybės	Nuosėdų sausosios medžiagos masės %
Durpės	Samaninės durpės, vidutinio suirimo lygio, ore išdžiovintos, be pastebimų augalų liekanų, smulkiai sumaltos (dalelių dydis ≤ 0,5 mm)	5 ± 0,5
Kvarcinis smėlis	Grūdelių dydis ≤ 2 mm, tačiau > 50 % dalelių turėtų būti 50–200 μm dydžio	75–76
Kaolinas	Kaolinito kiekis ≥ 30 %	20 ± 1
Pašaras	Pvz., dilgėlių milteliai (Folia urticae), Urtica dioica (didžiosios dilgėlės) lapai, smulkiai sumalti (dalelių dydis ≤ 0,5 mm); atitinkantys farmacijos standartus, tinkami vartoti žmonėms; dedami į sausas nuosėdas	0,4–0,5 %
Organinė anglis	Kiekis tikslinamas pridedant durpių ir smėlio	2 ± 0,5
Kalcio karbonatas	Chemiškai gryni $CaCO_3$ milteliai, dedami į sausas nuosėdas	0,05–1
Dejonizuotas vanduo	≤ 10 μS/cm elektrinio laidžio, įpilamas į sausas nuosėdas	30–50

Pastaba. Jeigu tikimasi didesnių amoniako koncentracijų, pvz., kai žinoma, kad bandomoji cheminė medžiaga slopina nitrifikaciją, gali būti naudinga 50 % dilgėlių miltelių, kuriuose gausu azoto, pakeisti celiulioze (pvz., chemiškai grynais α-celiuliozės milteliais, kurių dalelių dydis ≤ 0,5 mm; (1), (2)).

Paruošimas

Durpės išdžiovinamos ore ir smulkiai sumalamos. Naudojant didelio našumo homogenizavimo įrenginį, paruošiama reikiamo durpių miltelių kiekio ir dejonizuoto vandens suspensija. Šios suspensijos pH patikslinamas iki 5,5 ± 0,5 naudojant $CaCO_3$. Suspensija bent dvi dienas kondicionuojama nestipriai maišant, 20 ± 2 °C temperatūroje, siekiant stabilizuoti pH ir paruošti stabilią mikroorganizmų populiaciją. Dar kartą išmatuojama pH vertė, kuri turėtų būti 6,0 ± 0,5. Tada durpių suspensija sumaišoma su kitomis sudedamosiomis dalimis (smėliu ir kaolinu) ir dejonizuotu vandeniu, gaunant vienalytes nuosėdas, kuriose vandens kiekis sudaro 30–50 proc. nuosėdų sausosios masės. Dar kartą išmatuojamas galutinio mišinio pH ir, jei reikia, koreguojamas naudojant $CaCO_3$, kol pasiekia 6,5–7,5. Tačiau jeigu numatoma, kad susidarys daugiau amoniako, gali būti naudinga palaikyti nuosėdų pH žemiau 7,0 lygio (pvz., nuo 6,0 iki 6,5). Paimami nuosėdų ėminiai sausosios medžiagos masei ir organinės anglies kiekiui nustatyti. Jeigu numatoma, kad susidarys daugiau amoniako, paruoštas nuosėdas galima septynias dienas kondicionuoti tokiomis pačiomis sąlygomis, kokiomis bus atliekamas bandymas (pvz., nuosėdų ir vandens santykis 1:4, nuosėdų sluoksnis tokio paties gylio, kaip ir bandymo induose), prieš įterpiant bandomąją cheminę medžiagą, t. y. jas reikėtų užpilti vandeniu ir šį vandenį nuolat aeruoti. Šio kondicionavimo periodo pabaigoje paviršinį vandenį reikėtų nupilti ir pašalinti. Tada į nuosėdas įmaišoma kvarcinio smėlio su įterpta bandomąja medžiaga iki

▼M6

kiekvieno reikiamo koncentracijos lygio, nuosėdos paskirstomos į kartotinius bandymo indus ir užpilamos bandymui naudojamu vandeniu. Po to indai inkubuojami tokiomis pačiomis sąlygomis, kokiomis bus atliekamas bandymas; tai yra pusiausvyros nusistovėjimo periodo pradžia. Paviršinis vanduo turėtų būti aeruojamas.

Pasirinkto pašaro turėtų būti dedama į dugnines nuosėdas prieš įterpiant bandomąją cheminę medžiagą arba kartu su ja. Jį galima iš pradžių sumaišyti su durpių suspensija (žr. pirmiau). Tačiau, kad įdėtas pašaras per daug nesuirtų dar prieš įdedant bandomuosius organizmus, pvz., jeigu pusiausvyros nusistovėjimo periodas yra ilgas, galima stengtis, kad kuo mažiau laiko praeitų nuo pašaro dėjimo iki bandomosios medžiagos poveikio pradžios. Siekiant užtikrinti, kad bandomosios cheminės medžiagos patektų į pašarą, jį reikėtų sumaišyti su nuosėdomis ne vėliau kaip tą dieną, kurią į nuosėdas įterpiama bandomoji cheminė medžiaga.

Laikymas

Dirbtinių nuosėdų sausas sudedamąsias dalis galima laikyti sausoje ir vėsioje vietoje kambario temperatūroje. Paruoštas nuosėdas su įterpta bandomąja chemine medžiaga reikėtų bandymui naudoti nedelsiant. Paimtus nuosėdų ėminius su įterpta bandomąja chemine medžiaga iki analizės galima laikyti tai bandomajai medžiagai tinkamomis rekomenduojamomis sąlygomis.

NUORODOS

(1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(2) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

▼M6

5 priedėlis

***Lumbriculus variegatus* kultūrų auginimo metodai**

Lumbriculus variegatus (MÜLLER, *Lumbriculidae*, *Oligochaeta*) rūšies kirmėlės gyvena gėlo vandens telkinių dugno nuosėdose ir plačiai naudojamos ekotoksikologiniams bandymams. Šių kirmėlių kultūras lengva auginti laboratorinėmis sąlygomis. Toliau apžvelgiami jų auginimo metodai.

Kultūrų auginimo metodai

Lumbriculus variegatus kultūrų auginimo sąlygos yra išsamiai apžvelgtos Phipps *et al.* (1993) (1), Brunson *et al.* (1998) (2), ASTM (2000) (3), JAV aplinkos apsaugos agentūros (2000) (4). Šios sąlygos glaustai aptariamos toliau. Svarbus *L. variegatus* naudojimo pranašumas yra spartus šios rūšies kirmėlių dauginimasis, dėl kurio greitai didėja laboratorijoje auginamų populiacijų biomasė (pvz., (1), (3), (4), (5)).

Šių kirmėlių kultūras galima auginti dideliuose (57–80 l) talpos akvariumuose, palaikant 23 °C temperatūrą ir 16 šviesos ir 8 tamsos val. apšvietimo režimą (100–1 000 lx šviesa), naudojant kasdien keičiamą natūralų vandenį (45–50 l vandens kiekviename akvariume). Ruošiant substratą, nebalinto rudojo popieriaus servetėlės sukarpomos į juosteles, kurias tada galima kelias sekundes maišyti maišytuvu įpylus auginimo terpei skirto vandens, gaunant smulkių popieriaus gumulėlių substratą. Šį substratą galima dėti tiesiai į *Lumbriculus* kultūroms skirtus akvariumus, padengiant juo akvariumo dugną, arba laikyti sušaldytą dejonizuotame vandenyje vėlesniam naudojimui. Šviežią substratą akvariume paprastai tinka laikyti apie du mėnesius.

Kiekviena nauja kirmėlių kultūra įveisiama naudojant 500–1 000 kirmėlių ir, jeigu akvariume vanduo keičiamas reguliariai arba nenutrūkstamu srautu, šeriama 3 kartus per savaitę įpilant po 10 ml suspensijos, kurioje yra 6 g upėtakiams skirto pradinio pašaro. Stacionariojo arba pusiau stacionariojo režimo sąlygomis auginamas kultūras reikėtų šerti mažiau, kad nesiveistų bakterijos ir grybeliai.

Tokiomis sąlygomis auginamos kultūros individų skaičius paprastai padvigubėja per maždaug 10–14 dienų.

Kitu atveju *Lumbriculus variegatus* kultūras taip pat galima auginti sistemoje, sudarytoje iš kvarcinio smėlio, kuris naudojamas dirbtinėms nuosėdoms, 1–2 cm gylio sluoksnio ir regeneruoto vandens. Jų auginimui galima naudoti 12–20 cm aukščio talpas iš stiklo ar nerūdijančio plieno. Vanduo turėtų būti nestipriai aeruojamas (pvz., pučiant po 2 oro burbuliukus per sekundę) per Pastero pipetę, įstatytą maždaug 2 cm atstumu iki dugninių nuosėdų paviršiaus. Siekiant išvengti, pvz., amoniako kaupimosi, paviršinį vandenį reikėtų keisti naudojant pratekamojo srauto sistemą arba bent kartą per savaitę rankiniu būdu. Mažašeres žieduotąsias kirmėles galima laikyti kambario temperatūroje, palaikant apšvietimo režimą, pagal kurį būtų 16 val. šviesos (100–1 000 lx stiprio) ir 8 val. tamsos. Pusiau stacionariojoje sistemoje (kurioje vanduo keičiamas kartą per savaitę) kirmėlės du kartus per savaitę šeriamos „TetraMin“ pašaru (pvz., 1 cm^2 nuosėdų paviršiaus plotui dedama 0,6–0,8 mg pašaro), kurį galima įpilti kaip suspensiją – 50 mg „TetraMin“/1 ml dejonizuoto vandens.

Lumbriculus variegatus iš kultūros auginimo indų galima išimti, pvz., į atskirą laboratorinę stiklinę perkeliant dalį substrato, naudojant mažų akučių tinklelį, arba išrenkant atskirus organizmus plačiaange (maždaug 5 mm skersmens) grūdinto stiklo pipete. Jeigu kirmėlės į laboratorinę stiklinę perkeliamos kartu su substratu, tuomet ši stiklinė su kirmėlėmis ir substratu paliekama per naktį nuolatinės vandens tėkmės sąlygomis. Taip iš stiklinės išplaunamas substratas, o kirmėlės lieka indo dugne. Tada jas galima įleisti į naujoms kultūroms auginti paruoštas talpas arba toliau tvarkyti per bandymą, kaip aprašyta literatūroje (3), (4) arba toliau.

Naudojant *L. variegatus* bandymams dugninėse nuosėdose, reikia kritiškai apsvarstyti jų dauginimosi būdo (architomija arba morfalaksis, pvz., (6)) klausimą. Taip nelytiškai daugindamosi kirmėlės pasidalija į dvi dalis, kurios tam tikrą laiką nesimaitina, kol atauga trūkstama galvos arba uodegos pusė (pvz., (7), (8)). Tai reiškia, kad *L. variegatus* ne visą laiką patiria bandomosios medžiagos poveikį rydamos ja užterštas nuosėdas.

▼M6

Todėl kirmėlių kultūrą reikėtų sinchronizuoti, siekiant kuo labiau sumažinti nekontroliuojamą dauginimąsi ir regeneraciją, dėl kurių bandymo rezultatų kintamumas gali būti labai didelis. Tokį kintamumą gali lemti tai, kad kai kurie pasidaliję individai kurį laiką nesimaitina, todėl patiria mažesnį bandomosios cheminės medžiagos poveikį negu kiti individai, kurie bandymo metu nesidalija (9), (10), (11). Iki bandomosios medžiagos poveikio pradžios likus 10–14 dienų, kirmėles reikėtų dirbtiniu būdu padalyti (sinchronizuoti). Sinchronizacijai atrenkamos didelės (suaugusios) kirmėlės, geriausia tokios, kurias apžiūrėjus nematyti nesenų morfalaksio požymių. Šias kirmėles galima padėti ant stiklo plokštelės kartu su lašu vandens, kuriame jos augintos, ir padalyti skalpeliu perpjaunant perpus per vidurinę kūno dalį. Reikėtų stengtis, kad atskirtos užpakalinės dalys būtų vienodo dydžio. Atskirtas užpakalines dalis reikėtų iki bandomosios medžiagos veikimo laikotarpio pradžios laikyti auginimo inde su tuo pačiu substratu, kuriame auginta kirmėlių kultūra, ir regeneruotu vandeniu, kad ataugtų naujos galvos. Ataugus naujoms galvoms, sinchronizuotos kirmėlės ima rausti substratą (kad galvos ataugo, galima įsitikinti apžiūrėjus reprezentatyvų dalinį ėminį per binokulinį mikroskopą). Po šios procedūros bandomieji organizmai turėtų būti panašios fiziologinės būklės; tai reiškia, kad iš esmės visos sinchronizuotos kirmėlės, vėliau per bandymą besidaugindamos morfalaksio būdu, turėtų patirti vienodą bandomąja medžiaga apdorotų nuosėdų poveikį. Sinchronizuotas kirmėles reikėtų pašerti iškart, kai tik jos pradeda rausti substratą, arba po padalijimo praėjus 7 dienoms. Jas šerti reikėtų panašiai, kaip ir įprastai auginamas kultūras, tačiau gali būti patartina sinchronizuotas kirmėles šerti tuo pačiu pašaru, kuris bus naudojamas per bandymą. Kirmėles reikėtų laikyti bandymo temperatūroje, 20 ± 2 °C. Po regeneracijos bandymui turėtų būti naudojamos sveikos, nepažeistos kirmėlės, kurios, reaguodamos į nestiprų mechaninį dirgiklį, aktyviai plaukia arba šliaužia. Stengiantis nesužeisti kirmėlių ir neišprovokuoti savaiminio dalijimosi (autotomijos), reikėtų, pvz., naudoti pipetes grūdinto stiklo kraštais arba nerūdijančio plieno dantų krapštukus.

Lumbriculus variegatus **pradinių kultūrų šaltiniai (JAV adresai parengti pagal (4))**

Europoje

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Germany

Bayer Crop Science AG
Development – Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Germany

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finland

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Germany

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

JAV

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

▼**M6**

U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

NUORODOS

(1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(5) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(6) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, Lumbriculus variegatus: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

(7) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(8) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and Lumbriculus variegatus in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007.

(10) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with Lumbriculus variegatus and Chironomus riparius and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

(11) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

▼M6

6 priedėlis

Tarplaboratorinio bandymo rezultatų suvestinė

„Toksiškumo *Lumbriculus variegatus* dugninėse nuosėdose bandymas“

1 lentelė.

Atskirų tarplaboratorinio bandymo etapų rezultatai: bandymo pabaigoje kontroliniuose ir tirpiklio kontroliniuose bandiniuose nustatytas vidutinis kirmėlių skaičius; SN – standartinis nuokrypis, VK – variacijos koeficientas.

	vidutinis kirmėlių skaičius kontroliniuo-se bandiniuose	SN	VK (%)	sk.	vidutinis kirmėlių skaičius tirpiklio kontroliniuo-se bandiniuose	SN	VK (%)	sk.
	32,3	7,37	22,80	3	**39,0**	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	**36,0**	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	**38,5**	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	**30,8**	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	**26,3**	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	**30,7**	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	**28,8**	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	**27,7**	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	**21,3**	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	**35,0**	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	**33,5**	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	**15,0**	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	**43,7**	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	**21,7**	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	**31,3**	4,79	15,32	4
tarplabo-ratori-nis vidurkis	**29,59**		**20,10**		**30,61**		**13,26**	
SN	**8,32**		**10,03**		**7,57**		**10,48**	
sk.	**15**				**15**			
min.	**16,3**				**15,0**			
maks.	**42,0**				**43,7**			
VK (%)	**28,1**				**24,7**			

▼M6

2 lentelė.

Atskirų tarplaboratorinio bandymo etapų rezultatai: bandymo pabaigoje kiekviename kontrolinės grupės ir tirpiklio kontrolinės grupės kartotiniame bandinyje nustatyta vidutinė bendroji kirmėlių sausosios medžiagos masė; SN – standartinis nuokrypis, VK – variacijos koeficientas

	bendra kirmėlių sausosios medžiagos masė kiekviename kartotiniame (kontroli-niame) bandinyje	SN	VK (%)	sk.	bendra kirmėlių sausosios medžiagos masė kiekvie-name kartotiniame (tirpiklio kontrolės) bandinyje	SN	VK (%)	sk.
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
tarplabo-ratori-nis vidurkis	**25,15**		**20,36**		**27,68**		**17,53**	
SN	**7,87**		**12,56**		**7,41**		**9,10**	
sk.	**15**				**15**			
min.	**12,9**				**10,5**			
maks.	**41,3**				**41,4**			
VK (%)	**31,3**				**26,8**			

▼M6

3 lentelė.

Pentachlorfenolio toksiškumas: tarplaboratorinio bandymo vertinamųjų baigčių suvestinė; tarplaboratoriniai EC_{50}, NOEC ir LOEC vidurkiai; SN – standartinis nuokrypis, VK – variacijos koeficientas

biologinis parametras		Tarplabo-rato-rinis vidurkis (mg/kg)	min.	mak-s.	Tarplabo-ratorinis koeficientas	SN	VK (%)	geometr. vidurkis (mg/kg)
bendras kirmėlių skaičius	**EC_{50}**	**23,0**	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	**9,9**	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	**27,9**	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	MPS (%)	**22,5**	7,1	39,1				
bendra kirmėlių sausosios medžiagos masė	**EC_{50}**	**20,4**	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	**9,3**	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	**25,7**	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	MPS (%)	**24,8**	10,9	44,7				
gaištamumas / išgyvenimas	**LC_{50}**	**25,3**	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOEC	**16,5**	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	**39,1**	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
reprodukcija (kirmėlių skaičiaus padidėjimas kiekviename kartotiniame bandinyje)	**EC_{50}**	**20,0**	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	**7,9**	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	**22,5**	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	MPS (%)	**29,7**	13,9	47,9				
augimas (biomasės padidėjimas kiekviename kartotiniame bandinyje)	**EC_{50}**	**15,3**	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	**8,7**	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	**24,0**	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	MPS (%)	**32,2**	13,6	65,2				

MPS – mažiausias pastebimas skirtumas nuo kontrolinių verčių tikrinant hipotezę; naudojamas kaip statistinio patikimumo matas.

NUORODA

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

▼M6

C.36. PLĖŠRIŲJŲ ERKIŲ (*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*) REPRODUKCIJOS DIRVOŽEMYJE BANDYMAS

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 226 (2008). Jis skirtas dirvožemyje esančių cheminių medžiagų poveikiui *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*, Canestrini (*Acari*: *Laelapidae*) rūšies dirvožemio erkių reprodukcijos našumui vertinti, taigi pagal jį galima vertinti savitojo populiacijos augimo greičio slopinimą (1, 2). Reprodukcijos našumas šiuo atveju reiškia bandymo laikotarpio pabaigoje nustatytą jauniklių skaičių. Atliekant bandymus su *H. aculeifer*, tiriama dar viena mitybos grandinės grandis kartu su rūšimis, kurių bandymo metodai jau parengti. Pagal šį bandymo metodą tinkamu laikomas reprodukcijos bandymas, atliekamas neskiriant ir kiekybiškai netiriant įvairių reprodukcijos ciklo etapų. Cheminėms medžiagoms, kurių poveikis patiriamas ne per dirvožemį, o pagal kitą poveikio scenarijų, gali būti tinkama taikyti kitus metodus (3).

2. *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* laikoma tipine dirvožemio faunos ir ypač plėšriųjų erkių rūšimi. Šios rūšies erkės yra paplitusios visame pasaulyje (5) ir jas lengva rinkti bei auginti laboratorijoje. *H. aculeifer* rūšies biologinės savybės apibendrintos 7 priedėlyje. Bendra informacija apie šios rūšies erkių ekologiją ir naudojimą ekotoksikologiniams bandymams paskelbta literatūroje (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

BANDYMO PRINCIPAS

3. Suaugusios erkių patelės patiria įvairių bandomosios cheminės medžiagos, kurios įmaišyta į dirvožemį, koncentracijų poveikį. Pradedant bandymą į kiekvieno kartotinio bandinio indą įdedama po 10 suaugusių patelių. Patinėliai bandymui nenaudojami, nes iš patirties žinoma, kad kai yra patinėlių, patelės su jais susiporuoja iškart arba netrukus po to, kai išsineria po deutonimfos fazės. Be to, bandymas su patinėliais truktų ilgiau, nes erkes reikėtų skirstyti į įvairias amžiaus grupes, o tai būtų sudėtinga. Taigi, erkės per patį bandymą nesiporuoja. Patelės į bandymo indą įleidžiamos po 28–35 dienų nuo tada, kai sinchronizuotoje kultūroje pradedami dėti kiaušinėliai (žr. 4 priedėlį), nes tuo metu pateles galima laikyti jau susiporavusiomis ir jų pasirengimo dėti kiaušinėlius etapas yra praėjęs. Bandymas 20 °C temperatūroje baigiamas 14 dieną po patelių įdėjimo į indą (0 dienos); per tą laiką pirmieji kontrolinės grupės palikuonys pasiekia deutonimfos vystymosi stadiją (žr. 4 priedėlį). Pagrindinis matuojamas kintamasis yra jauniklių skaičius bandymo induose; taip pat nustatomas per bandymą išgyvenusių patelių skaičius. Priklausomai nuo bandymo plano (žr. 29 skirsnį), siekiant nustatyti EC_x (pvz., EC_{10}, EC_{50}) arba nepastebėto poveikio koncentraciją (NOEC) (sąvokų apibrėžtis žr. 1 priedėlyje), bandomosios cheminės medžiagos poveikį patyrusių erkių reprodukcijos našumas palyginamas su kontrolinės grupės reprodukcijos našumu. 8 priedėlyje pateikta bandymo tvarkaraščio apžvalga.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

4. Reikėtų žinoti bandomosios cheminės medžiagos tirpumą vandenyje, *log* K_{ow}, dirvožemio ir vandens pasiskirstymo koeficientą ir garų slėgį. Patartina turėti papildomos informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos išliekamumą dirvožemyje, kaip antai jos biotinio ir abiotinio skaidymo spartą.

5. Šį bandymo metodą galima taikyti vandenyje tirpioms arba netirpioms cheminėms medžiagoms, tačiau nuo tirpumo vandenyje priklauso bandomosios cheminės medžiagos naudojimo būdas. Šis bandymo metodas netinka lakiosioms cheminėms medžiagoms, t. y. tokioms cheminėms medžiagoms, kurių Henrio dėsnio konstanta arba oro ir vandens pasiskirstymo koeficientas viršija vienetą, arba cheminėms medžiagoms, kurių garų slėgis 25 °C temperatūroje viršija 0,0133 Pa.

▼M6

BANDYMO TINKAMUMAS

6. Bandymo rezultatas pripažįstamas tinkamu, jei kontrolinės grupės bandiniai be bandomosios medžiagos atitinka šiuos kriterijus:

— suaugusių patelių vidutinis gaištamumas bandymo pabaigoje neturėtų viršyti 20 %;

— vidutinis jauniklių skaičius kiekviename kartotiniame bandinyje (į kurį įdėta 10 suaugusių patelių) bandymo pabaigoje turėtų būti bent 50;

— apskaičiuotas jauniklių erkių skaičiaus kiekviename kartotiniame bandinyje variacijos koeficientas nustatomojo bandymo pabaigoje neturėtų viršyti 30 %.

ETALONINĖ CHEMINĖ MEDŽIAGA

7. Siekiant įsitikinti, kad laboratorinės bandymo sąlygos yra tinkamos ir kad laikui bėgant nesikeičia bandomųjų organizmų atsakas į poveikį, būtina nustatyti etaloninės cheminės medžiagos EC_x ir (arba) NOEC vertes. Tinkama etaloninė cheminė medžiaga yra dimetoatas (CAS Nr. 60-51-5), kurio poveikis populiacijos dydžiui įrodytas (4). Kaip alternatyvią etaloninę cheminę medžiagą galima naudoti boro rūgštį (CAS Nr. 10043-35-3), tačiau naudojant šią medžiagą sukaupta mažiau praktinės patirties. Galimi du bandymo planai:

— per etaloninės cheminės medžiagos bandymą galima kartu nustatyti kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą esant vienai jos koncentracijai, kurios poveikis, kaip iš anksto įrodyta atlikus dozės ir atsako tyrimą, yra palikuonių skaičiaus sumažėjimas daugiau kaip 50 %. Šiuo atveju kartotinių bandinių turėtų būti tiek pat, kiek ir kontrolinėse grupėse (žr. 29 skirsnį);

— kitu atveju etaloninės cheminės medžiagos bandymas atliekamas 1–2 kartus per metus kaip dozės ir atsako tyrimas. Priklausomai nuo pasirinkto bandymo plano, koncentracijų bei kartotinių bandinių skaičius ir santykis skiriasi (žr. 29 skirsnį), tačiau gautas atsakas turėtų būti 10–90 % poveikis (koncentracijos turėtų skirtis pastoviu 1,8 santykiu). Pagal jauniklių skaičių nustatyta dimetoato EC_{50} vertė turėtų patekti į intervalą, kuriame 3,0–7,0 mg aktyviosios medžiagos tenka vienam dirvožemio (sausosios medžiagos masės) kilogramui. Remiantis iki šiol naudojant boro rūgštį gautais rezultatais, pagal jauniklių skaičių nustatyta EC_{50} vertė turėtų patekti į intervalą, kuriame 100–500 mg aktyviosios medžiagos tenka vienam sausosios dirvožemio medžiagos masės kilogramui.

BANDYMO APRAŠYMAS

Bandymo indai ir įranga

8. Turėtų būti naudojami 3–5 cm skersmens bandymo indai (dirvožemio sluoksnis juose turėtų būti ≥ 1,5 cm storio), pagaminti iš stiklo arba kitos chemiškai inertinės medžiagos, su sandariu dangteliu. Geriausia naudoti užsukamus dangtelius; tokiu atveju indus galima pravėdinti du kartus per savaitę. Kitu atveju galima naudoti tokius dangtelius (pvz., iš marlės), per kuriuos vyktų tiesioginė dujų apykaita tarp substrato ir atmosferos oro. Kadangi per bandymą turi būti palaikomas pakankamas drėgnis, itin svarbu bandymo metu tikrinti kiekvieno bandymo indo masę ir, jei reikia, įpilti daugiau vandens. Tai gali būti ypač svarbu tada, kai naudojami indai be užsukamų dangtelių. Jeigu bandymo indas yra nepermatomas, jo dangtelis turėtų būti pagamintas iš šviesai pralaidžios medžiagos (pvz., perforuotas skaidrus dangtelis), tačiau toks, kad per jį neišropotų erkės. Bandymo indų dydis ir rūšis priklauso nuo to, kokiu metodu bus surenkamos erkės (apie tai išsamiau skaitykite 5 priedėlyje). Jeigu erkės surenkamos tiesiogiai kaitinant bandymo indą, indo dugnas gali būti su įdėtu tinkamo dydžio tinkleliu (kuris iki erkių surinkimo laikomas uždengtas), o dirvožemio sluoksnis turėtų būti pakankamai storas, kad temperatūra ir drėgnio lygis jame keistųsi laipsniškai.

▼M6

9. Bandymui reikalinga standartinė laboratorinė įranga, visų pirma:

— geriausia naudoti stiklinius indus su užsukamais dangteliais;

— džiovinimo spinta;

— stereomikroskopas;

— šepetėliai, naudojami erkėms perkelti;

— pH matuoklis ir liuksmetras;

— tinkamos tikslios svarstyklės;

— tinkama temperatūros kontrolės įranga;

— tinkama oro drėgnio kontrolės įranga (nebūtinai, jeigu bandymo indai uždengiami dangteliais);

— reguliuojamos temperatūros inkubatorius arba maža patalpa;

— įranga erkėms surinkti (žr. 5 skirsnį) (13);

— virš galvos įrengta reguliuojamos šviesos lempa;

— stiklainiai, į kuriuos dedamos surinktos erkės.

Dirbtinio dirvožemio paruošimas

10. Per šį bandymą naudojamas dirbtinis dirvožemis. Šis dirbtinis dirvožemis ruošiamas iš tokių sudedamųjų dalių (visos vertės nurodytos sausosios medžiagos mase):

— 5 % samaninių durpių, ore išdžiovintų ir smulkiai sumaltų (tinkamas dalelių dydis yra 2 ± 1 mm);

— 20 % kaolino (patartina, kad kaolinito jame būtų daugiau kaip 30 %);

— apie 74 % ore išdžiovinto pramoninio smėlio (priklausomai nuo reikiamo $CaCO_3$ kiekio), daugiausia smulkaus, kad daugiau kaip 50 % dalelių jame būtų 50–200 μm dydžio. Tikslus smėlio kiekis priklauso nuo $CaCO_3$ kiekio (žr. toliau), kartu jie turėtų sudaryti iki 75 % dirbtinio dirvožemio;

— < 1,0 % kalcio karbonato (analiziškai grynų $CaCO_3$ miltelių), kad būtų gautas 6,0 ± 0,5 pH; dedamo kalcio karbonato kiekis gali daugiausia priklausyti nuo durpių kokybės ir (arba) rūšies (žr. 1 pastabą).

1 pastaba. Reikiamas $CaCO_3$ kiekis priklausys nuo dirvožemio substrato sudedamųjų dalių ir turėtų būti nustatytas prieš pat bandymą išmatuojant dalinių dirvožemio ėminių pH (14).

2 pastaba. Durpių kiekis dirbtiniame dirvožemyje skiriasi nuo kiekio, naudojamo pagal kitus dirvožemio organizmų bandymų metodus, kai daugeliu atvejų naudojama 10 % durpių (pvz., (15)). Tačiau, EPPO duomenimis (16), įprastame žemės ūkio paskirties dirvožemyje yra ne daugiau kaip 5 % organinės medžiagos, taigi, mažinant durpių kiekį, sumažinama natūraliam dirvožemiui būdinga tikimybė, kad bandomoji cheminė medžiaga įsigers į organinę anglį.

3 pastaba. Kai reikia, pvz., konkretiems bandymo tikslams pasiekti, kaip bandymo ir (arba) kultūrų auginimo substratą taip pat galima naudoti natūralų dirvožemį, paimtą iš neužterštų vietų. Tačiau jeigu naudojamas natūralus dirvožemis, jį apibūdinant reikėtų nurodyti bent jo kilmę (surinkimo

▼M6

vietą), pH, struktūrą (granuliometrinę sudėtį) ir organinės anglies kiekį jame. Jeigu žinoma, reikėtų nurodyti dirvožemio rūšį ir pavadinimą pagal dirvožemio klasifikaciją. Dirvožemyje neturėtų būti jokių teršalų. Tuo atveju, jeigu bandomoji cheminė medžiaga yra metalas arba organinis metalo junginys, taip pat reikėtų nustatyti katijonų mainų talpą. Ypač daug dėmesio reikėtų skirti tam, kad būtų tenkinami bandymo tinkamumo kriterijai, nes bendros informacijos apie natūralius dirvožemius paprastai yra nedaug.

11. Sausos dirvožemio sudedamosios dalys kruopščiai sumaišomos (pvz., naudojant didelį laboratorinį maišytuvą); tinkamai pH vertei nustatyti naudojamas dirvožemio ir 1 M kalio chlorido (KCl) arba 0,01 M kalcio chlorido ($CaCl_2$) tirpalas santykiu 1:5 (žr. (14) ir 3 priedėlį). Jeigu dirvožemio rūgštumas viršija tinkamą intervalą (žr. 10 skirsnį), jį galima pakoreguoti įdedant tinkamą $CaCO_3$ kiekį. Jeigu dirvožemis yra pernelyg kalkingas, jį galima pataisyti įdedant daugiau mišinio, į kurį dėta pirmųjų trijų 10 skirsnyje nurodytų sudedamųjų dalių, bet nedėta $CaCO_3$.

12. Dirbtinio dirvožemio didžiausias vandens įmirkis nustatomas pagal 2 priedėlyje aprašytas procedūras. Iki bandymo pradžios likus 2–7 dienoms, sausas dirbtinis dirvožemis iš pradžių sudrėkinamas įpilant pakankamai distiliuoto arba dejonizuoto vandens, kad jame būtų maždaug pusė galutinio vandens kiekio (40–60 % didžiausio vandens įmirkio). Dirvožemio drėgnis patikslinamas iki 40–60 % didžiausio vandens įmirkio, įpilant bandomosios cheminės medžiagos tirpalo ir (arba) papildomai įpilant distiliuoto ar dejonizuoto vandens (žr. 16–18 skirsnius). Dirvožemio drėgnį galima papildomai apytikriai nustatyti nestipriai suspaudus saujoje šiek tiek dirvožemio – jei drėgnis yra tinkamas, tarp pirštų turėtų pasirodyti smulkių vandens lašelių.

13. Dirvožemio drėgnis nustatomas pradedant ir baigiant bandymą, išdžiovinus jį iki pastovios masės 105 °C temperatūroje pagal standartą ISO 11465 (17), o dirvožemio pH – pagal 3 priedėlį arba standartą ISO 10390 (14). Šiuos matavimus reikėtų atlikti papildomai paimtuose tiek kontrolinės grupės, tiek kiekvienos bandomosios medžiagos koncentracijos dirvožemio bandiniuose be erkių. Dirvožemio pH neturėtų būti koreguojamas atliekant rūgštinių arba šarminių cheminių medžiagų bandymus. Dirvožemio drėgnį reikėtų stebėti per visą bandymą, reguliariai pasveriant indus (žr. 20 ir 24 skirsnius).

Bandomųjų gyvūnų atranka ir paruošimas

14. Šiam bandymui naudojami *Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer* (Canestrini, 1883) rūšies gyvūnai. Pradedant bandymą imamos suaugusios erkių patelės iš sinchronizuotos vados. Erkės bandymui turėtų būti imamos, pvz., praėjus 7–14 dienų nuo subrendimo ir 28–35 dienoms nuo tada, kai sinchronizuotoje grupėje pradeda dėti kiaušinėlius (žr. 3 skirsnį ir 4 priedėlį). Turėtų būti nurodytas šaltinis, iš kurio gautos erkės, arba, jeigu erkių kultūra auginama laboratorijoje, – jos tiekėjas ir priežiūra. Laboratorijoje auginant erkių kultūrą, rekomenduojama bent kartą per metus pakartotinai identifikuoti jos rūšį. Rūšiai identifikuoti skirta lentelė pateikta 6 priedėlyje.

Bandymui pasirinktų koncentracijų terpių ruošimas

15. Bandomoji cheminė medžiaga įmaišoma į dirvožemį. Organinius tirpiklius, kurie naudojami dirvožemio apdorojimui bandomąja chemine medžiaga palengvinti, reikėtų parinkti atsižvelgiant į nedidelį jų toksiškumą erkėms; bandymo plane turi būti numatyta tinkama tirpiklio kontrolė (žr. 29 skirsnį).

Vandenyje tirpi bandomoji cheminė medžiaga

16. Bandomosios cheminės medžiagos tirpalo dejonizuotame vandenyje paruošiama tiek, kad jo pakaktų visiems vienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotiniams bandiniams. Patartina naudoti tinkamą vandens kiekį reikiamam drėgniui, t. y. 40–60 % didžiausio vandens įmirkio, pasiekti (žr. 12 skirsnį). Kiekvienas bandomosios cheminės medžiagos tirpalas prieš dedant į bandymo indą gerai sumaišomas su viena iš anksto sudrėkinto dirvožemio porcija.

▼M6

Vandenyje netirpi bandomoji cheminė medžiaga

17. Bandomąsias chemines medžiagas, kurios yra netirpios vandenyje, tačiau tirpios organiniuose tirpikliuose, galima ištirpinti minimaliame tinkamo nešiklio (pvz., acetono) kiekyje. Reikėtų naudoti tik lakiuosius tirpiklius. Naudojant tokius nešiklius, visuose bandymui pasirinktų koncentracijų ir kontroliniuose bandiniuose turėtų būti vienodas minimalus nešiklio kiekis. Nešiklis užpurškiamas ant nedidelio smulkaus kvarcinio smėlio kiekio, pvz., 10 g, arba su juo sumaišomas. Atitinkamai reikėtų patikslinti bendrą substrate esančio smėlio kiekį. Nešiklis pašalinamas bent vieną valandą garinant po traukos gaubtu. Šis kvarcinio smėlio ir bandomosios cheminės medžiagos mišinys įberiamas į iš anksto sudrėkintą dirvožemį ir kruopščiai su juo sumaišomas įpylus reikiamą dejonizuoto vandens kiekį, kad dirvožemio drėgnis būtų tinkamas. Gautas mišinys sudedamas į bandymo indus. Atminkite, kad kai kurie tirpikliai gali būti nuodingi erkėms. Todėl, jeigu tirpiklio toksiškumas erkėms nežinomas, rekomenduojama naudoti papildomą kontrolinį bandinį su vandeniu, bet be nešiklio. Jeigu patikimai įrodyta, kad tirpiklis (tokios koncentracijos, kokios bus naudojamas) neturi poveikio erkėms, vandens kontrolinių bandinių galima neruošti.

Vandenyje ir organiniuose tirpikliuose mažai tirpi bandomoji cheminė medžiaga

18. Kai cheminės medžiagos yra mažai tirpios vandenyje ir organiniuose tirpikliuose, kiekvienam bandymo indui imama po 2,5 g smulkiai sumalto kvarcinio smėlio (pvz., keturiems kartotiniams bandiniams imama 10 g smulkaus kvarcinio smėlio), kuris sumaišomas su tinkamu bandomosios cheminės medžiagos kiekiu, kad būtų gauta bandymui reikiama jos koncentracija. Atitinkamai reikėtų patikslinti bendrą substrate esančio smėlio kiekį. Šis kvarcinio smėlio ir bandomosios cheminės medžiagos mišinys įberiamas į iš anksto sudrėkintą dirvožemį ir kruopščiai su juo sumaišomas įpylus reikiamą dejonizuoto vandens kiekį, kad dirvožemio drėgnis būtų tinkamas. Gautas mišinys išskirstomas į bandymo indus. Ta pati procedūra kartojama ruošiant kiekvienos koncentracijos bandinius, taip pat paruošiama tinkama kontrolinių bandinių grupė.

PROCEDŪRA

Bandomosios ir kontrolinės grupės

19. Į kiekvieną kontrolinės ir bandomosios grupių indą rekomenduojama įdėti po 10 suaugusių patelių ir 20 g dirbtinio dirvožemio (sausosios medžiagos masės). Bandomuosius organizmus reikėtų įdėti per dvi valandas po galutinio bandymui naudojamo substrato paruošimo (t. y. po to, kai įdedama bandomoji medžiaga). Konkrečiais atvejais (pvz., kai brandinimas laikomas lemiamu veiksniu), galima pailginti laiko tarpą nuo galutinio substrato paruošimo bandymui iki erkių įdėjimo (daugiau apie tokį brandinimą skaitykite literatūroje (18)). Tačiau tokiais atvejais būtina pateikti mokslinį pagrindimą.

20. Sudėjus į dirvožemį erkes, joms įdedama pašaro ir reikėtų išmatuoti pradinę kiekvieno bandymo indo masę, kuria remiantis bus galima stebėti dirvožemio drėgnį per visą bandymą, kaip aprašyta 24 skirsnyje. Tada bandymo indai uždengiami, kaip aprašyta 8 skirsnyje, ir įdedami į bandymo kamerą.

21. Tinkami kontroliniai bandiniai paruošiami pagal kiekvieną iš 15–18 skirsniuose aprašytų bandomosios cheminės medžiagos naudojimo metodų. Ruošiant kontrolinius bandinius, taikomos tos pačios aprašytos procedūros, išskyrus tai, kad į juos nededama bandomosios cheminės medžiagos. Todėl, kai tinka, į kontrolinius bandinius dedama organinių tirpiklių, kvarcinio smėlio ar kitų nešiklių tomis pačiomis koncentracijomis (kiekiais), kaip ir į bandomosios grupės indus. Kai bandomoji cheminė medžiaga dedama naudojant tirpiklį ar kitą nešiklį, jeigu tirpiklio toksiškumas nežinomas, taip pat reikėtų paruošti ir išbandyti papildomą kontrolinį bandinį be nešiklio ir be bandomosios cheminės medžiagos (žr. 17 skirsnį).

▼M6

Bandymo sąlygos

22. Per bandymą turėtų būti palaikoma 20 ± 2 °C temperatūra. Temperatūrą reikėtų išmatuoti ir užrašyti bent kartą per dieną ir, jei reikia, patikslinti. Atliekant bandymą reguliuojamas šviesos ir tamsos ciklas (geriausia, kad būtų 16 val. šviesos ir 8 val. tamsos) ir bandymo indų vietoje palaikomas apšvietimas 400–800 lx šviesa. Siekiant palyginamumo, šios sąlygos yra tokios pačios, kaip ir per kitus dirvožemio ekotoksikologinius bandymus (pvz., (15)).

23. Reikėtų užtikrinti dujų apykaitą, aeruojant bandymo indus bent dukart per savaitę, jeigu naudojami užsukami dangteliai. Jeigu naudojami marlės dangteliai, reikėtų skirti daugiau dėmesio tam, kad būtų palaikomas reikiamas dirvožemio drėgnis (žr. 8 ir 24 skirsnius).

24. Per visą bandymą palaikomas reikiamas vandens kiekis dirvožemio substrate, bandymo indus reguliariai pasveriant ir, jei reikia, įpilant daugiau vandens (pvz., kartą per savaitę). Sumažėjęs drėgnis, kai reikia, atkuriamas įpilant dejonizuoto vandens. Dirvožemio drėgnis per bandymą neturėtų daugiau kaip 10 % nukrypti nuo pradinės vertės.

Šėrimas

25. Įrodyta, kad tinkamas pašaras yra sūrinės erkutės *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781). Taip pat gali tikti mažos kolembolos (pvz., jauniklės *Folsomia candida Willem*, 1902 arba *Onychiurus fimatus* (19), (20)), enchitrėjai (pvz., *Enchytraeus crypticus*, Westheide ir Graefe, 1992) arba nematodai (pvz., *Turbatrix silusiae* de Man, 1913)) (21). Rekomenduojama patikrinti pašarą prieš naudojant jį bandymui. Pašaro turėtų būti dedama tokios rūšies ir tiek, kad erkių jauniklių skaičius būtų pakankamas pagal bandymo tinkamumo kriterijus (6 skirsnis). Išrenkant tinkamą grobį erkėms, reikėtų atsižvelgti į bandomosios medžiagos veikimo būdą (pvz., akaricidas gali būti toksiškas ir maistinėms erkutėms, žr. 26 skirsnį).

26. Pašaro turėtų būti dedama *ad libitum* (t. y. kaskart dedamas mažas kiekis (ant mentelės galo)). Šiuo tikslu taip pat galima naudoti nestiprų siurbliuką, kaip tai siūloma daryti per kolembolų bandymą, arba ploną teptuką. Paprastai pakanka įdėti pašaro bandymo pradžioje ir vėliau du arba tris kartus per savaitę. Jeigu atrodo, kad bandomoji medžiaga yra toksiška erkių grobiui, reikėtų apsvarstyti galimybę dėti pašaro dažniau ir (arba) pasirinkti kitą pašaro šaltinį.

Tinkamų bandomosios medžiagos koncentracijų pasirinkimas

27. Turint išankstinių žinių apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą, pvz., atlikus intervalo nustatymo tyrimus, turėtų būti lengviau pasirinkti bandymui tinkamas jos koncentracijas. Kai reikia, atliekamas intervalo nustatymo bandymas pasirinkus, pvz., penkias bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas nuo 0,1 iki 1 000 mg vienam sauso dirvožemio kilogramui, bandomosiose grupėse ir kontrolinėje grupėje paruošiant bent po vieną kartotinį bandinį. Intervalo nustatymo bandymas trunka 14 dienų, po kurių nustatomas suaugusių erkių gaištamumas ir jauniklių skaičius. Galutinio bandymo koncentracijos verčių intervalą geriausia pasirinkti tokį, kad jame esančios koncentracijos paveiktų jauniklių skaičių, bet ne motininės kartos patelių išgyvenimą. Tačiau tai gali būti neįmanoma, kai mirtiną ir nemirtiną poveikį sukelia beveik vienodos bandomosios medžiagos koncentracijos. Efektyviosios koncentracijos vertės (pvz., EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) ir koncentracijų, kurioms esant patiriamas reikšmingas bandomosios cheminės medžiagos poveikis, intervalas turėtų patekti į bandymui pasirinktų koncentracijos verčių intervalą. Ekstrapoliuoti iki kur kas mažesnių negu mažiausioji poveikį bandomiesiems organizmams daranti koncentracija arba kur kas didesnių nei didžiausia bandomoji koncentracija verčių reikėtų tik išimtiniais atvejais ir reikėtų išsamiai tai paaiškinti bandymo ataskaitoje.

Bandymo planas

Dozės ir atsako bandymai

28. Remiantis rekomendacijomis, pateiktomis atlikus kitą tarplaboratorinį bandymą (enchitrėjų reprodukcijos bandymas, (22)), siūlomi trys bandymo

▼M6

planai. Kad visi šie planai apskritai yra tinkami, įsitikinta gavus *H. aculeifer* tinkamumo patvirtinimo rezultatą.

29. Nustatant koncentracijų intervalą būtina turėti omenyje šiuos dalykus:

— nustatant EC_x (pvz., EC_{10}, EC_{50}) reikėtų bandymui rinktis mažiausiai dvylika koncentracijų. Rekomenduojama paruošti bent po du kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotinius bandinius ir šešis kontrolinius kartotinius bandinius. Koncentracijos gali skirtis įvairiu santykiu, kuris, pvz., gali būti mažesnis ar lygus 1,8 tikėtino poveikio intervale arba viršyti 1,8, esant didesnėms arba mažesnėms koncentracijoms;

— nustatant NOEC, reikėtų bandymui rinktis bent penkias koncentracijos vertes, išdėstytas geometrine progresija. Rekomenduojama paruošti po keturis kiekvienos bandymui pasirinktos koncentracijos kartotinius bandinius ir dar aštuonis kontrolinius bandinius. Pasirinktos koncentracijos vertės turėtų skirtis pastoviu santykiu, neviršijančiu 2,0;

— NOEC ir EC_x galima kartu nustatyti pagal bendrą metodą. Pagal jį turėtų būti aštuonios bandomosios medžiagos koncentracijos, išdėstytos geometrine progresija. Rekomenduojama paruošti po keturis kiekvienos koncentracijos kartotinius bandinius, taip pat aštuonis kontrolinius bandinius. Pasirinktos koncentracijos vertės turėtų skirtis pastoviu santykiu, neviršijančiu 1,8.

Ribų nustatymo bandymas

30. Jeigu jokio bandomosios medžiagos poveikio nenustatoma esant didžiausiai jos koncentracijai (t. y. 1 000 mg/kg sauso dirvožemio masės) per intervalo nustatymo bandymą, nustatomąjį reprodukcijos bandymą galima atlikti kaip ribų nustatymo bandymą, pasirinkus bandomosios medžiagos koncentraciją, lygią 1 000 mg/kg sauso dirvožemio masės. Per ribų nustatymo bandymą bus galima įrodyti, kad poveikio reprodukcijai NOEC arba EC_{10} viršija ribinę koncentraciją, ir kartu bandymui panaudoti minimalų erkių kiekį. Reikėtų paruošti po aštuonis tiek bandomąja medžiaga apdoroto dirvožemio, tiek kontrolinius kartotinius bandinius.

Bandymo trukmė ir matavimai

31. Reikėtų užrašyti bet kokius pastebėtus elgsenos ir morfologinius erkių kontroliniuose ir bandomųjų grupių induose skirtumus.

32. 14 dieną likusios gyvos erkės išrenkamos iš dirvožemio naudojant surinkimo kaitinant ar veikiant šviesa ar bet kurį kitą tinkamą metodą (žr. 5 priedėlį). Jauniklės erkės (t. y. lervos, protonimfos ir deutonimfos) ir suaugusios erkės atskirai suskaičiuojamos. Visos tuo metu nerastos suaugusios erkės užrašomos kaip negyvos, darant prielaidą, kad šios erkės žuvo ir suiro iki vertinimo. Surinkimo efektyvumas turi būti kartą ar dukart per metus patvirtinamas naudojant kontrolinius bandinius, kuriuose suaugusių ir jauniklių erkių skaičius žinomas. Vidutinis visų vystymosi stadijų erkių surinkimo efektyvumas turėtų viršyti 90 % (žr. 5 priedėlį). Suaugusių ir jauniklių erkių skaičius, atsižvelgiant į surinkimo efektyvumą, netikslinamas.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų tvarkymas

33. 36–41 skirsniuose pateikta informacijos apie statistinius metodus, kuriuos galima taikyti analizuojant bandymo rezultatus. Taip pat reikėtų remtis EBPO dokumentu Nr. 54 „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application“ (Dabartiniai ekotoksiškumo duomenų statistinės analizės metodai. Jų taikymo gairės) (31).

34. Pagrindinė bandymo vertinamoji baigtis yra reprodukcijos našumas, šiuo atveju – kiekviename kartotiniame bandymo inde (į kurį įleista 10 suaugusių patelių) atsivestų jauniklių skaičius. Atliekant statistinę analizę būtina apskaičiuoti kiekvienos bandomosios ir kontrolinės grupės aritmetinį vidurkį

▼M6

(X) ir dispersiją (s^2). X ir s^2 vertės naudojamos per ANOVA procedūras, kaip antai taikant Stjudento *t* kriterijų, Dunnett kriterijų arba Williams kriterijų, taip pat apskaičiuojant 95 % pasikliautinuosius intervalus.

Pastaba. Ši pagrindinė vertinamoji baigtis yra lygiavertė vislumui, kuris apskaičiuojamas kaip gyvų per bandymą atsivestų jauniklių skaičius, padalytas iš bandymo pradžioje į indą įdėtų motininių patelių skaičiaus.

35. Kontroliniuose bandiniuose be bandomosios medžiagos išgyvenusių patelių skaičius yra svarbus tinkamumo kriterijus, kurį reikia užrašyti bandymo dokumentuose. Kaip ir per intervalo nustatymo bandymą, galutinėje ataskaitoje reikėtų aprašyti ir visus kitus kenksmingo poveikio požymius.

EC_x

36. EC_x vertės, įskaitant susijusias atitinkamo 34 skirsnyje apibūdinto parametro žemutinę ir viršutinę 95 % pasikliovimo ribas, apskaičiuojamos taikant tinkamus statistinius metodus (pvz., probito analizę, logistinę arba Weibull funkciją, sutrumpintą Spearman-Karber metodą arba paprastąją interpoliaciją). EC_x vertė gaunama į gautą lygtį įrašant vertę, atitinkančią x % kontrolinės grupės vidurkio. Apskaičiuojant EC_{50} ar bet kokią kitą EC_x vertę turėtų būti atlikta bandomųjų grupių vidurkių (X) regresinė analizė.

NOEC (LOEC)

37. Jeigu, siekiant nustatyti NOEC (LOEC), reikia atlikti statistinę analizę, būtina turėti kiekvieno indo statistinius duomenis (kartotiniais bandiniais laikomi atskiri indai). Turėtų būti taikomi tinkami statistiniai metodai (pagal EBPO dokumentą Nr. 54 „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“). Apskritai bandomosios medžiagos neigiamas poveikis, palyginti su kontroline grupe, tiriamas atliekant vienpusį (mažesnįjį) hipotezės tikrinimą, kai $p \leq 0,05$. Tolesniuose skirsniuose pateikiama pavyzdžių.

38. Galima testuoti normalųjį duomenų skirstinį taikant, pvz., Kolmogorov-Smirnov suderinamumo kriterijų, intervalo ir standartinio nuokrypio santykio kriterijų (R/s kriterijus) arba Shapiro-Wilk kriterijų (dvipusį, $p \leq 0,05$). Cochran kriterijus, Levene kriterijus arba Bartlett kriterijus (dvipusis, $p \leq 0,05$) gali būti taikomas testuojant dispersijos vienalytiškumą. Jei tenkinamos parametrinio kriterijaus procedūrų taikymo (normalumo, dispersijos vienalytiškumo) sąlygos, galima atlikti vienpusę dispersinę analizę (ANOVA) ir vėlesnius daugeriopo palyginimo testus. Galima, atliekant daugeriopus palyginimus (pvz., pagal Dunnett *t* kriterijų) arba taikant žingsnio žemyn trendo kriterijus (pvz., Williams kriterijų monotoniško dozės ir atsako santykio atveju), apskaičiuoti, ar yra reikšmingų skirtumų ($p \leq 0,05$) tarp kontrolinių bandinių ir įvairių bandomosios medžiagos koncentracijų (rekomenduojamas kriterijus pasirenkamas pagal EBPO dokumentą Nr. 54 „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application“). Kitu atveju NOEC ir LOEC reikėtų nustatyti neparametriniais metodais (pvz., taikant Bonferroni U kriterijų pagal Holm arba Jonckheere-Terpstra trendo kriterijų).

Ribų nustatymo bandymas

39. Jeigu atliktas ribų nustatymo bandymas (kontrolinė grupė palyginta su vienintelės koncentracijos bandiniais) ir tenkinamos parametrinio kriterijaus procedūrų taikymo (normalumo, homogeniškumo) sąlygos, metrinius atsakus galima įvertinti pagal Stjudento kriterijų (*t* kriterijus). Jeigu šie reikalavimai netenkinami, galima taikyti nelygios dispersijos *t* kriterijų (Welch *t* kriterijus) arba neparametrinį kriterijų, kaip antai Mann-Whitney U kriterijų.

40. Siekiant nustatyti reikšmingus skirtumus tarp kontrolinių (kontrolės ir tirpiklio kontrolės) grupių, kiekvienos kontrolinės grupės kartotinius bandinius galima testuoti ta pačia tvarka, kaip nurodyta per ribų nustatymo bandymą. Jeigu šiais testais nenustatoma reikšmingų skirtumų, galima

▼M6

sujungti visus kontrolinės ir tirpiklio kontrolinės grupių kartotinius bandinius. Kitu atveju visas bandomąsias grupes reikėtų lyginti su tirpiklio kontrolės grupe.

Bandymo ataskaita

41. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikta bent toliau nurodyta informacija:

— *Bandomoji cheminė medžiaga*

— Bandomosios cheminės medžiagos tapatybė, pavadinimas, partija, siunta ir CAS numeris, grynumas.

— Bandomosios cheminės medžiagos fizikinės ir cheminės savybės (pvz., *log* K_{ow}, tirpumas vandenyje, garų slėgis, Henrio dėsnio konstanta ir (H) ir, pageidautina, informacija apie bandomosios cheminės medžiagos išliekamumą dirvožemyje).

— *Bandomieji organizmai*

— Bandomųjų organizmų identifikacija ir tiekėjas, jų kultūros auginimo sąlygų apibūdinimas.

— Bandomųjų organizmų amžiaus grupė.

— *Bandymo sąlygos*

— Bandymo plano ir eigos aprašymas.

— Informacija apie bandomojo dirvožemio paruošimą; jeigu naudotas natūralus dirvožemis – išsamus jo aprašymas (kilmė, istorija, granuliometrinė sudėtis, pH, organinės anglies kiekis ir, jei žinoma, dirvožemio klasifikacija).

— Didžiausias dirvožemio vandens įmirkis.

— Dirvožemio apdorojimo bandomąja chemine medžiaga metodo aprašymas.

— Informacija apie kartu su bandomąja chemine medžiaga naudojamas pagalbines chemines medžiagas.

— Bandymo indų dydis ir bandomojo dirvožemio sausosios medžiagos masė kiekviename inde.

— Bandymo sąlygos: šviesos stipris, šviesos ir tamsos ciklų trukmė, temperatūra.

— Šėrimo tvarkos aprašymas, bandymui naudojamo pašaro rūšis ir kiekis, šėrimo dienos.

— Dirvožemio (kontrolinių ir kiekvienos bandomosios grupės bandinių) pH ir drėgnis bandymo pradžioje ir bandymo metu.

— Išsamus erkių surinkimo metodo aprašymas ir surinkimo efektyvumas.

— *Bandymo rezultatai*

— Bandymo pabaigoje kiekviename bandymo inde nustatytas jauniklių skaičius.

— Suaugusių patelių skaičius ir suaugusių erkių gaištamumas (%), nustatytas bandymo pabaigoje kiekviename bandymo inde.

— Pastebimų simptomų arba akivaizdžių elgsenos pokyčių aprašymas.

— Bandymui naudojant etaloninę cheminė medžiagą gauti rezultatai.

— suvestiniai statistiniai (EC_x ir (arba) NOEC) duomenys, įskaitant 95 % pasikliovimo ribas ir apskaičiavimo metodo aprašymą.

▼**M6**

— Koncentracijos ir atsako santykio grafikas.

— Nukrypimai nuo nustatytų pagal šį bandymo metodą atliekamų procedūrų ir bet kokie per bandymą pastebėti nenumatyti reiškiniai.

NUORODOS

(1) Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). Gayana Zool. 57, 21-46.

(2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidinae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. Pacific Insects 24, 259-274.

(3) Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. and van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. JSS – Journal of Soils and Sediments 3, 73-77.

(4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2nd edition In: Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 pp.

(5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the popualation development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). In: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): Modern Acarology. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487-492

(6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Proc. 2nd Symp. EURAAC: p 241-249.

(7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. Proc. IXth Internat. Congr. Acarol. 1994, Columbus, Ohio: p 621-628.

(8) Krogh, P.H. and Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. In: Lokke, H. and van Gestel, C.A.M.: Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley Sons, Chichester, p 239-251.

(9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Römbke, J., Rundgren, S. and Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests – Invertebrates. In: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 pp.

(10) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395-433.

(11) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Boden-raubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N.F. 34, 413-433.

(12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. and Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite Hypoaspis aculeifer Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 39, 7154-7157.

(13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, 95-122.

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

▼M6

(15) Šio priedo C.8 skyrius. Toksiškumas sliekams.

(16) EPPO (2003): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.

(17) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.

(18) Fairbrother, A., Glazebrock, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.

(19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von Hypoaspis aculeifer Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit Onychiurus fimatus Gisin (Collenbola). Ges.allg..angew. Ent. 3:122-125.

(20) Schlosser, H.J., und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilden (Gamasina). Zool.Beitr. N.F. 34(3):395-433.

(21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. and Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator Hypoaspis aculeifer (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.

(22) Šio priedo C.32 skyrius. Enchitrėjų reprodukcijos bandymas.

(23) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

(24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 pp.

(25) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 pp.

(26) Lesna, I. and Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with „good genes“ in a soil predatory mite. Nature 401, 581-583.

(27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.

(28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.

(29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). Zoologica Poloniae 24, 11-59.

(30) Kevan, D.K. McE. and Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of Hypoaspis aculeifer (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). Acarologia 6, 647-658.

(31) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/-MONO(2006)18.

▼M6

1 priedėlis

Sąvokų apibrėžtys

Toliau pateiktos taikant šį bandymo metodą vartojamų sąvokų apibrėžtys (atliekant šį bandymą visos efektyviosios koncentracijos išreiškiamos kaip bandomosios cheminės medžiagos masės santykis su bandymui naudojamo dirvožemio sausosios medžiagos mase).

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant jokio poveikio nepastebima. Atliekant šį bandymą, NOEC atitinkanti koncentracija per nustatytą veikimo laikotarpį nepadaro statistiškai reikšmingo poveikio ($p < 0,05$), palyginti su kontroline grupe.

Mažiausia pastebėto poveikio koncentracija (LOEC) – mažiausia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuri per nustatytą veikimo laikotarpį padaro statistiškai reikšmingą poveikį ($p < 0,05$), palyginti su kontroline grupe.

EC_x (x % poveikį sukelianti efektyvioji koncentracija) – bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant bandomieji organizmai patiria x % poveikį per atitinkamą tos medžiagos veikimo laikotarpį, palyginti su kontroliniu bandiniu. Pavyzdžiui, EC_{50} yra koncentracija, kuri, kaip įvertinta, iki bandymo vertinamosios baigties per nustatytą bandomosios medžiagos veikimo laikotarpį paveikia 50 % atitinkamos populiacijos.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

▼M6

2 priedėlis

Didžiausio dirvožemio vandens įmirkio nustatymas

Nustatyta, kad didžiausiam dirvožemio vandens įmirkiui įvertinti tinka šis metodas, apibūdintas standarto ISO DIS 11268-2 C priede („Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction“ (23)).

Paimkite nustatytą bandomojo dirvožemio substrato kiekį (pvz., 5 g) naudodami ėminiams imti tinkamą prietaisą (vamzdelį su įvijomis ar kt.). Vamzdelio apačią uždenkite filtravimo popieriaus lapu, pripildę jį vandens, ir pastatykite jį ant stovo vandens vonelėje. Vamzdelis turėtų laipsniškai panirti, kol vanduo apsems dirvožemio paviršių, tada jį reikėtų palikti vandenyje maždaug 3 val. Kadangi ne visas į dirvožemio poras įsigėręs vanduo gali būti sulaikytas jame, reikėtų paimti dirvožemio ėminį dviem valandoms, kad pasišalintų vandens perteklius, padėjus vamzdelį ant stipriai sudrėkinto smulkiai sumalto kvarcinio smėlio pakloto uždengtame inde (kad neišdžiūtų). Tada ėminį reikėtų pasverti, prieš tai išdžiovinus iki pastovios masės 105 °C temperatūroje. Vandens įmirkį tada galima apskaičiuoti taip:

$$\text{Vandens įmirkis (sausosios medžiagos masės \%)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Šioje formulėje:

S = vandeniu sumirkęs substratas + vamzdelio masė + filtravimo popieriaus masė

T = tara (vamzdelio masė + filtravimo popieriaus masė)

D = sauso substrato masė

▼**M6**

3 priedėlis

Dirvožemio PH nustatymas

Šis dirvožemio pH nustatymo metodas yra pagrįstas standarte ISO DIS 10390 (Dirvožemio kokybė. pH nustatymas) pateiktu aprašymu (16).

Tam tikras nustatytas dirvožemio kiekis mažiausiai 12 valandų džiovinamas kambario temperatūroje. Tada iš šio dirvožemio paruošiama penkis kartus didesnio tūrio suspensija (joje turi būti mažiausiai 5 g dirvožemio) naudojant 1 M analiziškai gryno kalio chlorido (KCl) arba 0,01 M analiziškai gryno kalcio chlorido ($CaCl_2$) tirpalą. Tada suspensija penkias minutes kruopščiai purtoma, po to paliekama nusistovėti mažiausiai 2 valandas, bet ne ilgiau kaip 24 valandas. Tada išmatuojamas skystosios fazės pH naudojant pH matuoklį, kuris prieš kiekvieną matavimą kalibruojamas naudojant tinkamą buferinių tirpalų (pvz., pH = 4,0 ir 7,0) seriją.

▼M6

4 priedėlis

Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer **bei maistinių erkių auginimas ir kultūros sinchronizavimas**

Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer **auginimas**

Auginamas erkių kultūras galima prižiūrėti plastikiniuose induose arba stiklainiuose, pripildytuose gipso ir medžio anglių miltelių mišinio (santykiu 9:1). Gipso drėgnį galima palaikyti, kai reikia, įlašinant kelis distiliuoto arba dejonizuoto vandens lašus. Erkėms auginti optimali temperatūra yra 20 ± 2 °C, o šviesos ir tamsos periodų kaita šiai rūšiai nėra svarbi. Šių erkių grobiu gali būti *Typrophagus putrescentiae* arba *Caloglyphus* sp. erkės (maistines erkes reikėtų tvarkyti atsargiai, nes jos gali žmonėms sukelti alergijas), tačiau taip pat tinka nematodai, enchitrėjai ir kolembolos. Reikėtų nurodyti, iš kokio šaltinio gauti šie gyvūnai. Populiacijai pradėti veisti pakanka vienos patelės, nes patinėliai išsirita iš neapvaisintų kiaušinėlių. Populiacijoje paprastai vienu metu vystosi kelios erkių kartos. Patelė trumpiausiai gyvena 100 dienų ir per gyvenimą padėti apie 100 kiaušinėlių. Sparčiausiai patelės kiaušinėlius deda būdamos 10–40 dienų amžiaus (po to, kai tampa suaugusios); tuo metu kiaušinėlių dėjimo sparta yra 2,2 kiaušinėlio patelei^{-1} per parą$^{-1}$. Vystymosi laikas nuo kiaušinėlio iki suaugusios patelės, esant 20 °C temperatūrai, trunka apie 20 parų. Vienu metu reikėtų prižiūrėti ir iš anksto paruošti ne vieną, o daugiau erkių kultūrų.

Typrophagus putrescentiae **auginimas**

Šios erkės laikomos stikliniame inde, pripildytame smulkių alaus mielių miltelių. Šis indas įdedamas į plastikinį kibirą, į kurį įpilta KNO_3 tirpalo, kad erkės nepabėgtų. Maistinės erkės padedamos ant šių miltelių, po to atsargiai mentele įmaišomos į miltelius (kuriuos reikia dukart per savaitę keisti).

Kultūros sinchronizavimas

Bandymui turėtų būti naudojami to paties amžiaus egzemplioriai (pvz., praėjus 7 dienoms po to, kai erkės tampa suaugusios). Auginant erkes 20 °C temperatūroje, tai pasiekiama toliau aprašytu būdu.

Perkelkite pateles į švarų auginimui skirtą indą ir įdėkite pakankamai pašaro;

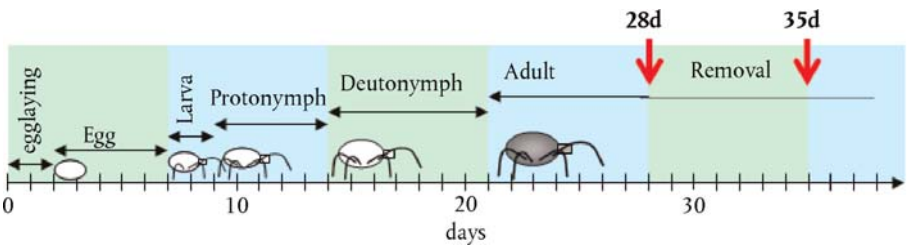
— palikite dviem arba trims dienoms, kad padėtų kiaušinėlius, tada pateles išimkite;

— bandymui imkite suaugusias pateles po 28–35 parų nuo pradžios, įdėdami suaugusias pateles į švarius auginimui skirtus indus.

Suaugusias pateles lengva atskirti nuo patinėlių ir kitų vystymosi etapų individų iš to, kad jos yra didesnės ir išsipūtusios, su rudu nugaros skydeliu (patinėliai yra plonesni ir plokščios formos), o nesubrendę individai yra baltos arba kreminės spalvos. Esant 20 °C temperatūrai, erkių vystymasis maždaug atitinka tolesniame paveiksle parodytą modelį: kiaušinėlis – 5 d., lerva – 2 d., protonimfa – 5 d., deutonimfa – 7 d., patelės pasirengimo dėti kiaušinėlius periodas – 2 d. Po to erkės tampa suaugusios.

Paveikslas.

Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer **vystymasis 20 °C temperatūroje („Išėmimas“ –išimamos patelės, kurios bus naudojamos bandymui)**



▼**M6**

Suaugę bandomieji gyvūnai išimami iš sinchronizuotos kultūros indo ir įleidžiami į bandymo indus praėjus 28–35 dienoms nuo tada, kai motininės patelės pradeda dėti kiaušinėlius (t. y. po 7–14 parų nuo tada, kai erkės tampa suaugusios). Taip užtikrinama, kad bandomųjų gyvūnų pasiruošimo dėti kiaušinėlius periodas būtų jau pasibaigęs ir patelės būtų susiporavusios su taip pat kultūros auginimo inde esančiais patinėliais. Iš laboratorijose auginamų kultūrų stebėjimų žinoma, kad jeigu yra patinėlių, patelės su jais susiporuoja iškart arba netrukus po to, kai tampa suaugusios, (Ruf, Vaninnen, asmeninių stebėjimų duomenys). Septynių parų periodas pasirenkamas tam, kad būtų lengviau prisitaikyti prie laboratorijos darbo tvarkaraščio ir individualaus erkių vystymosi kintamumas būtų mažesnis. Prasidėjus kiaušinėlių dėjimo etapui, patelių turėtų būti mažų mažiausiai tiek pat, kiek jų galiausiai reikės bandymui (jeigu, pvz., bandymui reikia 400 patelių, tai mažiausiai 400 patelių reikėtų leisti dėti kiaušinėlius dvi–tris dienas. Sinchronizuotai populiacijai pradėti reikėtų bent 1 200 kiaušinėlių (lyčių santykis apie 0,5, gaištamumas apie 0,2). Kad nebūtų kanibalizmo, geriau viename inde laikyti ne daugiau kaip 20–30 kiaušinėlius dedančių patelių.

▼M6

5 priedėlis

Erkių surinkimo metodai

Siekiant atskirti individus nuo dirvožemio arba substrato, kuriame jie laikyti, mikroskopiniams nariuotakojams tinkamas metodas yra surinkimas kaitinant (žr. tolesnę schemą). Šis metodas pagrįstas organizmų aktyvumu, todėl įmanoma suskaičiuoti tik judrius individus. Surinkimo kaitinant esmė yra laipsniškai sudaryti ėminyje esantiems organizmams vis mažiau pakenčiamas sąlygas, kad jie išlįstų iš substrato ir sukristų į skystą fiksatorių (pvz., etanolį). Svarbiausi aspektai yra surinkimo procedūros trukmė ir tai, kad nuo organizmams palankių iki pakenčiamų ir, vėliau, nebepakenčiamų sąlygų būtų pereita laipsniškai. Surinkti gyvūnus po ekotoksikologinių bandymų reikia kuo greičiau, nes jeigu per tą laiką, kol jie renkami, jų populiacija bent kiek padidėtų, būtų gauti klaidingi bandymo rezultatai. Kita vertus, temperatūros ir drėgmės sąlygos ėminyje visada turi būti tokios, kad erkės galėtų judėti. Kaitinant dirvožemio ėminį, substratas išdžiūsta. Jei jis džiūsta per greitai, kai kurios erkės taip pat gali sudžiūti, nespėjusios iš jo ištrūkti.

Todėl siūloma taikyti toliau nurodytą procedūrą (24), (25).

Aparatūra. Naudojamas Tulgreno piltuvas arba taikomi panašūs metodai, pvz., pagal McFadyen (kaitinama iš viršaus, ėminys padedamas virš piltuvo).

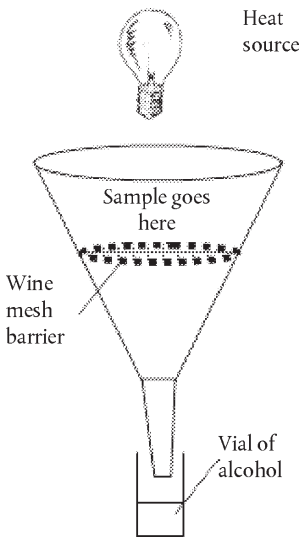
Kaitinimo režimas: 12 val. – 25 °C, 2 val. – 35 °C, 24 val. – 45 °C temperatūra (iš viso 48 val.). Temperatūrą reikėtų matuoti substrate.

Naudojamas skystas fiksatorius – 70 % etanolis.

Procedūros aprašymas: paimkite bandymui naudotą stiklinį indą. Nuimkite jo dangtelį ir angą uždenkite tinkleliu arba audinio atraiža. Audinyje esantys tarpeliai turėtų būti 1,0–1,5 mm dydžio. Audinį pritvirtinkite prie indo gumine juostele. Indą atsargiai apverskite ir įstatykite į aparatą, skirtą erkėms rinkti. Audinys sulaiko substratą, kad šis nebyrėtų į skystą fiksatorių, tačiau erkės per jį gali išlįsti iš ėminio. Kaitinti pradėkite tada, kai į aparatą įstatysite visus indus. Erkių rinkimą baikite po 48 valandų. Paimkite indus su skystu fiksatoriumi ir suskaičiuokite jame esančias erkes per stereomikroskopą.

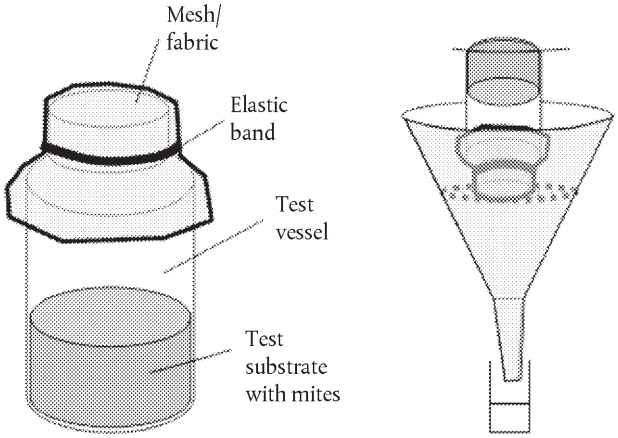
Būtina 1–2 kartus per metus įrodyti erkių rinkimo pasirinktu metodu efektyvumą, tam naudojant indus, kuriuose yra tam tikras žinomas jauniklių bei suaugusių erkių, laikomų bandymui naudojamame substrate be bandomosios medžiagos, skaičius. Bendras erkių (įskaitant visų vystymosi pakopų individus) surinkimo efektyvumas turėtų būti ≥ 90 %.

Tulgreno piltuvo tipo erkių surinkimo prietaisas



▼**M6**

Bandymo indo paruošimas baigus bandymą, prieš surenkant erkes



▼**M6**

6 priedėlis

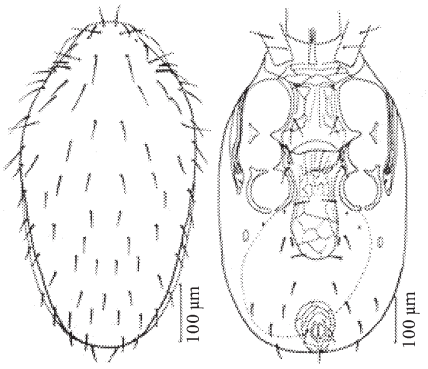
***Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* rūšies identifikavimas**

Poklasis, būrys, pobūris	Šeima	Gentis, pogentis, rūšis
Acari / Parasitiformes / Gamasida	Laelapidae	*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

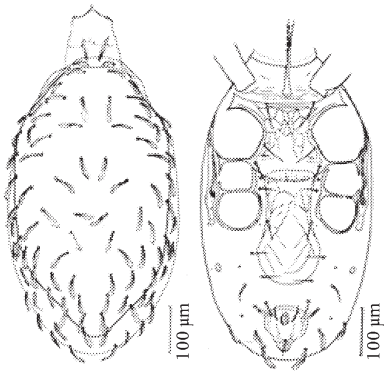
Autorius ir data	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 2007 m. sausio 23 d.

Naudojama literatūra:	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2nd revised edition: 1-523. Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9, p. 400. Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., p. 509.

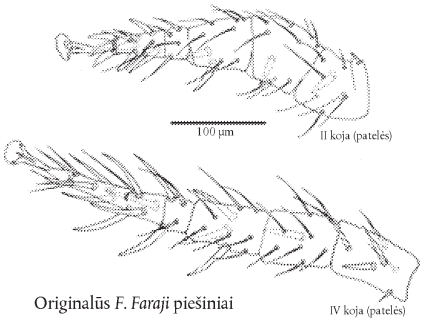
Rūšies identifikaciniai požymiai:	Iškyša (lot. *tectum*) suapvalintu dantytu kraštu; hipostomos grioveliai su daugiau kaip 6 danteliais; uodegos dorsaliniai Z4 šereliai nelabai ilgi; nugaros šereliai setiforminiai; genitalinis skydelis normalus, ne per daug padidėjęs ir nesiekia analinio skydelio; nugaros skydelio užpakalinė dalis be neporinių šerelių; ant II ir IV kojų yra storų makrošerelių; nugaros Z5 šerelis maždaug du kartus ilgesnis negu J5; cheliceros pamatinis narelis su 12–14 danteliais, o judantysis narelis su 2 danteliais; idiosomos ilgis 520–685 μm. *Hypoaspis miles* rūšies erkės taip pat naudojamos biologinei kontrolei ir gali būti supainiotos su *H. aculeifer*. Pagrindinis skirtumas yra toks: *H. miles* priklauso *Cosmolaelaps* pogenčiui, jų nugaros šereliai peilio formos, o *H. aculeifer* priklauso *Geolaelaps* pogenčiui, nugaros šereliai setiforminiai.



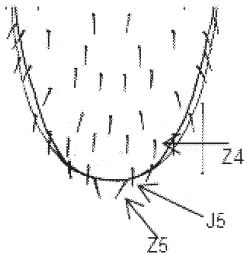
Hypoaspis aculeifer pagal *Hughes*, 1976



Hypoaspis miles pagal *Hughes*, 1976



Originalūs *F. Faraji* piešiniai



Hypoaspis aculeifer,
nugaros skydelis su būdingais šereliais

▼M6

7 priedėlis

Pagrindinė informacija apie *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* biologines savybes

Hypoaspis aculeifer priklauso *Lealapidae* šeimai, *Acari* (erkių) būriui, *Arachnida* klasei, *Arthropoda* tribai. Šios erkės gyvena visų rūšių dirvožemyje ir maitinasi kitomis erkėmis, nematodais, enchitrėjais ir kolembolomis (26). Trūkstant maisto, jos yra linkusios į kanibalizmą (27). Plėšriųjų erkių kūnas susideda iš idiosomos ir gnatosomos. Prosomos (galvos) ir opistosomos (pilvo) dalys idiosomoje nėra aiškiai diferencijuotos. Gnatosomoje (galvos skydelyje) yra tokie mitybos organai kaip čiuptuvėliai ir chelicera. Cheliceros yra trišakės, su įvairių formų danteliais. Patinėliai cheliceras naudoja ne tik rydami grobį, bet ir daugiausia perduodami spermatoforus patelėms. Nugaros skydelis dengia beveik visą idiosomą. Didelę patelių idiosomos dalį užima dauginimosi organai, kurie yra itin išryškėja prieš pat dedant kiaušinėlius. Pilvo pusėje aptinkami du skydeliai – prieškrūčio ir genitalinis. Visos kojos yra apaugusios šereliais ir dygliukais. Šie šereliai atlieka atraminę funkciją erkėms judant dirvožemyje ar jo paviršiuje. Pirmoji kojų pora daugiausia atlieka čiuptuvėlių funkciją. Antroji kojų pora naudojama ne tik judėjimui, bet ir grobiui sugriebti. Ketvirtosios kojų poros dygliukai gali atlikti apsauginę ir „judėjimo atspirties“ funkciją (28). Patinėliai yra 0,55–0,65 mm ilgio ir 10–15 μg svorio. Patelės yra 0,8–0,9 mm ilgio ir sveria 50–60 μg (8), (28) (1 pav.).

1 pav.

***H. aculeifer* patelė, patinėlis, protonimfa ir lervos.**



23 °C temperatūroje erkių patelės lytiškai subręsta per 16, patinėliai – per 18 parų (6). Patelės perima iš patinėlių spermatozoidus solenostomomis ir iš ten jie patenka į kiaušides. Kiaušidėse spermatozoidai subręsta ir saugomi iki apvaisinimo, kuris įvyksta tik kiaušidėse subrendus spermatozoidams. Apvaisintus arba neapvaisintus kiaušinėlius patelės padeda grupėmis arba atskirai, daugiausia į dirvožemyje esančius plyšius ar duobeles. Iš susiporavusių patelių kiaušinėlių gali išsiristi abiejų lyčių jaunikliai, o iš nesusiporavusių patelių kiaušinėlių išsirita tik patinėliai. Iki tampa suaugusiais, individai pereina keturias vystymosi pakopas (kiaušinėlis – lerva, lerva – protonimfa, protonimfa – deutonimfa, deutonimfa – suaugusi erkė).

Kiaušinėliai yra pieno baltumo spalvos, permatomi, elipsės formos ir maždaug 0,37 mm ilgio, su kietu kevalu. Kaip rašoma (8), lervos yra 0,42–0,45 mm dydžio. Jos turi tik tris kojų poras. Galvos regione yra susiformavę čiuptuvėliai ir cheliceros. Cheliceros su keliais smulkiais danteliais reikalingos tam, kad lervos galėtų išsiristi iš kiaušinėlių. Praėjus 1–2 dienoms po to, kai lervos išsirita iš kiaušinėlių, po pirmojo nėrimosi, susiformuoja protonimfos. Jos taip pat yra baltos spalvos, 0,45–0,62 mm dydžio (8), su keturiomis kojų poromis. Cheliceros yra su visais dantimis. Nuo šios stadijos erkės ima ieškoti pašaro. Jos praduria cheliceromis grobio kutikulę ir įšvirkščia sekreto, reikalingo išoriniam virškinimui, o tada susiurbia apviršintas maistines medžiagas. Cheliceros taip pat

▼**M6**

gali būti naudojamos stambesnėms dalelėms nuo pašaro gabalėlių atskirti (28). Po dar vieno nėrimosi susiformuoja deutonimfos. Jos yra 0,60–0,80 mm (8) dydžio, nuo geltonos iki šviesiai rudos spalvos. Nuo šio etapo jau galima atskirti pateles ir patinėlius. Po dar vieno nėrimosi, per kurį gyvūnai yra neaktyvūs ir formuojasi rudasis skydelis, (maždaug po 14 parų) erkės tampa suaugusios (28), (29), (30). Jų gyvenimo trukmė, esant 25 °C temperatūrai, yra nuo 48 iki 100 dienų (27).

▼**M6**

8 priedėlis

Pagrindinių veiksmų, reikalingų atliekant bandymą su *Hypoaspis*, santrauka ir tvarkaraštis

Laikas (dienomis) bandymo pradžia = 0 diena	Veikla / užduotis
-35 d. iki -28 d.	Perkelkite pateles iš pradinės kultūros į švarius indus, kad būtų galima pradėti sinchronizaciją Po 2 parų išimkite pateles du ar tris kartus per savaitę įdėkite pakankamai pašaro
-5 d. (+/- 2)	Paruoškite dirbtinį dirvožemį
-4 d. (+/- 2)	Nustatykite dirbtinio dirvožemio vandens įmirkį Per naktį džiovinkite Kitą dieną pasverkite ėminius ir apskaičiuokite vandens įmirkį
-4 d. (+/- 2)	Iš anksto sudrėkinkite dirbtinį dirvožemį, kad būtų pasiektas 20–30 % vandens įmirkis
0 d.	Pradėkite bandymą – į dirbtinį dirvožemį įdėkite bandomosios cheminės medžiagos Į kiekvieną kartotinį bandinį įdėkite 10 patelių Pasverkite kiekvieną kartotinį bandinį Paruoškite abiotinius kontrolinius bandinius drėgniui ir pH matuoti, taip pat po du kiekvienos koncentracijos bandomosios grupės kartotinius bandinius Drėgniui matuoti skirtus kontrolinius bandinius per naktį džiovinkite Kitą dieną pasverkite drėgniui matuoti skirtus kontrolinius bandinius Kitą dieną išmatuokite išdžiovintų abiotinių kontrolinių bandinių pH
(maždaug) 3, 6, 9, 12 d.	Į kiekvieną kartotinį bandinį įdėkite pakankamą pašarui skirtų organizmų kiekį Pasverkite kiekvieną kartotinį bandinį ir galiausiai papildykite išgaravusį vandenį
14 d.	Nutraukite bandymą, pasiruoškite surinkti erkes iš visų kartotinių bandinių, taip pat erkių surinkimo efektyvumo kontrolei Drėgnio kontrolinius bandinius per naktį džiovinkite Kitą dieną pasverkite drėgnio kontrolinius bandinius Kitą dieną išmatuokite išdžiovintų kontrolinių bandinių pH
16 d.	Baikite rinkti erkes
16+ d.	Užrašykite surinktų suaugusių ir jauniklių erkių skaičių Surašykite rezultatus į standartinės formos lenteles Aprašykite bandymo procedūrą bandymo protokolo lakštuose.

▼M6

C.37. 21 DIENOS TRUKMĖS ŽUVŲ TYRIMAS. TRUMPALAIKIS ESTROGENINIO BEI ANDROGENINIO VEIKIMO IR AROMATAZĖS SLOPINIMO ATRANKOS TYRIMAS

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) Nr. 230 (2009). Poreikis parengti ir patvirtinti žuvų tyrimo, kuriuo galima nustatyti tam tikras endokrininę sistemą veikiančias chemines medžiagas, metodiką atsirado susirūpinus, kad aplinkos užterštumas cheminėmis medžiagomis gali kelti neigiamą poveikį ir žmonėms, ir laukinei gyvūnijai, nes šios cheminės medžiagos sąveikauja su endokrinine sistema. 1998 m. EBPO iniciatyva pradėtas didelės svarbos darbas – peržiūrėti esamas gaires ir parengti naujas endokrininę sistemą galbūt ardančių medžiagų atrankos ir bandymų gaires. Viena iš šio darbo dalių – parengti žuvų endokrininę sistemą veikiančių cheminių medžiagų atrankos bandymų gaires. Įgyvendinta 21 dienos trukmės poveikio žuvų endokrininei sistemai atrankos tyrimo patikimumo vertinimo programa – ją sudarė su parinktomis cheminėmis medžiagomis atlikti tarplaboratoriniai tyrimai, kuriais siekta įrodyti tyrimo aktualumą ir patikimumą nustatant estrogeninį poveikį turinčias ir aromatazę slopinančias chemines medžiagas (1, 2, 3, 4, 5) trijų tiriamų rūšių žuvų (juodosios drūtagalvės rainės, japoninės medakos ir zebrinės danijos) organizmuose; nustatyti androgeninį veikimą galima juodosios drūtagalvės rainės ir medakos, bet ne zebrinės danijos organizme. Šiuo bandymo metodu negalima nustatyti antiandrogeninį poveikį turinčių cheminių medžiagų. Patikimumo vertinimo darbo rezultatus peržiūrėjo EBPO bandymų gairių programos nacionalinių koordinatorių paskirtų ekspertų grupė (6). Tyrimas nėra skirtas konkretiems hormonų veiklos sutrikimo mechanizmams nustatyti, nes tiriamieji gyvūnai turi sveiką pagumburio, hipofizės ir lytinių liaukų (PHL) ašį, kuri gali reaguoti į PHL ašį įvairiais lygmenimis veikiančias chemines medžiagas. Atliekant trumpalaikį žuvų gebėjimo daugintis tyrimą (EBPO TG Nr. 229), vertinamas juodosios drūtagalvės rainės vaisingumas ir prireikus lytinių liaukų histopatologija, taip pat visos į šį bandymo metodą įtrauktos vertinamosios baigtys. EBPO TG Nr. 229 suteikia galimybę nustatyti chemines medžiagas, veikiančias dauginimąsi per įvairius, įskaitant endokrininius, mechanizmus. Į šiuos skirtumus reikėtų atkreipti dėmesį, kad būtų pasirinktas tinkamiausias bandymo metodas.

2. Šiame bandymo metode aprašomas *in vivo* atrankos tyrimas, per kurį lytiškai subrendęs žuvies patinas ir neršianti patelė tam tikrą jų gyvenimo ciklo dalį (21 dieną) laikomi kartu ir veikiami tam tikra chemine medžiaga. Pasibaigus 21 dienos veikimo chemine medžiaga laikotarpiui, atsižvelgiant į naudotą žuvų rūšį, kaip tiriamosios cheminės medžiagos estrogeninio veikimo, aromatazės slopinimo ar androgeninio veikimo rodikliai vertinamos viena arba dvi patinų ir patelių biologinių žymenų vertinamosios baigtys; šios vertinamosios baigtys yra vitelogeninas ir antriniai lytiniai požymiai. Vitelogeninas matuojamas juodosios drūtagalvės rainės, japoninės medakos ir zebrinės danijos, o antriniai lytiniai požymiai – tik juodosios drūtagalvės rainės ir japoninės medakos organizme.

3. Šis biologinis tyrimas yra tam tikrų endokrininio pobūdžio veikimo mechanizmų *in vivo* atrankos tyrimas ir jo taikymą reikėtų vertinti atsižvelgiant į konceptualią EBPO parengtą endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo sistemą (28).

PIRMINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

4. Vitelogeninas, kaip atsakas į cirkuliuojantį endogeninį estrogeną, paprastai gaminamas kiaušinius dedančių stuburinių gyvūnų patelių kepenyse. Tai yra kiaušinio trynio baltymų pirmtakas, kuris, pasigaminęs kepenyse, per kraujotaką patenka į kiaušides, o ten yra panaudojamas ir modifikuojamas besivystančių kiaušinėlių. Nesubrendusių žuvų patelių ir patinų plazmoje vitelogenino beveik neįmanoma aptikti, nes jų organizme nepakanka cirkuliuojančio estrogeno, tačiau kepenys gali sintezuoti ir išskirti vitelogeniną reaguodamos į egzogeninio estrogeno poveikį.

▼M6

5. Matuojant vitelogenino kiekį, galima nustatyti įvairias chemines medžiagas, turinčias įvairaus pobūdžio estrogeninį poveikį. Estrogenines chemines medžiagas galima aptikti matuojant vitelogenino indukciją žuvies patino organizme – tai išsamiai aprašyta ekspertų įvertintoje literatūroje (pvz. (7)). Taip pat nustatyta, kad vitelogenino indukciją sukelia aromatizuojamų androgenų poveikis (8, 9). Sumažėjus patelių organizme cirkuliuojančiam estrogenų kiekiui, pavyzdžiui, dėl aromatazės – fermento, kuris endogeninį androgeną paverčia natūraliu estrogenu (17β-estradioliu), slopinimo, sumažėja vitelogenino, naudojamo cheminėms medžiagoms, turinčioms aromatazės slopinimo savybių, aptikti, kiekis (10, 11). Biologinė vitelogenino atsako į estrogenų ar aromatazės slopinimą svarba yra gerai žinoma ir plačiai pagrįsta dokumentais. Tačiau VTG gamybai patelių organizme įtakos taip pat gali turėti bendrasis toksiškumas ir medžiagų, kurioms būdingas ne endokrininis toksiškumas (pvz., toksinis poveikis kepenims), poveikis.

6. Įprastam naudojimui yra sėkmingai sukurti ir standartizuoti keli matavimo metodai. Tokie yra konkrečioms gyvūnų rūšims skirti imunofermentinės analizės (IFA, angl. ELISA) metodai, kuriais imunocheminiu būdu nustatomas mažuose iš atskirų žuvų paimtuose kraujo ar kepenų mėginiuose pagamintas vitelogenino kiekis (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). VTG kiekiui išmatuoti imami juodosios drūtagalvės rainės kraujo, zebrinės danijos kraujo arba galvos ir (arba) uodegos homogenato ir medakos kepenų mėginiai. Medakos kraujyje ir kepenyse nustatomi panašūs VTG kiekiai (19). 6 priedėlyje pateiktos rekomenduojamos mėginių ėmimo vitelogenino analizei atlikti procedūros. Vitelogenino matavimo priemonių rinkiniai yra plačiai prieinami; tokie priemonių rinkiniai turėtų būti sudaromi remiantis patvirtintu konkrečioms gyvūnų rūšims skirtu IFA metodu.

7. Tam tikrų rūšių žuvų patinų antriniai lytiniai požymiai yra išoriškai matomi, kiekybiškai įvertinami ir reaguoja į cirkuliuojančius endogeninių androgenų kiekius; tai taikytina juodajai drūtagalvei rainei ir medakai, bet ne zebrinei danijai, kuri neturi kiekybiškai įvertinamų antrinių lytinių požymių. Patelės išlaiko gebėjimą išvystyti vyriškuosius antrinius lytinius požymius, kai yra paveikiamos androgeninėmis cheminėmis medžiagomis vandenyje. Tokiai juodosios drūtagalvės rainės (20) ir medakos (21) organizmo reakcijai dokumentais pagrįsti mokslinėje literatūroje pateikiami keli tyrimai. Patinų antrinių lytinių požymių sumažėjimą dėl mažos statistinės galios reikėtų vertinti atsargiai, be to, jis turėtų būti pagrįstas ekspertų vertinimais ir įtikinamais įrodymais. Kadangi zebrinė danija neturi kiekybiškai įvertinamų antrinių lytinių požymių, kurie reaguotų į androgeninį poveikį turinčias chemines medžiagas, jos naudojimas šiame tyrime yra ribotas.

8. Kalbant apie juodąją drūtagalvę rainę, pagrindinis egzogeninio androgeno poveikio rodiklis yra poravimosi gumburėlių skaičius priekinėje patelės galvos dalyje. Kalbant apie medaką, pagrindinis egzogeninio androgeninių cheminių medžiagų poveikio patelei žymuo yra spenelinių ataugų skaičius. 5A ir 5B priedėliuose nurodytos rekomenduojamos procedūros, skirtos atitinkamai juodosios drūtagalvės rainės ir medakos lyties požymiams įvertinti.

9. Šiame bandymo metode vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMO METODO ESMĖ

10. Atliekant tyrimą, chemine medžiaga veikiami kartu į bandymo indus įleisti reprodukcinio amžiaus žuvų patinai ir patelės. Tyrime naudojamos suaugusios reprodukcinio amžiaus žuvys, todėl jas galima aiškiai atskirti pagal lytį, taigi ir atlikti su lytimi susijusią kiekvienos vertinamosios baigties analizę, be to, taip užtikrinamas jų jautrumas egzogeninėms cheminėms medžiagoms. Baigus bandymą, lytis patvirtinama makroskopiniu lytinių liaukų tyrimu atvėrus pilvo ertmę žirklėmis. Atitinkamų biologinio tyrimo sąlygų apžvalga pateikta 2 priedėlyje. Tyrimas paprastai pradedamas atrenkant žuvis iš neršiančių žuvų populiacijos; tyrime neturėtų būti naudojami senstantys gyvūnai. Rekomendacijos dėl žuvų amžiaus ir reprodukcinės būklės pateiktos skirsnyje „Žuvų atranka“. Tyrimas atliekamas naudojant tris cheminės medžiagos bandomąsias koncentracijas, taip pat vandens kontrolinę grupę ir prireikus tirpiklio kontrolinę grupę. Tiriant medaką ir zebrinę

▼M6

daniją, kiekvienoje doze veikiamoje grupėje naudojama po du indus arba kartotinius bandinius (kiekviename inde yra po penkis patinus ir penkias pateles), o tiriant juodąją drūtagalvę rainę – po keturis indus arba kartotinius bandinius (kiekviename inde yra po du patinus ir keturias pateles). Taip atsižvelgiama į teritorinį juodosios drūtagalvės rainės patino elgesį, tačiau išlaikoma pakankama statistinė tyrimo galia. Bandomąja medžiaga žuvys veikiamos 21 dieną, o mėginiai iš žuvų taip pat paimami 21-ą veikimo dieną.

11. 21-ą dieną po mėginių paėmimo visi gyvūnai humaniškai numarinami. Įvertinami juodosios drūtagalvės rainės ir medakos antriniai lytiniai požymiai (žr. 5A ir 5B priedėlius); iš zebrinės danijos ir juodosios drūtagalvės rainės vitelogenino kiekiui nustatyti paimami kraujo mėginiai, kaip alternatyvą vitelogenino kiekiui nustatyti galima paimti zebrinių danijų galvą ir (arba) uodegą (6 priedėlis); iš medakos VTG analizei atlikti paimamos kepenys (6 priedėlis).

BANDYMO PRIIMTINUMO KRITERIJAI

12. Kad bandymo rezultatai būtų priimtini, turi būti įvykdytos šios sąlygos:

— gaištamumas kontroliniame inde su vandeniu (arba tirpikliu) veikimo laikotarpio pabaigoje neturėtų viršyti 10 %;

— ištirpusio deguonies koncentracija per visą veikimo laikotarpį turėtų sudaryti bent 60 % oro soties vertės (OSV);

— bet kuriuo veikimo laikotarpio momentu bandymo indų vandens temperatūra neturėtų skirtis daugiau kaip ± 1,5 °C ir turėtų būti palaikoma 2 °C intervale bandomajai rūšiai nurodytame diapazone (2 priedėlis);

— turi būti įrodymų, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos tirpale buvo tinkamai išlaikytos išmatuotų vidutinių verčių ± 20 % intervalo ribose.

METODO APRAŠYMAS

Prietaisas

13. Įprasta laboratorinė įranga ir ši speciali įranga:

a) deguonies ir pH matuokliai;

b) įranga vandens kietumui ir šarmingumui nustatyti;

c) atitinkama aparatūra temperatūrai kontroliuoti, geriau nuolatinės kontrolės aparatūra;

d) iš chemiškai inertiškos medžiagos pagaminti rekomenduojamą įkrovą bei gyvūnų laikymo tankį atitinkančios talpos rezervuarai (žr. 2 priedėlį);

e) neršto substratas juodajai drūtagalvei rainei ir zebrinei danijai – 4 priedėlyje pateikiama reikalinga išsami informacija;

f) reikiamo tikslumo svarstyklės (t. y. ± 0,5 % tikslumo).

▼M6

Vanduo

14. Galima naudoti bet kokį vandenį, kuriame bandomoji rūšis gali ilgai gyventi ir augti. Jo kokybė turėtų išlikti pastovi visą bandymo laiką. Vandens pH vertė turi būti 6,5–8,5, tačiau, atliekant konkretų bandymą, pH vertė neturi kisti daugiau kaip ±0,5 pH vieneto. Siekiant užtikrinti, kad skiedimo vanduo netinkamai nepaveiktų bandymo rezultatų (pvz., sudarydamas kompleksus su bandomąja chemine medžiaga), tam tikrais intervalais turėtų būti imami mėginiai analizei atlikti. Sunkiųjų metalų jonų (pvz., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ir Ni), pagrindinių anijonų ir katijonų (pvz., Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} ir $SO4^{2-}$), pesticidų (pvz., fosforo organinių ir chloro organinių pesticidų bendro kiekio), bendrosios organinės anglies ir suspenduotų kietųjų dalelių analizė turi būti atliekama, pavyzdžiui, kas tris mėnesius, jeigu žinoma, kad skiedimo vandens kokybė yra gana pastovi. Jeigu būtų įrodyta, kad vandens kokybė išlieka pastovi bent metus, analizė gali būti atliekama ne taip dažnai, o intervalai – padidinti (pvz., kas šešis mėnesius). Kai kurios skiedimui tinkamo vandens cheminės savybės pateiktos 3 priedėlyje.

Bandymo tirpalai

15. Pasirinktų koncentracijų bandymo tirpalai paruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Pradinį tirpalą geriau ruošti tiesiog maišant ar plakant bandomąją cheminę medžiagą skiedimo vandenyje mechaninėmis priemonėmis (pvz., maišykle ar ultragarsu). Pakankamai koncentruotam pradiniam tirpalui ruošti galima naudoti prisotinimo kolonėles (tirpumo kolonėles). Nerekomenduojama naudoti tirpaus nešiklio. Tačiau, jeigu tirpiklis būtinas, kontrolinį bandymą su tirpikliu reikia atlikti tuo pačiu metu ir naudojant tą pačią, kaip ir bandymuose su chemine medžiaga, tirpiklio koncentraciją. Jeigu bandomosios cheminės medžiagos sunkiai tirpsta, tirpiklis gali būti geriausias sprendimas; reikėtų susipažinti su EBPO sunkiai naudojamų medžiagų ir mišinių toksiškumo vandens organizmams bandymų rekomendaciniu dokumentu (22). Tirpiklis bus pasirinktas pagal cheminės medžiagos chemines savybes. EBPO rekomendaciniame dokumente 100 µl/l yra rekomenduojama didžiausia tirpiklio koncentracija ir jos turėtų būti laikomasi. Tačiau neseniai atliktoje peržiūroje (23) atkreiptas dėmesys į papildomas problemas, kylančias naudojant tirpiklius poveikiui endokrininei sistemai tirti. Todėl rekomenduojama prireikus kuo labiau mažinti tirpiklio koncentraciją visais techniškai įmanomais atvejais (atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos fizines ir chemines savybes).

16. Bus naudojama pratekamojo srauto bandymo sistema. Naudojant tokią sistemą (pvz., dozavimo siurblį, proporcinį skiestuvą, prisotinimo sistemą), pradinis bandomosios cheminės medžiagos tirpalas nenutrūkstamai dozuojamas ir skiedžiamas, kad bandymo akvariumuose būtų užtikrintos atitinkamos koncentracijos. Pradinių tirpalų ir skiedimo vandens srautai turi būti kartais, geriau kasdien, tikrinami ir per visą bandymą neturėtų kisti daugiau kaip 10 %. Reikėtų vengti naudoti nekokybiškus plastmasinius vamzdelius ar kitas medžiagas, kurių sudėtyje gali būti biologiškai aktyvių cheminių medžiagų. Renkantis pratekamojo srauto bandymo sistemai tinkamą medžiagą, reikėtų atsižvelgti į galimą bandomosios cheminės medžiagos įgertį į šią medžiagą.

Žuvų laikymas

17. Pasirenkamos vienos laboratorinės populiacijos ir geriau tos pačios rūšies žuvys, kurios, kad aklimatizuotųsi, bent dvi savaites prieš bandymą buvo laikomos tokios kokybės vandenyje ir tokiomis apšvietimo sąlygomis, kurios panašios į bandymo sąlygas. Svarbu, kad įkrova ir gyvūnų laikymo tankis (apibrėžtis galima rasti 1 priedėlyje) būtų tinkami naudojamai bandomajai rūšiai (žr. 2 priedėlį).

18. Po 48 valandų stabilizacijos periodo, registruojamas gaištamumas ir taikomi tokie kriterijai:

▼M6

— populiacijos gaištamumas per septynias paras yra didesnis kaip 10 %: visa partija atmetama;

— populiacijos gaištamumas yra 5–10 %: aklimatizacija papildomas septynias paras; jeigu per kitas septynias paras gaištamumas yra didesnis kaip 5 %, visa partija atmetama;

— populiacijos gaištamumas per septynias paras yra mažesnis kaip 5 %: partija priimama.

19. Aklimatizacijos, paruošiamuoju arba veikimo chemine medžiaga laikotarpiu žuvys neturėtų būti gydomos nuo ligų.

Paruošiamasis laikotarpis ir žuvų atranka

20. Rekomenduojama paruošiamojo laikotarpio trukmė – viena savaitė, šiuo metu gyvūnai patalpinami į indus, panašius į tuos, kurie bus naudojami atliekant bandymą. Visą laikymo laikotarpį ir veikimo chemine medžiaga etape žuvys turėtų būti šeriamos iki soties. Veikimo chemine medžiaga etapas pradedamas iš laboratorijos turimų poravimuisi subrendusių gyvūnų atsargų atrenkant lytiškai dimorfiškas (pvz., turinčias aiškius antrinius lytinius požymius, kurie juodosios drūtagalvės rainės ir medakos atveju yra matomi) ir aktyviai neršiančias suaugusias žuvis. Toliau pateikti kriterijai yra tik rekomendacinio pobūdžio (jie negali būti svarstomi atskirai nuo stebimos konkrečios žuvų partijos tikrosios reprodukcinės būklės): juodosios drūtagalvės rainės turėtų būti maždaug 20 (±2) savaičių amžiaus, darant prielaidą, kad visą savo gyvavimo laikotarpį jos buvo auginamos 25±2 °C temperatūroje. Japoninės medakos turėtų būti maždaug 16 (±2) savaičių amžiaus, darant prielaidą, kad visą savo gyvavimo laikotarpį jos buvo auginamos 25±2 °C temperatūroje. Zebrinės danijos turėtų būti maždaug 16 (±2) savaičių amžiaus, darant prielaidą, kad visą savo gyvavimo laikotarpį jos buvo auginamos 26±2 °C temperatūroje.

BANDYMO PLANAS

21. Naudojamos trys bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos, taip pat atliekama viena (vandens) kontrolė ir prireikus viena tirpiklio kontrolė. Duomenys gali būti analizuojami, kad būtų nustatyti statistiškai reikšmingi veikimo chemine medžiaga ir kontrolės atsako skirtumai. Atlikus šias analizes, galima susidaryti įspūdį apie tai, ar reikia atlikti papildomą ilgesnės trukmės bandymą siekiant nustatyti nepageidaujamą cheminės medžiagos poveikį (konkrečiai: išgyvenimui, vystymuisi, augimui ir dauginimuisi), o ne naudoti šiuos duomenis rizikos vertinime (24).

22. 21-ą bandymo dieną iš zebrinės danijos ir medakos patinų ir patelių, priklausančių kiekvienai doze veikiamai grupei (po penkis patinus ir penkias pateles abiejuose kartotinio bandymo induose) ir kontrolinei (-ėms) grupei (-ėms), paimami mėginiai vitelogenino kiekiui ir, jeigu taikytina, antriniams lytiniams požymiams nustatyti. 21-ą veikimo dieną iš juodosios drūtagalvės rainės patinų ir patelių, priklausančių kiekvienai doze veikiamai grupei (po du patinus ir keturias pateles kiekviename iš keturių kartotinio bandymo indų) ir kontrolinei (-ėms) grupei (-ėms), paimami mėginiai vitelogenino kiekiui ir antriniams lytiniams požymiams nustatyti.

Bandomųjų koncentracijų parinkimas

23. Šiame bandyme didžiausia bandomoji koncentracija turėtų atitikti didžiausią toleruojamą koncentraciją (DTK), nustatytą per anksčiau atliktą ribų paieškos bandymą ar pagal kitus toksiškumo duomenis, būti prilyginta 10 mg/l arba būti nustatyta remiantis didžiausiu tirpumu vandenyje, atsižvelgiant į tai, kuri iš jų yra mažiausia. DTK apibrėžiama kaip didžiausia bandomoji cheminės medžiagos koncentracija, kurios sukeliamas žuvų gaištamumas yra mažesnis nei 10 %. Taikant tokį metodą, daroma prielaida, kad yra empiriniai ūmaus ar kitokio toksiškumo duomenys, pagal kuriuos galima apskaičiuoti DTK. DTK gali būti sunku tiksliai nustatyti, todėl paprastai specialistams šiuo klausimu reikia pasitarti.

▼M6

24. Reikalingos trys bandomosios koncentracijos, kurių vertė skiriasi pastoviu koeficientu, neviršijančiu 10, ir viena praskiesto vandens kontrolė (o prireikus ir tirpiklio kontrolė). Rekomenduojama pasirinkti atskyrimo koeficientą nuo 3,2 iki 10.

PROCEDŪRA

Bandomųjų žuvų atranka ir svėrimas

25. Svarbu, kad žuvų svorio skirtumas tyrimo pradžioje būtų kuo mažesnis. Įvairioms gyvūnų rūšims tinkamos dydžių ribos, kuriomis rekomenduojama vadovautis atrenkant šių rūšių gyvūnus, pateiktos 2 priedėlyje. Visoje bandyme naudojamoje žuvų partijoje patinų ir patelių individualus svoris bandymo pradžioje, jeigu galima, neturėtų patekti už aritmetinio tos pačios lyties svorio vidurkio ±20 % intervalo ribų. Vidutiniam svoriui nustatyti rekomenduojama prieš bandymą pasverti žuvų poėminio dalį.

Veikimo sąlygos

Trukmė

26. Bandymo trukmė po paruošiamojo laikotarpio – 21 diena. Rekomenduojama paruošiamojo laikotarpio trukmė – viena savaitė.

Šėrimas

27. Žuvys turėtų būti šeriamos tinkamu pašaru iki soties (2 priedėlis) ir pakankamai dažnai gerai fizinei būklei palaikyti. Reikėtų stengtis išvengti mikrobų dauginimosi ir vandens drumstumo. Šie nurodymai yra rekomendacinio pobūdžio: paros davinys gali būti padalytas į dvi ar tris lygias dalis, kurios būtų duodamos kelis kartus per parą, darant bent trijų valandų pertraukas tarp šėrimų. Galimas vienas didesnis davinys – ypač savaitgaliais. Žuvys neturėtų būti šeriamos 12 valandų iki mėginių ėmimo ar nekropsijos.

28. Reikėtų patikrinti, ar žuvų pašare nėra teršalų, pvz., chloro organinių pesticidų, policiklinių aromatinių angliavandenilių (PAA) ar polichlorintųjų bifenilų (PCB). Reikėtų vengti pašaro, kuriame yra padidintas fitoestrogenų kiekis, nes taip būtų paveiktas tyrimo atsakas į žinomą estrogenų agonistą (pvz., 17-beta estradiolį).

29. Nesuėstas pašaras ir išmatos iš bandymo indų turėtų būti pašalinami bent du kartus per savaitę, pvz., kruopščiai išvalant kiekvieno rezervuaro dugną sifonu.

Šviesa ir temperatūra

30. Apšvietimo laikotarpis ir vandens temperatūra turėtų būti tinkami bandomųjų gyvūnų rūšiai (žr. 2 priedėlį).

Analitinių tyrimų ir matavimų dažnis

31. Prieš pradedant veikimo chemine medžiaga etapą, reikėtų įsitikinti, kad cheminės medžiagos padavimo sistema veikia tinkamai. Turėtų būti nustatyti visi reikalingi analizės metodai, taip pat reikėtų pakankamai žinoti apie cheminės medžiagos stabilumą bandymo sistemoje. Atliekant bandymą, bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų vertės reguliariais intervalais nustatomos taip: skiestų ir toksiška chemine medžiaga paveiktų pradinių tirpalų srautų greitis turėtų būti tikrinamas geriau kasdien, bet ne mažiau kaip du kartus per savaitę, ir visą bandymo laiką neturėtų kisti daugiau kaip 10 %. Rekomenduojama faktines bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas visuose induose matuoti bandymo pradžioje ir vėliau kas savaitę.

32. Rekomenduojama rezultatus pagrįsti išmatuotomis koncentracijos vertėmis. Tačiau, jeigu visą bandymo laiką bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos tirpale buvo tinkamai išlaikytos nominaliosios koncentracijos vertės ±20 % intervalo ribose, rezultatai gali būti grindžiami nominaliosiomis arba išmatuotomis vertėmis.

33. Mėginius gali tekti filtruoti (pvz., pro 0,45 μm akytumo filtrą) arba centrifuguoti. Jeigu reikalingas centrifugavimas, tai ir yra rekomenduojama procedūra. Tačiau, jeigu filtras neabsorbuoja bandomosios medžiagos, būtų priimtinas ir filtravimas.

▼M6

34. Atliekant bandymą, visuose bandymo induose bent kartą per savaitę turėtų būti matuojami ištirpęs deguonis, temperatūra ir pH. Bendrasis kietumas ir šarmingumas kontroliniuose induose ir viename inde su didžiausia cheminės medžiagos koncentracija turėtų būti matuojami bent kartą per savaitę. Temperatūrą bent viename bandymo inde geriau kontroliuoti nuolatos.

Pastabos

35. Tyrimo laikotarpiu arba jam pasibaigus įvertinamos tam tikros bendrosios (pvz., išgyvenimo) ir pagrindinės biologinės reakcijos (pvz., vitelogenino kiekis). Šių vertinamųjų baigčių ir jų naudingumo matavimas ir vertinimas aprašyti toliau.

Išgyvenimas

36. Bandymo laikotarpiu žuvys turėtų būti tiriamos kasdien, gaištamumas turėtų būti registruojamas, o nugaišusios žuvys kuo greičiau pašalinamos. Nei kontroliniuose, nei chemine medžiaga veikiamuose induose nugaišusios žuvys neturėtų būti pakeičiamos naujomis. Per bandymą nugaišusių žuvų lytis turėtų būti nustatyta atliekant makroskopinį lytinių liaukų patikrinimą.

Elgesys ir išvaizda

37. Reikėtų atkreipti dėmesį į bet kokias elgesio anomalijas (palyginti su kontrolinių grupių gyvūnais); tai gali būti bendro apsinuodijimo požymiai, įskaitant hiperventiliaciją, nekoordinuotą plaukimą, pusiausvyros praradimą ir netipišką nejudamumą ar mitybą. Taip pat reikėtų atkreipti dėmesį į papildomas išorines anomalijas (pvz., kraujavimą, spalvos pakeitimą). Tokie apsinuodijimo požymiai turėtų būti atidžiai apsvarstyti atliekant duomenų vertinimą, nes gali rodyti, kad, esant tokioms koncentracijoms, poveikio endokrininei sistemai biologiniai žymenys nėra patikimi. Iš tokių elgesio stebėsenos rezultatų taip pat galima pasisemti naudingos kokybinės informacijos, kuria remiantis bus nustatomi galimi bandymų su žuvimis reikalavimai ateityje. Pavyzdžiui, stebint juodąsias drūtagalves raines, pastebėta, kad, paveiktiems androgenų normaliems patinams arba patino požymių įgijusioms patelėms pasireiškia teritorinė agresija; stebint zebrines danijas, nustatyta, kad dėl estrogeninio arba antiandrogeninio poveikio sumažėja joms būdingo su pirmais saulės spinduliais prasidedančio poravimosi ir neršto aktyvumas.

38. Kai kurie išvaizdos aspektai (visų pirma, spalva), perkeliant žuvis iš vienos aplinkos į kitą, gali greitai keistis, todėl kokybines pastabas svarbu užfiksuoti prieš pašalinant gyvūnus iš bandymo sistemos. Ligšiolinė juodųjų drūtagalvių rainių stebėsenos patirtis rodo, kad kai kurios endokrininę sistemą veikiančios cheminės medžiagos iš pradžių gali sukelti šių išorės savybių pokyčius: kūno spalvos (pašviesėjimas arba patamsėjimas), spalvos tolygumo (vertikalių dryžių buvimas) ir kūno formos (galvos ir krūtinės srityje). Todėl žuvų fizinę išvaizdą reikia stebėti viso bandymo metu ir jo pabaigoje.

Humaniškas žuvų numarinimas

39. 21-ą dieną, t. y. pasibaigus veikimo chemine medžiaga laikotarpiui, žuvis reikia numarinti atitinkamu kiekiu 100–500 mg/l koncentracijos trikaino (trikaino metansulfonatas, Metacain, MS-222 (CAS 886-86-2), buferizuoto 300 mg/l NaHCO3 (natrio bikarbonatas, CAS 144-55-8), skirto gleivinės dirginimui sumažinti; paskui, kaip paaiškinta skirsnyje „Vitelogeninas“, vitelogenino kiekiui nustatyti imami kraujo ar audinių mėginiai.

▼M6

Antrinių lytinių požymių stebėsena

40. Kai kurios endokrininę sistemą veikiančios cheminės medžiagos gali sukelti specializuotų antrinių lytinių požymių (juodosios drūtagalvės rainės patino poravimosi gumburėlių, medakos patino spenelinių ataugų skaičiaus) pokyčius. Visų pirma, veikiant tam tikrus veikimo mechanizmus turinčioms cheminėms medžiagoms, priešingos lyties gyvūnams gali pasireikšti anomalūs antriniai lytiniai požymiai; pvz., dėl androgenų receptorių agonistų, kaip antai trenbolono, metiltestosterono ir dihidrotestosterono, poveikio juodosios drūtagalvės rainės patelėms gali išsivystyti aiškiai išreikšti poravimosi gumburėliai, o medakos patelėms – spenelinės ataugos (11, 20, 21). Taip pat pranešta, kad estrogenų receptorių agonistai gali sumažinti suaugusių patinų poravimosi gumburėlių skaičių ir sprando pagalvėlės dydį (25, 26). Atliekant tokius bendruosius morfologinius stebėjimus, galima gauti naudingos kokybinės ir kiekybinės informacijos, kuria būtų galima remtis ateityje nustatant galimus žuvų tyrimo reikalavimus. Juodosios drūtagalvės rainės poravimosi gumburėlių ir medakos spenelinių ataugų skaičių ir dydį galima nustatyti tiesiogiai, atliekant bandymą, arba – ne taip tiksliai – iš išsaugotų pavyzdžių. Rekomenduojamos juodosios drūtagalvės rainės ir medakos antrinių lytinių požymių vertinimo procedūros pateiktos atitinkamai 5A ir 5B priedėliuose.

Vitelogeninas (VTG)

41. Kraujas paimamas iš uodegos arterijos ar venos, naudojant heparinizuotą kapiliarinį mikrohematokrito vamzdelį, arba švirkštu atliekant širdies punkciją. Atsižvelgiant į žuvies dydį, iš kiekvienos juodosios drūtagalvės rainės paprastai paimama po 5–60 µl, o iš kiekvienos zebrinės danijos – po 5–15 µl kraujo. Plazma nuo kraujo atskiriama centrifuguojant ir iki vitelogenino nustatymo analizės kartu su proteazės inhibitoriais laikoma – 80 °C temperatūroje. Taip pat, kaip audinių šaltinis vitelogenino kiekiui nustatyti, medakos atveju bus naudojamos kepenys, o zebrinės danijos atveju gali būti naudojamas galvos ir (arba) uodegos homogenatas (6 priedėlis), VTG matavimas turėtų būti atliekamas taikant patvirtintą homologinį ELISA metodą, naudojant homologinius VTG standartus ir homologinius antikūnus. Rekomenduojama taikyti metodą, kuriuo VTG kiekį plazmoje galima nustatyti ng/ml lygmeniu (arba audiniuose ng/mg lygmeniu) – tai yra foninis lygmuo cheminių medžiagų poveikio nepatyrusio žuvies patino organizme.

42. Vitelogenino analizės kokybės kontrolė bus atliekama naudojant standartinius cheminių medžiagų rinkinius, atliekant tuščiuosius bandymus ir analizę atliekant bent dukart. Kiekvienam ELISA metodui reikėtų atlikti matricos efekto (mėginio skiedimo efekto) tyrimą mažiausiam mėginio skiedimo koeficientui nustatyti. Kiekvienoje VTG tyrimams naudojamoje IFA plokštelėje turėtų būti šie kokybės kontrolės mėginiai: bent šeši kalibravimo etalonai, apimantys numatomų vitelogenino koncentracijų diapazoną, ir bent vienas tuščiasis nespecifinio surišimo bandymas (kiekvieno iš jų tyrimas atliekamas po du kartus). Šių tuščiojo bandymo sugerties geba turėtų būti mažesnė nei 5 % didžiausios kalibravimo etalono sugerties gebos. Bus išanalizuotos bent dvi alikvotinės kiekvieno praskiesto mėginio dalys (kartotiniai bandiniai). Kartotinių bandinių, kurie skiriasi daugiau kaip 20 %, analizę reikėtų pakartoti.

43. Kalibravimo kreivių koreliacijos koeficientas (R^2) turėtų būti didesnis kaip 0,99. Tačiau didelės koreliacijos nepakanka tiksliai koncentracijos visuose diapazonuose prognozei užtikrinti. Turėtų būti ne tik užtikrinta pakankamai didelė kalibravimo kreivės verčių koreliacija, bet ir pagal kalibravimo kreivę apskaičiuota kiekvieno etalono koncentracija turėtų būti 70–120 % jo nominaliosios koncentracijos vertės ribose. Jeigu nominaliosios koncentracijos yra išsidėsčiusios toli nuo kalibravimo kreivės regresijos linijos (pvz., esant mažesnėms koncentracijoms), gali prireikti kalibravimo kreivę padalyti į mažų ir didelių verčių diapazoną arba taikyti nelinijinį modelį, kad

▼M6

būtų galima tinkamai panaudoti sugerties gebos duomenis. Jeigu kreivė padalijama, abiejų linijinių segmentų R^2 turėtų būti didesnis kaip 0,99.

44. Aptikimo riba apibrėžiama kaip mažiausio analitinio etalono koncentracija, o kiekybinio nustatymo riba – kaip mažiausio analitinio etalono koncentracija, padauginta iš mažiausio skiedimo koeficiento.

45. Kiekvieną vitelogenino tyrimo atlikimo dieną bus išanalizuojamas sustiprintas mėginys, paruoštas naudojant pamatinį tyrimo etaloną (7 priedėlis). Numatomos ir išmatuotos koncentracijų santykis bus pateiktas kartu su kiekvienos tą dieną atliktų tyrimų grupės rezultatais.

DUOMENYS IR ATASKAITŲ TEIKIMAS

Biologinių žymenų atsako vertinimas taikant dispersinės analizės (ANOVA) metodą

46. Galimam cheminės medžiagos poveikiui endokrininei sistemai nustatyti atsakas chemine medžiaga veikiamose ir kontrolinėse grupėse palygintas taikant dispersinės analizės (ANOVA) metodą. Jeigu naudojama tirpiklio kontrolė, reikėtų atlikti atitinkamą visų praskiesto vandens kontrolės ir tirpiklio kontrolės vertinamųjų baigčių statistinį testą. Rekomendacijas, kaip elgtis su praskiesto vandens ir tirpiklio kontrolės duomenimis atliekant tolesnę statistinę analizę, galima rasti EBPO leidinyje (2006c) (27). Visi biologinio atsako duomenys turėtų būti analizuojami ir pateikiami atskirai pagal lytį. Jeigu parametriniams metodams taikyti reikalingos prielaidos (nenormalus pasiskirstymas (pvz., Shapiro-Wilk kriterijus) arba heterogeninė sklaida (Bartlett arba Levene kriterijus) nepasitvirtina, reikėtų apsvarstyti galimybę transformuoti duomenis sklaidoms homogenizuoti prieš atliekant dispersinę analizę arba atlikti svorinę dispersinę analizę. Darant prielaidą, kad dozės ir atsako priklausomybė yra nemonotoniška, daugkartiniams poriniams palyginimams gali būti taikomas Dunnett kriterijus (parametrinis) arba Mann-Whitney kriterijus su Bonferroni korekcija (neparametrinis). Kiti statistiniai kriterijai (pvz. Jonckheere-Terpstra arba Williams kriterijus) gali būti taikomi, jeigu dozės ir atsako priklausomybė yra daugmaž monotoniška. Siekiant padėti apsispręsti, kurį statistinį kriterijų geriausia taikyti, 8 priedėlyje pateikta statistinė srautų diagrama. Papildomos informacijos taip pat galima gauti iš EBPO „Dabartinių statistinės ekotoksiškumo duomenų analizės metodų dokumento“ (27).

Rezultatų ataskaita

47. Tyrimo duomenys turi apimti toliau nurodytą informaciją.

Bandymą atliekanti įstaiga:

— atsakingi darbuotojai ir jų pareigos atliekant tyrimą;

— kiekviena laboratorija turi būti įrodžiusi savo kompetenciją reprezentatyvių cheminių medžiagų naudojimo srityje.

Bandomoji cheminė medžiaga:

— bandomosios cheminės medžiagos apibūdinimas;

— fizinė būsena ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės;

▼M6

— bandomųjų koncentracijų paruošimo metodas ir periodiškumas;

— informacija apie stabilumą ir biologinį skaidumą.

Tirpiklis:

— tirpiklio apibūdinimas (pobūdis, naudojama koncentracija);

— tirpiklio pasirinkimo pagrindimas (jeigu tai ne vanduo).

Bandomieji gyvūnai:

— rūšis ir veislė;

— tiekėjas ir konkreti tiekėjo įranga;

— žuvų amžius bandymo pradžioje ir reprodukcinė (neršto) būklė;

— išsamūs duomenys apie gyvūnų aklimatizavimo procedūrą;

— žuvų (iš žuvų išteklių paimto poėminio) kūno svoris veikimo pradžioje.

Bandymo sąlygos:

— taikyta bandymo procedūra (bandymo rūšis, įkrova, gyvūnų laikymo tankis ir t. t.);

— Pradinių tirpalų paruošimo metodas ir srauto greitis;

— nominaliosios bandomosios koncentracijos, kas savaitę matuojamos bandymo tirpalų koncentracijos ir taikomas analizės metodas, išmatuotų verčių vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai bandymo induose ir įrodymai, kad matavimai atitinka bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas tikrajame tirpale;

— skiedimo vandens savybės (įskaitant pH, kietumą, šarmingumą, temperatūrą, ištirpusio deguonies koncentraciją, chloro nuosėdų kiekį, bendrąją organinę anglį, suspenduotų kietųjų dalelių kiekį ir kitus atliktus matavimus);

— bandymo indų vandens kokybė: pH, kietumas, temperatūra ir ištirpusio deguonies koncentracija;

— išsami informacija apie šėrimą (pvz., pašaro (-ų) rūšis, šaltinis, duodamas kiekis, šėrimo dažnumas ir, jeigu yra, atitinkamų teršalų (polichlorinuotų bifenilų, policiklinių aromatinių angliavandenilių ir chloro organinių pesticidų) nustatymo analizių rezultatai.

Rezultatai:

— įrodymai, kad kontroliniai indai atitiko bandymo priimtinumo kriterijus;

— duomenys apie gaištamumą induose su bandomosiomis koncentracijomis ir kontroliniame inde;

— taikyti statistiniai analizės metodai, duomenų apdorojimas ir taikomų metodų pagrindimas;

— bendrųjų morfologinių stebėjimų duomenys, įskaitant apie antrinius lytinius požymius ir vitelogeniną;

▼M6

— duomenų analizių rezultatai, pageidautina – lentelių ir grafikų forma;

— neįprastų žuvų reakcijų dažnumas ir visi matomi bandomosios cheminės medžiagos poveikiai.

BANDYMO REZULTATŲ AIŠKINIMO IR PRIPAŽINIMO REKOMENDACIJOS

48. Šiame skirsnyje analizuojami parametrai, į kuriuos reikia atsižvelgti aiškinant per bandymą atlikto įvairių vertinamųjų baigčių matavimo rezultatus. Rezultatus reikėtų vertinti atsargiai, jeigu atrodo, kad bandomoji cheminė medžiaga sukėlė akivaizdų toksinį poveikį arba paveikė bendrą bandomojo gyvūno būklę.

49. Kad duomenų aiškinimas būtų patikimas, nustatant bandomąsias koncentracijas reikėtų užtikrinti, kad nebūtų viršyta didžiausia toleruojama koncentracija. Svarbu naudoti bent vieną cheminės medžiagos koncentraciją, dėl kurios neatsiranda toksinio poveikio požymių. Ligos ir toksinio poveikio požymius reikėtų atidžiai vertinti ir nurodyti. Pavyzdžiui, yra galimybė, kad VTG gamybai patelių organizme įtakos taip pat gali turėti bendrasis toksiškumas ir medžiagų, kurioms būdingas ne endokrininis toksiškumas (pvz., toksinis poveikis kepenims), poveikis. Tačiau poveikio aiškinimas gali tapti patikimesnis naudojant kitas cheminės medžiagos dozes, kurios nėra susijusios su sisteminiu toksiškumu.

50. Yra keli aspektai, kuriuos reikia apsvarstyti prieš pripažįstant bandymo rezultatus. Orientuojamasi į tai, kad VTG kiekis kontrolinėse juodosios drūtagalvės rainės ir zebrinės danijos patinų ir patelių grupėse turėtų skirtis maždaug trimis eilėmis, o medakos patinų ir patelių grupėse – maždaug viena eile. Verčių, su kuriomis susiduriama kontrolinėse ir doze veikiamose grupėse, diapazono pavyzdžiai pateikiami tinkamumo patvirtinimo ataskaitose (1, 2, 3, 4). Esant dideliems VTG kiekiams kontrolinių patinų organizme, gali kilti abejonių dėl tyrimo jautrumo ir gebėjimo nustatyti silpnus estrogenų agonistus. Esant dideliems VTG kiekiams kontrolinių patinų organizme, gali kilti abejonių dėl tyrimo jautrumo ir gebėjimo nustatyti silpnus estrogenų agonistus. Tinkamumo patvirtinimo tyrimai buvo atlikti šioms rekomendacijoms parengti.

51. Jeigu laboratorija anksčiau nė karto nebuvo atlikusi tokio tyrimo arba buvo padaryti reikšmingi pakeitimai (pvz., pakeista žuvų veislė ar tiekėjas), patartina atlikti techninės kompetencijos tyrimą. Rekomenduojama naudoti chemines medžiagas, kurios veikia keliais būdais arba turi poveikį kelioms bandymo vertinamosioms baigtims. Iš tikrųjų kiekvienai laboratorijai rekomenduojama kurti savo patinų ir patelių duomenų bazę ir atlikti estrogeninio veikimo nustatymo bandymus su teigiama kontroline chemine medžiaga (pvz., 17β-estradioliu (100 ng/l) arba žinomu silpnu agonistu), dėl kurios padidėja VTG kiekis žuvų patinų organizme, aromatazės slopinimo nustatymo bandymus su teigiama kontroline chemine medžiaga (pvz., fadrozolu arba prochlorazu (300 μg/l), dėl kurios sumažėja VTG kiekis žuvų patelių organizme, ir androgeninio veikimo nustatymo bandymus su teigiama kontroline chemine medžiaga (pvz., 17β-trenbolonu (5 ng/l), dėl kurios juodosios drūtagalvės rainės ir medakos patelės įgauna antrinių lytinių požymių. Laboratorijos kompetencijai užtikrinti visus šiuos duomenis galima palyginti su turimais tinkamumo patvirtinimo tyrimų (1, 2, 3) duomenimis.

52. Apskritai išmatuotos vitelogenino vertės turėtų būti laikomos teigiamomis, jeigu VTG kiekis yra statistiškai reikšmingai padidėjęs patinų organizme ($p<0,05$) arba statistiškai reikšmingai sumažėjęs patelių organizme ($p<0,05$), bent didžiausios bandomosios dozės lygmeniu, palyginti su kontroline grupe, ir nesant bendrojo toksiškumo požymių. Teigiamas rezultatas dar patvirtinamas pademonstruojant biologiškai galimą dozės ir atsako kreivių sąryšį. Kaip minėta pirmiau, vitelogenino kiekio sumažėjimas gali būti ne vien endokrininės kilmės, tačiau teigiamas rezultatas paprastai turėtų būti aiškinamas kaip poveikio endokrininei sistemai *in vivo* įrodymas, o tokiu atveju paprastai turėtų būti imtasi veiksmų papildomai informacijai gauti.

▼M6

NUORODOS

(1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006)27.

(2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006)29.

(3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007)25.

(4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (accessed 18/09/08).

(5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Unpublished report dated 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.

(6) OECD, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008)21.

(7) Sumpter and Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives;103 Suppl 7:173-8 Review.

(8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

(9) Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

(10) Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (Pimephales promelas). Toxicological Sciences;67(1):121-30.

(11) Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

(12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

▼M6

(13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (Pimephales promelas) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

(14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (Danio rerio Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

(15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131

(16) Rose J, Holbech H, Lindholst C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17β-estradiol and 17β-ethinylestradiol in male zebrafish (Danio rerio). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531-539.

(17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

(18) Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang IJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (Oryzias latipes). Jpn J Environ Toxicol 4:87–98.

(19) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50:301-308.

(20) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

(21) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (Oryzias latipes). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

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

(23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

(24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts," not „traffic lights," in risk assessment. Environmental Health Perspectives;114 Suppl 1:106-14.

(25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (Pimephales promelas). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

▼**M6**

(26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve and G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

(27) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/-MONO(2006)18

(28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/-MONO(2012)22

▼M6

1 priedėlis

Santrumpos ir apibrėžtys

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

VK – variacijos koeficientas.

IFA (ELISA) – imunofermentinė analizė.

Įkrova – drėgna žuvų masė vandens tūrio vienete.

Gyvūnų laikymo tankis – žuvų skaičius vandens tūrio vienete.

VTG (vitelogeninas) – fosfolipoglikoproteininis kiaušinio trynio baltymų pirmtakas, kuris paprastai gaminamas visų kiaušinius dedančių gyvūnų rūšių lytiškai aktyvių patelių organizme.

PHL ašis – pagumburio, hipofizės ir lytinių liaukų ašis.

DTK – didžiausia toleruojama koncentracija, sudaranti apie 10 % LC50 (vidutinės mirtinos koncentracijos).

Bandomoji cheminė medžiaga – bet kuri pagal šį bandymo metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

▼M6

2 priedėlis

Bandymo sąlygos atliekant poveikį žuvų endokrininei sistemai nustatyti skirtą atrankos tyrimą

1. Rekomenduojamos rūšys	**Juodoji drūtagalvė rainė** (*Pimephales promelas*)	**Medaka** (*Oryzias latipes*)	**Zebrinė danija** (*Danio rerio*)
2. Bandymo rūšis	Pratekamojo srauto	Pratekamojo srauto	Pratekamojo srauto
3. Vandens temperatūra	25 ± 2° C	25 ± 2° C	26 ± 2° C
4. Apšvietimo kokybė	Liuminescencinės lemputės (plataus spektro)	Liuminescencinės lemputės (plataus spektro)	Liuminescencinės lemputės (plataus spektro)
5. Šviesos stipris	10–20 μE/m^2/s, 540–1 000 liuksų arba 50–100 FC (laboratorijos apšvietimas)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 000 liuksų arba 50–100 FC (laboratorijos apšvietimas)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 000 liuksų arba 50–100 FC (laboratorijos apšvietimas)
6. Šviesos laikotarpis (aušros ir sutemų imitavimas galimas, bet nelaikomas privalomu)	16 val. šviesos, 8 val. tamsos	12–16 val. šviesos, 12–8 val. tamsos	12–16 val. šviesos, 12–8 val. tamsos
7. Įkrova	< 5 g vienam litrui	< 5 g vienam litrui	< 5 g vienam litrui
8. Bandymo akvariumo tūris	10 l (mažiausiai)	2 l (mažiausiai)	5 l (mažiausiai)
9. Bandymo tirpalo tūris	8 l (mažiausiai)	1,5 l (mažiausiai)	4 l (mažiausiai)
10. Bandymo tirpalų keitimas	Mažiausiai 6 kartus per parą	Mažiausiai 5 kartus per parą	Mažiausiai 5 kartus per parą
11. Bandomųjų organizmų amžius	Žr. 20 punktą.	Žr. 20 punktą.	Žr. 20 punktą.
12. Apytikslė drėgna suaugusios žuvies masė (g)	Patelės: 1,5 ± 20 % Patinai: 2,5 ± 20 %	Patelės: 0,35 ± 20 % Males: 0,35 ± 20 %	Patelės: 0,65 ± 20 % Patinai: 0,4 ± 20 %
13. Žuvų skaičius viename bandymo inde	6 (2 patinai ir 4 patelės)	10 (5 patinai ir 5 patelės)	10 (5 patinai ir 5 patelės)
14. Bandymų su cheminės medžiagos dozėmis skaičius	= 3 (ir atitinkami kontroliniai bandymai)	= 3 (ir atitinkami kontroliniai bandymai)	= 3 (ir atitinkami kontroliniai bandymai)
15. Vienam bandymui naudojamų indų skaičius	Bent 4	Bent 2	Bent 2
16. Viena bandomąja koncentracija veikiamų žuvų skaičius	16 suaugusių patelių ir 8 suaugę patinai (po 4 pateles ir 2 patinus kiekviename kartotiniame inde)	10 suaugusių patelių ir 10 suaugusių patinų (po 5 pateles ir 5 patinus kiekviename kartotiniame inde)	10 suaugusių patelių ir 10 suaugusių patinų (po 5 pateles ir 5 patinus kiekviename kartotiniame inde)
17. Šėrimo režimas	Gyvos arba šaldytos suaugusios sūriavandenės krevetės arba jų nauplijai (iki soties), komerciniai pašarai arba jų derinys	Gyvos arba šaldytos suaugusios sūriavandenės krevetės arba jų nauplijai du ar tris kartus per parą (iki soties), komerciniai pašarai arba jų derinys	Gyvos arba šaldytos suaugusios sūriavandenės krevetės arba jų nauplijai du ar tris kartus per parą (iki soties), komerciniai pašarai arba jų derinys

▼M6

18. Aeracija	Jokios, nebent ištirpusio deguonies koncentracija yra mažesnė nei 60 % oro soties vertės	Jokios, nebent ištirpusio deguonies koncentracija yra mažesnė nei 60 % oro soties vertės	Jokios, nebent ištirpusio deguonies koncentracija yra mažesnė nei 60 % oro soties vertės
19. Skiedimo vanduo	Švarus gruntinis, šulinio, skiedimo ar dechloruotas vandentiekio vanduo	Švarus gruntinis, šulinio, skiedimo ar dechloruotas vandentiekio vanduo	Švarus gruntinis, šulinio, skiedimo ar dechloruotas vandentiekio vanduo
20. Paruošiamasis laikotarpis	7 dienos (rekomenduojama)	7 dienos (rekomenduojama)	7 dienos (rekomenduojama)
21. Veikimo chemine medžiaga trukmė	21 diena	21 diena	21 diena
22. Biologinės vertinamosios baigtys	išgyvenamumas elgesys antriniai lytiniai požymiai VTG	išgyvenamumas elgesys antriniai lytiniai požymiai VTG	išgyvenamumas elgesys VTG
23. Bandymo priimtinumo kriterijai	Ištirpęs deguonis sudaro daugiau 60 % oro soties vertės; vidutinė temperatūra 25 ± 2 °C; 90 % žuvų išgyvenamumas kontrolinėse grupėse; išmatuotos bandomosios koncentracijos nekinta daugiau kaip 20 % išmatuotų kiekvienos koncentracijos vidutinių verčių intervale.	Ištirpęs deguonis sudaro daugiau 60 % oro soties vertės; vidutinė temperatūra 24 ± 2 °C; 90 % žuvų išgyvenamumas kontrolinėse grupėse; išmatuotos bandomosios koncentracijos nekinta daugiau kaip 20 % išmatuotų kiekvienos koncentracijos vidutinių verčių intervale.	Ištirpęs deguonis sudaro daugiau 60 % oro soties vertės; vidutinė temperatūra 26 ± 2 °C; 90 % žuvų išgyvenamumas kontrolinėse grupėse; išmatuotos bandomosios koncentracijos nekinta daugiau kaip 20 % išmatuotų kiekvienos koncentracijos vidutinių verčių intervale.

▼**M6**

3 priedėlis

Kai kurios tinkamo skiedimo vandens cheminės savybės

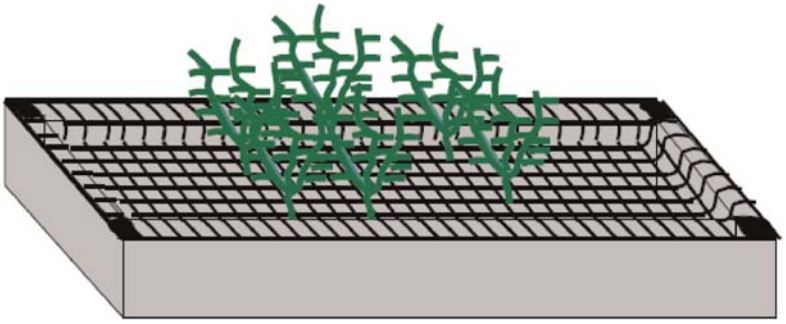
Sudedamoji dalis	Koncentracijos
Kietosios dalelės	< 20 mg/l
Bendroji organinė anglis	< 2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	< 1 µg/l
Liekamasis chloro kiekis	< 10 µg/l
Bendras fosforo organinių pesticidų kiekis	< 50 ng/l
Bendras chloro organinių pesticidų ir polichlorintų bifenilų kiekis	< 50 ng/l
Bendras organinio chloro kiekis	< 25 ng/l

▼M6

4A priedėlis

Neršto substratas zebrinei danijai

Padėklas nerštui – visiškai iš stiklo pagamintas instrumentinis indas, pvz., 22 × 15 × 5,5 cm (ilgis x plotis x gylis), uždengtas nuimamu nerūdijančio plieno tinkleliu (su 2 mm pločio akutėmis). Tinklelio pagrindas turėtų būti žemiau instrumentinio indo kraštų.



Ant tinklelio turėtų būti suformuotas neršto substratas. Jis turi sudaryti struktūrą, į kurią žuvys galėtų įplaukti. Pavyzdžiui, tam tinka dirbtiniai akvariumo augalai, pagaminti iš žalio plastiko (pastaba: reikėtų atsižvelgti į galimą bandomosios cheminės medžiagos įgertį į plastiką). Plastikinius augalus reikėtų pakankamai ilgai mirkyti pakankamame šilto vandens kiekyje, kad būtų užtikrinta, jog jokios cheminės medžiagos nepateks į bandomąjį vandenį. Naudojant stiklines medžiagas, turėtų būti užtikrinta, kad žuvys negalėtų susižeisti ir nebūtų varžomi jų energingi judesiai.

Siekiant užtikrinti, kad nebūtų neršiama už padėklo ribų, atstumas nuo padėklo iki stiklo sienelių turėtų siekti bent 3 cm. Ant padėklo padėti ikreliai iškrenta pro tinklelį ir jų mėginius galima paimti praėjus 45–60 min nuo apšvietimo pradžios. Skaidrūs ikreliai nėra sulipę ir juos lengvai galima suskaičiuoti naudojant transversinę šviesą. Viename inde laikant penkias pateles, ikrelių skaičius gali būti laikomas mažu, jeigu jų padedama 20 arba mažiau per parą, vidutiniu, jeigu jų padedama iki 100, ir dideliu, jeigu jų padedama daugiau kaip 100. Padėklas nerštui turi būti išimamas, ikreliai surenkami ir padėklas vėl įdedamas į bandymo indą kuo vėliau vakare arba kuo anksčiau ryte. Padėklas turėtų būti grąžintas į bandymo indą ne vėliau kaip per valandą, nes kitaip neršto substratas gali sukelti individualų poravimąsi ir nerštą neįprastu laiku. Jeigu pagal situaciją padėklą nerštui reikia įdėti vėliau, tai reikėtų padaryti ne mažiau kaip per devynias valandas nuo apšvietimo pradžios. Tokiu vėlyvu paros metu nerštas nebevyksta.

▼M6

4B priedėlis

Neršto substratas juodajai drūtagalvei rainei

Į kiekvieną bandymo akvariumą įdedama po dvi ar tris neršto slėptuves ir padėklus, pagamintus iš plastiko, keramikos ir stiklo derinio arba iš nerūdijančio plieno (pvz., 80 mm ilgio pilką pusapvalį lataką, padėtą ant 130 mm ilgio padėklo su užlenktais kraštais.) (žr. pav.). Įrodyta, kad tinkamai pagamintos polivinilchlorido ar keraminės slėptuvės yra tinkamos naudoti kaip neršto substratas (Thorpe ir kiti, 2007).

Rekomenduojama slėptuves pabrūžinti, kad pagerėtų sulipimas. Padėklą taip pat reikia tikrinti, kad žuvys negalėtų pasiekti nukritusių ikrelių, nebent būtų įrodyta, kad ikreliai efektyviai prilimpa prie naudojamo neršto substrato.



Padėklo pagrindas skirtas visiems prie slėptuvės paviršiaus neprilipusiems, taigi į akvariumo dugną nukrisiantiems ikreliams (arba ikreliams, padėtiems tiesiai ant plokščio plastikinio pagrindo) surinkti. Prieš naudojant, visi substratai bent 12 valandų turėtų būti mirkomi skiedimo vandenyje.

NUORODA

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas.* Aquatic Toxicology, 81, 90–98.

▼M6

5A priedėlis

JUodosios drūtagalvės rainės antrinių lytinių požymių vertinimas tam tikroms endokrininę sistemą veikiančioms cheminėms medžiagoms nustatyti

Apžvalga

Suaugusių juodųjų drūtagalvių rainių fizinės išvaizdos ypatybės, kurios gali būti svarbios atliekant endokrininę sistemą ardančių medžiagų bandymą, yra kūno spalva (t. y. pašviesėjimas arba patamsėjimas), spalvos tolygumas (t. y. vertikalių dryžių buvimas arba nebuvimas), kūno forma (t. y. galvos ir krūtinės srities forma, pilvo išsipūtimas) ir specializuoti antriniai lytiniai požymiai (t. y. poravimosi gumburėlių skaičius ir dydis, sprando pagalvėlės dydis ir kiaušdėtis).

Poravimosi gumburėliai yra ant aktyvaus reprodukcinio amžiaus juodosios drūtagalvės rainės patino galvos (sprando pagalvėlės) ir paprastai yra simetriškai išsidėstę iš abiejų pusių (Jensen ir kiti, 2001). Kontrolinės patelės ir abiejų lyčių žuvų jaunikliai gumburėlių neturi (Jensen ir kiti, 2001). Aplink patinų akis ir tarp jų šnervių gali būti iki aštuonių atskirų gumburėlių. Daugiausia (ir didžiausių) gumburėlių yra išsidėstę dviem lygiagrečiomis linijomis iš karto po šnervėmis ir virš burnos. Daugelis žuvų turi gumburėlių grupes po apatiniu žandu; arčiausiai burnos paprastai yra pavienės poros, o arčiau pilvo esančią grupę gali sudaryti iki keturių gumburėlių. Faktinis gumburėlių skaičius retai viršija 30 (paprastai 18–28; Jensen ir kiti, 2001). Dažniausiai gumburėliai (kalbant apie jų skaičių) yra vientisa, palyginti apvali struktūra, kurios aukštis apytiksliai atitinka plotį. Dauguma aktyvaus reprodukcinio amžiaus patinų taip pat turi bent kelis gumburėlius, kurie yra padidėję ir aiškiai išreikšti taip, kad jų neįmanoma atskirti kaip individualių struktūrų.

Veikiant kai kurių rūšių endokrininę sistemą ardančioms cheminėms medžiagoms, priešingos lyties gyvūnams gali pasireikšti anomalūs antriniai lytiniai požymiai; pvz., dėl androgenų receptorių agonistų, kaip antai 17β-metiltestosterono ar 17β-trenbolono, poveikio juodosios drūtagalvės rainės patelėms gali išsivystyti poravimosi gumburėliai (Smith, 1974; Ankley ir kiti, 2001; 2003), o patinams dėl estrogenų receptorių agonistų poveikio gali sumažėti poravimosi gumburėlių skaičius arba dydis (Miles-Richardson ir kiti, 1999; Harries ir kiti, 2000).

Toliau pateiktas juodosios drūtagalvės rainės poravimosi gumburėlių apibūdinimas, parengtas remiantis JAV procedūromis, taikytomis JAV Aplinkos apsaugos agentūros Duluto (Minesota) laboratorijoje. Tam tikrus produktus ir (arba) įrangą galima pakeisti panašiomis turimomis medžiagomis.

Tyrimą geriausia atlikti naudojant padidinimo stiklą su pašvietimu arba 3X stereoskopą su pašvietimu. Žuvis tiriama iš nugaros pusės, priešakine dalimi į priekį (galva nukreipta į tyrėjo pusę).

a) Įdėkite žuvį į mažą Petri lėkštelę (pvz., 100 mm skersmens), priešakine dalimi į priekį ir pilvu į apačią. Nustatykite vaizdo ieškiklį taip, kad matytųsi gumburėliai. Atsargiai ir lėtai paverskite žuvį nuo vieno šono ant kito, kad nustatytumėte gumburėlių sritis. Suskaičiuokite ir įvertinkite gumburėlius.

b) Pakartokite žuvies galvos tyrimą iš pilvo pusės Petri lėkštelėje padėdami žuvį ant nugaros, priešakine dalimi į priekį.

c) Kiekvienos žuvies tyrimą reikėtų atlikti per dvi minutes.

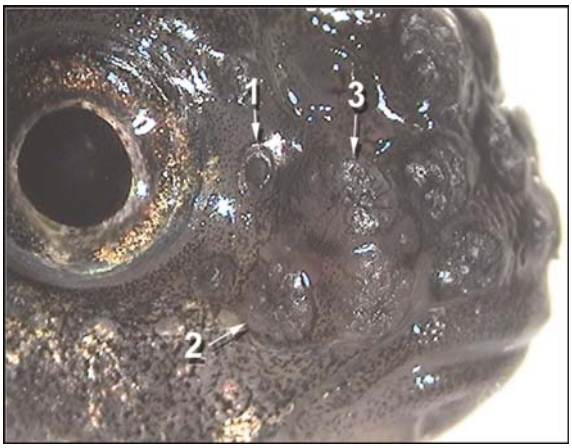
▼M6

Gumburėlių skaičiavimas ir vertinimas

Nustatytos šešios konkrečios juodosios drūtagalvės rainės kūno sritys, kuriose reikia įvertinti gumburėlių buvimą ir vystymąsi. Esamų gumburėlių vietai ir kiekiui sužymėti parengta lentelė (žr. šio priedėlio pabaigą). Gumburėlių skaičius registruojamas, o jų dydis kiekviename organizme gali būti kiekybiškai įvertintas taip: 0 – nėra, 1 – yra, 2 – padidėjęs ir 3 – aiškiai išreikštas (1 pav.).

Įvertis 0 – gumburėlių nėra. Įvertis 1 – gumburėlių yra, jie nustatomi kaip bet kuris vieną viršūnėlę turintis gumburėlis, kurio aukštis beveik lygus pločiui (skersmeniui). Įvertis 2 – padidėję gumburėliai, nustatomi pagal tai, kad jų audiniai pagal išvaizdą primena žvaigždutę, paprastai didelio skersmens, su išeinančiais iš centro grioveliais ir kanalėliais. Gumburėlių viršus dažnai yra nelygus, bet kartais gali būti kiek suapvalintas. Įvertis 3 – gumburėliai aiškiai išreikšti, paprastai gana dideli ir suapvalinti, turi mažiau apibrėžtą struktūrą. Kartais šie gumburėliai susilieja ir sudaro vientisą masę vienoje arba keliose srityse (B, C ir D, apibūdinta toliau). Spalva ir forma panašios į 2 balais įvertintų gumburėlių, bet kartais gali būti gana silpnai išreikštos. Naudojant šią vertinimo sistemą, ant normalaus kontrolinio patino, turinčio 18–20 gumburėlių, paprastai suskaičiuojama mažiau kaip 50 gumburėlių, (Jensen ir kiti, 2001).

1 pav.



Faktiškai kai kurios žuvys gali turėti daugiau gumburėlių negu lentelėje yra konkrečiai vertinamai sričiai skirtų langelių (A priedėlis). Jeigu taip atsitinka, papildomi įverčiai gali būti įrašomi į langelį arba jo dešinėje ar kairėje. Todėl lentelė nebūtinai turi būti simetriška. Taikant kitą suporuotų arba vertikaliai palei horizontaliąją burnos liniją sujungtų gumburėlių žymėjimo metodiką, dviejų gumburėlių įverčiai galėtų būti įrašomi į vieną langelį.

Žymėjimo sritys:

A – aplink akis išsidėstę gumburėliai. Jie žymimi iš nugaros ir pilvo pusės aplink išorinį akies kraštą. Paprastai daug jų turi subrendę kontroliniai patinai, o kontrolinės patelės jų neturi; paprastai jie yra išsidėstę poromis (po vieną prie kiekvienos akies) arba po vieną jų turi androgenų veikiamos patelės.

B – tarp šnervių esantys gumburėliai (sensorinio kanalo poros). Ant kontrolinių patinų šie gumburėliai paprastai išsidėstę poromis ir yra labiau išsivystę (du padidėję arba trys aiškiai išreikšti). Jų neturi kontrolinės patelės, tačiau kartais jie atsiranda ir vystosi androgenais veikiamoms patelėms.

C – gumburėliai, esantys iš karto priešais šnerves, lygiagrečiai burnai. Paprastai tokie subrendusių kontrolinių patinų gumburėliai yra padidėję arba aiškiai išreikšti. Jų turi mažiau išsivystę patinai arba androgenais veikiamos patelės (jie gali būti padidėję).

▼M6

D – lygiagrečiai palei burnos liniją išsidėstę gumburėliai. Paprastai tokie kontrolinių patinų gumburėliai vertinami kaip išsivystę. Jų neturi kontrolinės patelės, tačiau turi androgenais veikiamos patelės.

E – ant apatinio žando, arti burnos esantys gumburėliai, paprastai maži ir išsidėstę poromis. Kontroliniai ar cheminėmis medžiagomis veikiami patinai, taip pat jomis veikiamos patelės turi įvairų jų kiekį.

F – gumburėliai, esantys pilvo pusėje, po E sritimi. Paprastai būna maži ir išsidėstę poromis. Jų turi kontroliniai patinai ir androgenais veikiamos patelės.

NUORODOS

(1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.

(2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environ Toxicol Chem 22:1350-1360.

(3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA,Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (Pimephales promelas). Environ Sci Technol 34:3003-3011.

(4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C 128:127-141.

(5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. J Fish Biol 59:515-523.

(6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (Pimephales promelas). Aquat Toxicol 47:129-145.

(7) Smith RJF. 1974. Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (Pimephales promelas). Can J Zool 52:1031-1038.

Gumburėlių žymėjimo lentelė

Atpažinties Nr. _____

Data _____

Bendras įvertis _____

Skaitinis įvertis

1 – yra

2 – padidėjęs

3 – aiškiai išreikštas

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
				E	**X1**	**X1**					
				F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**			

▼M6

5B priedėlis

Medakos antrinių lytinių požymių vertinimas tam tikroms endokrininę sistemą veikiančioms cheminėms medžiagoms nustatyti

Toliau pateiktas spenelinių ataugų (*), kurios yra medakos (*Oryzias latipes*) antriniai lytiniai požymiai, matavimo aprašymas.

(*) Spenelinės ataugos paprastai atsiranda tik pas suaugusius patinus ir būna tarp antro ir septinto arba aštunto analinio peleko spindulio, skaičiuojant nuo analinio peleko užpakalinio galo (1 ir 2 pav.). Tačiau ataugos retai atsiranda ant pirmo peleko spindulio nuo analinio peleko užpakalinio galo. Pagal šią standartinę veiklos procedūrą (SVP) galima matuoti ant pirmojo peleko spindulio esančias ataugas (pagal šią SVP peleko spinduliai skaičiuojami nuo analinio peleko užpakalinio galo).

1) Pašalinus kepenis (6 priedėlis) skerdena įdedama į kūginį vamzdelį, kuriame yra apie 10 ml 10 % neutralaus buferizuoto formalino tirpalo (galva viršuje, uodega apačioje). Jeigu lytinė liauka fiksuota kitame tirpale nei 10 % neutralus buferizuotas formalinas, preparavimo peiliu atsargiai, kad neužkliudytumėte gonoporo ir pačios lytinės liaukos, padarykite skerdenoje skersinį pjūvį tarp priekinės analinio peleko dalies ir išangės (3 pav.). Galvinę žuvies kūno dalį įdėkite į fiksavimo tirpalą, kad būtų išsaugota lytinė liauka, o uodeginę kūno dalį – į 10 % neutralų buferizuotą formalino tirpalą, kaip aprašyta pirmiau.

2) Žuvies kūną įdėję į 10 % neutralų buferizuotą formalino tirpalą, suimkite priekinę analinio peleko dalį pincetu ir 30-čiai sekundžių ją sulenkite taip, kad analinis pelekas būtų atviras. Suimdami pincetu analinį peleką, atsargiai, kad nebūtų pažeistos spenelinės ataugos, suimkite kelis priekinėje dalyje esančius peleko spindulius.

3) Palaikę analinį peleką atvirą apie 30 sekundžių, iki spenelinių ataugų matavimo žuvies kūną įdėkite į 10 % neutralų buferizuotą formalino tirpalą ir laikykite kambario temperatūroje (matavimas turi būti atliekamas mažiausiai po 24 valandų).

Matavimas

1) Bent 24 valandas palaikę žuvies kūną 10 % neutraliame buferizuotame formalino tirpale, išimkite skerdeną iš kūginio vamzdelio ir nuvalykite formaliną filtravimo popieriumi (arba popierine servetėle).

2) Padėkite žuvį pilvu į viršų. Tada atsargiai nukirpkite analinį peleką mažomis skrodimo žirklėmis (pageidautina analinį peleką nukirpti su nedideliu kiekiu pterigioforo).

3) Pincetu suimkite priekinę atskirto analinio peleko dalį ir padėkite jį ant stiklinės plokštelės su keliais vandens lašais. Tada analinį peleką uždenkite dengiamuoju stikleliu. Suimdami analinį peleką pincetu, stenkitės nepažeisti spenelinių ataugų.

4) Suskaičiuokite sujungtas plokšteles, ant kurių yra spenelinių ataugų, naudodami po biologiniu (tiesioginės šviesos arba invertuotu) mikroskopu esantį skaitiklį. Spenelinės ataugos atpažįstamos, kai ant užpakalinės sujungtos

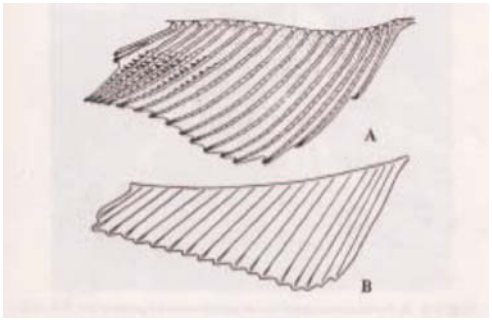
▼M6

plokštelės dalies matomi nedideli ataugų dariniai. Technologiniame lape įrašykite kiekvieno peleko spindulio sujungtų plokštelių, ant kurių yra spenelinių ataugų, skaičių (pvz., pirmas peleko spindulys – 0, antras peleko spindulys – 10, trečias peleko spindulys – 12, ir t. t.) ir įrašykite šių skaičių sumą kiekvienai atskirai žuviai į Excel skaičiuoklę. Prireikus nufotografuokite analinį peleką ir ant nuotraukos suskaičiuokite sujungtas plokšteles, ant kurių yra spenelinių ataugų.

5) Atlikę matavimus, įdėkite analinį peleką į 1 punkte aprašytą kūginį vamzdelį ir laikykite jį ten.

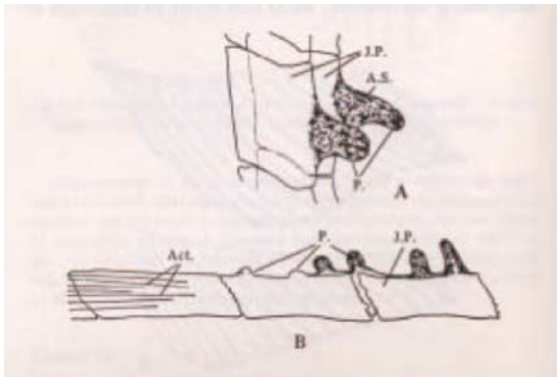
1 pav.

Diagramoje parodyti analinio peleko formos ir dydžio skirtumai pagal lytį. A – patino, B – patelės. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



2 pav.

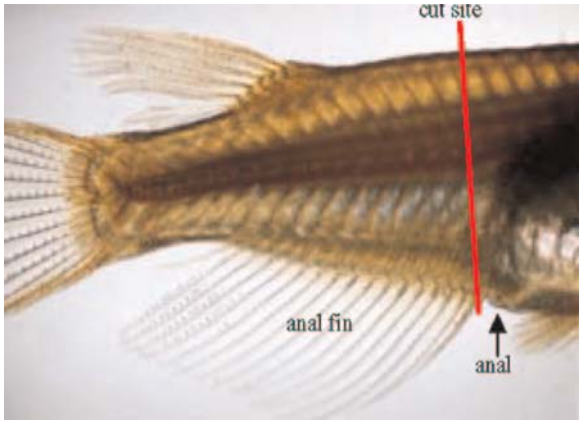
A – ataugos ant sujungtų analinio peleko spindulio plokštelių. J.P. – sujungta plokštelė; A.S. – ašies erdvė; P – atauga. B – distalinis analinio peleko galas. Aktinotrichijos (Act.) yra ant galiuko. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of Oryzias latipes and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



▼M6

3 pav.

Nuotraukoje parodyta pjūvio vieta, kai lytinė liauka fiksuojama kitame fiksavimo tirpale nei 10 % neutralus buferizuotas formalino tirpalas. Tokiu atveju likusi kūno dalis bus nupjauta preparavimo peiliu (raudona linija) darant pjūvį tarp priekinės analinio peleko dalies ir išangės ir galvinė žuvies kūno dalis bus įdėta į lytinės liaukos fiksavimo tirpalą, o uodeginė dalis – į 10 % neutralų buferizuotą formalino tirpalą.



▼M6

6 priedėlis

Rekomenduojamos mėginių ėmimo vitelogenino analizei atlikti procedūros

Reikėtų stengtis išvengti kryžminio patinų ir patelių VTG mėginių užteršimo.

1A procedūra. Juodoji drūtagalvė rainė, kraujo paėmimas iš uodegos venos arba arterijos

Po anestezijos uodegos kotelis dalinai nupjaunamas skalpeliu ir iš uodegos venos arba arterijos heparinizuotu kapiliariniu mikrohematokrito vamzdeliu paimamas kraujas. Paėmus kraujo, plazma greitai atskiriama 3 minutes centrifuguojant 15 000 g/min greičiu (arba 10 minučių 15 000 g/min greičiu esant 4 °C temperatūrai). Jeigu norima, hematokrito procentą galima nustatyti po centrifugavimo. Tada plazma pašalinama iš mikrohematokrito vamzdelio ir iki vitelogenino analizės laikoma centrifuginiame mėgintuvėlyje su 0,13 vienetų aprotinino (proteazės inhibitoriaus) – 80 °C temperatūroje. Atsižvelgiant į juodosios drūtagalvės rainės dydį (kuris priklauso nuo lyties), iš vienos žuvies paprastai surenkama 5–60 mikrolitrų plazmos (Jensen ir kiti, 2001).

1B procedūra. Juodoji drūtagalvė rainė, kraujo paėmimas iš širdies

Kraują taip pat galima paimti heparinizuotu švirkštu (1 000 vienetų heparino vienam ml) atliekant širdies punkciją. Kraujas perpilamas į Eppendorfo mėgintuvėlius (laikomus ant ledo), o tada centrifuguojamas (5 min, 7 000 g, kambario temperatūra). Iki analizės plazmą reikėtų perpilti į švarius Eppendorfo mėgintuvėlius (alikvotinėmis dalimis, jeigu plazmos kiekis yra pakankamas) ir greitai užšaldyti – 80 °C temperatūroje (Panter ir kiti, 1998).

2A procedūra. Japoninė medaka, medakos kepenų pašalinimas

Bandomosios žuvies išėmimas iš bandymo akvariumo

(1) Bandomąją žuvį iš bandymo akvariumo reikėtų išimti naudojant mažą sietelį. Būkite atsargūs, kad neįmestumėte bandomosios žuvies į kitus bandymo akvariumus.

(2) Iš esmės bandomosios žuvys iš indų turėtų būti išimamos tokia eilės tvarka: kontrolė, tirpiklio kontrolė (jeigu taikytina), mažiausia koncentracija, vidutinė koncentracija, didžiausia koncentracija ir teigiama kontrolė. Be to, prieš išimant pateles, iš bandymo akvariumo reikėtų išimti visus patinus.

(3) Kiekvienos bandomosios žuvies lytis nustatoma pagal išorės antrinius lytinius požymius (pvz., analinio peleko formą).

(4) Įdėkite bandomąją žuvį į nešiojamąją talpyklą ir perneškite į darbo vietą kepenims pašalinti. Patikrinkite, ar bandymo akvariumo ir nešiojamosios talpyklos etiketės yra tikslios, ir įsitikinkite, kad iš bandymo akvariumo pašalintų ir jame likusių žuvų skaičius yra toks, kaip numatyta.

(5) Jeigu lyties neįmanoma nustatyti pagal žuvies išorę, iš bandymo akvariumo išimkite visas žuvis. Tokiu atveju lytis turėtų būti nustatoma lytinę liauką arba antrinius lytinius požymius tiriant stereoskopiniu mikroskopu.

▼**M6**

Kepenų pašalinimas

(1) Mažu sieteliu perkelkite bandomąją žuvį iš nešiojamosios talpyklos į anestezinį tirpalą.

(2) Anestezavę bandomąją žuvį, (paprastu) pincetu perkelkite ją ant filtravimo popieriaus (arba popierinės servetėlės). Kad nesulaužytumėte uodegos, bandomąją žuvį pincetu suimkite už galvos šonų.

(3) Nuvalykite vandenį nuo bandomosios žuvies paviršiaus filtravimo popieriumi (arba popierine servetėle).

(4) Padėkite žuvį pilvu į viršų. Tada skrodimo žirklėmis padarykite mažą skersinę įpjovą nuo pilvo pusės kaklo srities iki pilvo vidurio.

(5) Įkiškite skrodimo žirkles į šią mažą įpjovą ir prapjaukite pilvą nuo užpakalinės žiaunų dalies iki galvinės išangės pusės išilgai vidurinės pilvo linijos. Stenkitės neįkišti žirklių pernelyg giliai, kad nebūtų pažeistos kepenys ir lytinė liauka.

(6) Tolesnius veiksmus atlikite po stereoskopiniu mikroskopu.

(7) Padėkite žuvį pilvu į viršų ant popierinės servetėlės (taip pat ją galima įdėti į stiklinę Petri lėkštelę arba ant stiklinės plokštelės).

(8) Praplėskite pilvo ertmės sieneles plonu pincetu ir išimkite vidaus organus. Vidaus organus taip pat galima išimti prireikus pašalinant vieną pilvo ertmės sienelės pusę.

(9) Atverkite sujungtą kepenų ir tulžies pūslės dalį naudodami kitą plonų pincetų porą. Tada pincetu suimkite tulžies lataką ir nupjaukite tulžies pūslę. Stenkitės nesuplėšyti tulžies pūslės.

(10) Suimkite stemplę ir tokiu pat būdu atskirkite virškinimo traktą nuo kepenų. Stenkitės neišpilti virškinimo trakto turinio. Atskirkite užpakalinę virškinimo trakto dalį nuo išangės ir išimkite traktą iš pilvo ertmės.

(11) Pašalinkite riebalų ir kitų aplink kepenis esančių audinių masę. Stenkitės nepažeisti kepenų.

(12) Suimkite už kepenų vartų venos srities plonu pincetu ir išimkite kepenis iš pilvo ertmės.

(13) Padėkite kepenis ant stiklinės plokštelės. Plonu pincetu prireikus pašalinkite visus likusius riebalus ir išorinius audinius (pvz., pilvo sienelę) nuo kepenų paviršiaus.

(14) Pasverkite kepenis elektroninėmis analitinėmis svarstyklėmis, kaip tarą naudodami 1,5 ml mikromėgintuvėlį. Gautą vertę užrašykite technologiniame lape (0,1 mg tikslumu). Patikrinkite mikromėgintuvėlio etiketėje pateiktą atpažinties informaciją.

(15) Uždarykite mikromėgintuvėlį su kepenimis dangteliu. Įdėkite jį į šaldymo stovą (arba stovą su ledu).

(16) Pašalinę kepenis, išvalykite skrodimo instrumentus arba pakeiskite juos švariais.

▼M6

(17) Pagal pirmiau aprašytą procedūrą pašalinkite kepenis iš visų nešiojamojoje talpykloje esančių žuvų.

(18) Pašalinus kepenis iš visų nešiojamojoje talpykloje esančių žuvų (t. y. visų bandymo akvariume laikomų patinų ir patelių), visus kepenų bandinius su identifikacinėmis etiketėmis sudėkite į mėgintuvėlių stovą ir padėkite jį į šaldiklį. Jeigu kepenys paruošiamajam apdorojimui atlikti pateikiamos netrukus po jų pašalinimo, bandiniai į kitą darbo vietą pernešami šaldymo stove (arba stove su ledu).

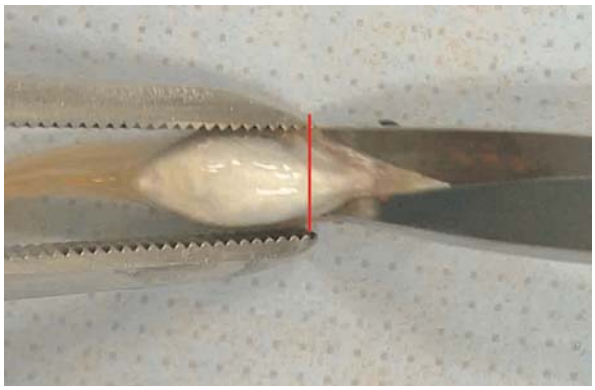
Pašalinus kepenis, žuvies skerdeną galima naudoti antriniams lytiniams požymiams įvertinti.

Bandinys

Jeigu iš bandomųjų žuvų paimti kepenų bandiniai nepanaudojami paruošiamajam apdorojimui atlikti netrukus po jų pašalinimo, laikykite juos ≤ -70 °C temperatūroje.

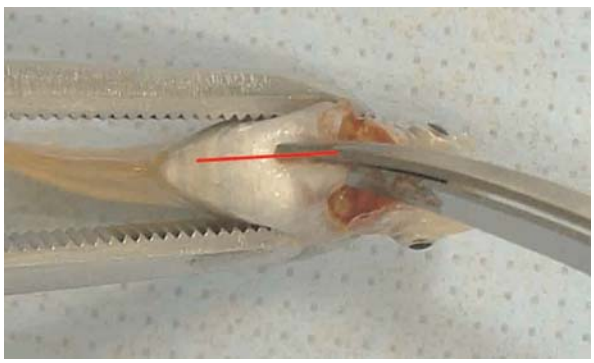
1 pav.

Vieta priešais krūtinės pelekus prapjaunama žirklėmis.



2 pav.

Pilvas prapjaunamas žirklėmis išilgai vidurinės pilvo linijos nuo taško, esančio maždaug 2 mm nuo kaukolės, iki išangės.



▼M6

3 pav.

Pilvo sienelės praskečiamos chirurginėmis žnyplėmis, kad būtų galima išimti kepenis ir kitus vidaus organus. (Taip pat pilvo sieneles galima prispausti iš šonų).



4 pav.

Kepenys bukai prapjaunamos ir išimamos chirurginėmis žnyplėmis.



5 pav.

Žarnynas atsargiai atitraukiamas chirurginėmis žnyplėmis.



▼M6

6 pav.

Abu žarnyno galai ir prisitvirtinusi žarnaplėvė atskiriami žirklėmis.



7 pav. (patelė)

Tokia pati procedūra atliekama su patele.



8 pav.

Procedūra baigta.



2B procedūra. Japoninė medaka (*Oryzias latipes*), kepenų paruošimas vitelogenino analizei

Iš IFA rinkinio paimkite homogenizavimo buferio buteliuką ir atvėsinkite jį smulkintu ledu (tirpalo temperatūra – ≤ 4 °C). Jeigu naudojamas homogenizavimo buferis iš EnBio IFA rinkinio, palikite tirpalą atšilti kambario temperatūroje, o tada atvėsinkite smulkintu ledu.

▼**M6**

Apskaičiuokite kepenims reikalingą homogenizavimo buferio kiekį pagal kepenų svorį (homogenatui paruošti vienam kepenų mg naudokite 50 µl homogenizavimo buferio). Pavyzdžiui, jeigu kepenys sveria 4,5 mg, reikia 225 µl homogenizavimo buferio. Paruoškite visiems kepenų bandiniams reikalingų homogenizavimo buferio kiekių sąrašą.

Kepenų parengimas paruošiamajam apdorojimui

(1) Prieš pat paruošiamąjį apdorojimą išimkite 1,5 ml mikromėgintuvėlį su kepenimis iš šaldiklio.

(2) Kad būtų išvengta užteršimo vitelogeninu, patinų kepenų paruošiamasis apdorojimas turėtų būti atliktas pirmiau nei patelių. Be to, bandomųjų grupių žuvų kepenų paruošiamasis apdorojimas turėtų būti atliekamas tokia eilės tvarka: kontrolė, tirpiklio kontrolė (jeigu taikytina), mažiausia koncentracija, vidutinė koncentracija, didžiausia koncentracija ir teigiama kontrolė.

(3) Bet kuriuo konkrečiu momentu iš šaldiklio turėtų būti išimta ne daugiau 1,5 ml mikromėgintuvėlių su kepenų mėginiais nei tuo metu galima centrifuguoti.

(4) Stove su ledu išrikiuokite 1,5 ml mikromėgintuvėlius su kepenų mėginiais bandinių numerių eilės tvarka (kepenų atitirpdyti nereikia).

Paruošiamojo apdorojimo procedūra

1. Homogenizavimo buferio pridėjimas

(1) Pasitikrinkite sąraše, kokį kiekį homogenizavimo buferio reikia naudoti konkrečiam kepenų mėginiui ir nustatykite atitinkamą kiekį mikropipete (diapazonas: 100–1 000 µl). Užmaukite ant mikropipetės švarų antgalį.

(2) Paimkite reagento buteliuką su homogenizavimo buferiu ir įpilkite buferio į 1,5 ml mikromėgintuvėlį su kepenimis.

(3) Įpilkite homogenizavimo buferio į visus 1,5 ml mikromėgintuvėlius su kepenimis pagal pirmiau aprašytą procedūrą. Mikropipetės antgalio nauju pakeisti nereikia. Tačiau, jeigu antgalis užterštas arba įtariama, kad jis gali būti užterštas, antgalį reikėtų pakeisti.

2. Kepenų homogenizavimas

(1) Pritvirtinkite naują homogenizavimo grūstuvėlį prie mikromėgintuvėlio homogenizatoriaus.

(2) Įkiškite grūstuvėlį į 1,5 ml mikromėgintuvėlį. Laikykite mikromėgintuvėlio homogenizatorių taip, kad suspaustumėte kepenis tarp grūstuvėlio paviršiaus ir 1,5 ml mikromėgintuvėlio vidinės sienelės.

(3) Įjunkite mikromėgintuvėlio homogenizatorių 10–20-iai sekundžių. Atlikdami šią operaciją, atvėsinkite mikromėgintuvėlį smulkintu ledu.

(4) Ištraukite grūstuvėlį iš 1,5 ml mikromėgintuvėlio ir palikite jį apie 10 sekundžių. Tada atlikite vizualinį suspensijos būsenos patikrinimą.

(5) Jeigu suspensijoje matomi kepenų gabaliukai, pakartokite trečią ir ketvirtą veiksmus, kad paruoštumėte tinkamą kepenų homogenatą.

▼M6

(6) Prieš centrifugavimą atvėsinkite suspenduotą kepenų homogenatą stove su ledu.

(7) Gamindami kiekvieną homogenatą, grūstuvėlį pakeiskite nauju.

(8) Pagal pirmiau aprašytą procedūrą homogenizuokite visas kepenis homogenizavimo buferiu.

3. Suspenduoto kepenų homogenato centrifugavimas

(1) Šaldomoje centrifugos kameroje nustatykite ≤ 5 °C temperatūrą.

(2) Įdėkite 1,5 ml mikromėgintuvėlius su suspenduotu kepenų homogenatu į šaldomą centrifugą (jeigu reikia, sureguliuokite balansą).

(3) 10 minučių centrifuguokite suspenduotą kepenų homogenatą 13 000 g greičiu ≤ 5 °C temperatūroje. Tačiau, jeigu supernatantai atsiskyrė tinkamai, centrifugavimo jėgą ir laiką galima koreguoti esant reikalui.

(4) Po centrifugavimo patikrinkite, ar supernatantai tinkamai atsiskyrė (paviršiuje – lipidai, per vidurį – supernatantas, apačioje – kepenų audiniai). Jeigu atsiskyrimas įvyko nekokybiškai, centrifuguokite suspensiją dar kartą tomis pačiomis sąlygomis.

(5) Išimkite visus bandinius iš šaldomos centrifugos ir stove su ledu išrikiuokite juos bandinių numerių eilės tvarka. Po centrifugavimo stenkitės iš naujo nesuplakti atskirų sluoksnių į vieną.

4. Supernatanto surinkimas

(1) Įdėkite keturis 0,5 ml mikromėgintuvėlius su supernatantu į mėgintuvėlių stovą.

(2) Mikropipete paimkite po 30 µl kiekvieno supernatanto (susiformavusio kaip vidurinis sluoksnis) ir supilkite jį į vieną 0,5 ml mikromėgintuvėlį. Stenkitės nesurinkti paviršiuje esančių lipidų arba apatiniame sluoksnyje esančių kepenų audinių.

(3) Surinkite supernatantą ir supilkite jį į kitus du 0,5 ml mikromėgintuvėlius, kaip aprašyta pirmiau.

(4) Surinkite likusią supernatanto dalį mikropipete (jeigu galima – ≥ 100 µl). Tada supilkite supernatantą į likusį 0,5 ml mikromėgintuvėlį. Stenkitės nesurinkti paviršiuje esančių lipidų arba apatiniame sluoksnyje esančių kepenų audinių.

(5) Uždarykite 0,5 ml mikromėgintuvėlį dangteliu ir užrašykite supernatanto kiekį etiketėje. Tada nedelsdami atvėsinkite mikromėgintuvėlius stove su ledu.

(6) Kiekvienam supernatanto mėginiui paimti mikropipetės antgalį pakeiskite nauju. Jeigu prie antgalio prilimpa didelis lipidų kiekis, nedelsdami pakeiskite jį nauju, kad neužterštumėte kepenų ekstrakto riebalais.

(7) Supilkite visą centrifuguotą supernatantą į keturis 0,5 ml mikromėgintuvėlius pagal pirmiau aprašytą procedūrą.

▼M6

(8) Supylę supernatantą į 0,5 ml mikromėgintuvėlius, visus juos su identifikacinėmis etiketėmis sudėkite į mėgintuvėlių stovą, o tada nedelsdami užšaldykite juos šaldiklyje. Jeigu VTG koncentracijos matuojamos iš karto po paruošiamojo apdorojimo, laikydami vieną 0,5 ml mikromėgintuvėlį (kuriame yra 30 µl supernatanto) mėgintuvėlių vėsinimo stove perduokite jį į darbo vietą, kurioje atliekama IFA. Tokiu atveju likusius mikromėgintuvėlius sudėkite į mėgintuvėlių stovus ir užšaldykite juos šaldiklyje.

(9) Surinkę supernatantą, tinkamai pašalinkite liekanas.

Bandinio laikymas

Iki panaudojimo atliekant IFA laikykite 0,5 ml mikromėgintuvėlius su kepenų homogenato supernatantu ≤ – 70 °C temperatūroje.

3A procedūra. Zebrinė danija, kraujo paėmimas iš uodegos venos arba arterijos

Iš karto po anestezijos uodegos kotelis skersai nupjaunamas ir iš uodegos venos arba arterijos heparinizuotu kapiliariniu mikrohematokrito vamzdeliu paimamas kraujas. Kraujo kiekis svyruoja nuo 5 iki 15 µl atsižvelgiant į žuvies dydį. Toks pats aprotinino buferio kiekis (6 µgml fosfatinio buferio tirpale) įtraukiamas į mikrokapiliarinį vamzdelį, o plazma nuo kraujo atskiriama centrifuguojant (5 minutes 600 g greičiu). Plazma surenkama į mėgintuvėlius ir iki vitelogenino ar kitų dominančių baltymų kiekio nustatymo analizės laikoma – 20 °C temperatūroje.

3B procedūra. Zebrinė danija, kraujo paėmimas atliekant širdies punkciją

Kad būtų išvengta kraujo krešėjimo ir baltymų irimo, mėginiai laikomi fosfatinio buferio tirpale (FBT), kuriame yra heparino (1 000 vienetų/ml) ir proteazės inhibitoriaus aprotinino (2 TIU/ml). Buferiui paruošti kaip sudedamąsias dalis rekomenduojama naudoti heparino amonio druską ir liofilizuotą aprotininą. Kraujo mėginiui paimti rekomenduojama naudoti švirkštą (1 ml) su fiksuota plona adata (pvz., Braun Omnikan-F). Švirkštą reikia iš anksto pripildyti buferio tirpalo (maždaug 100 µl), kad iš kiekvienos žuvies būtų visiškai išplautas nedidelis kraujo kiekis. Kraujo mėginiai paimami atliekant širdies punkciją. Iš pradžių žuvis turėtų būti anestezuota MS-222 (100 mg/l). Tinkamai pritaikęs anesteziją, tyrėjas gali atskirti zebrinės danijos širdies plakimą. Atlikdami širdies punkciją, nestipriai spauskite švirkšto stūmoklį. Paimamas kraujo kiekis gali būti 20–40 mikrolitrų. Atlikus širdies punkciją, kraujo ir buferio mišinį reikėtų supilti į mėgintuvėlį. Plazma nuo kraujo atskiriama centrifuguojant (20 min, 5 000 g greičiu) ir iki analizės turėtų būti laikoma – 80 °C temperatūroje.

3C procedūra. Standartinė veiklos procedūra (SVP) – zebrinė danija, galvos ir uodegos homogenizavimas

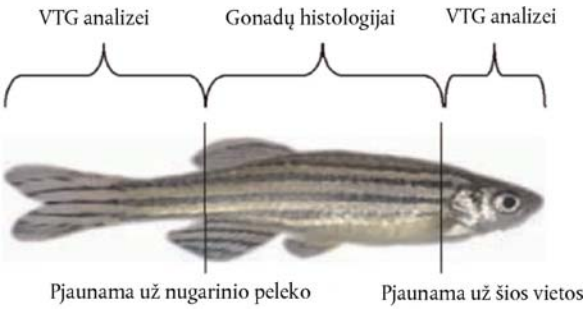
(1) Žuvys anestezuojamos ir numarinamos pagal bandymo aprašymą.

(2) Žuvies galva ir uodega nupjaunamos taip, kaip parodyta 1 pav.

Svarbu: po kiekvienos atskiros žuvies preparavimo visi skrodimo instrumentai ir preparavimo stalas turėtų būti tinkamai išplauti ir išvalyti (pvz., 96 % etanoliu), kad būtų išvengta neindukuotų patinų užteršimo patelių arba indukuotų patinų vitelogeninu.

▼**M6**

1 pav.



(3) Bendras kiekvienos žuvies galvos ir uodegos svoris matuojamas mg tikslumu.

(4) Pasvėrus kūno dalys įdedamos į atitinkamus mėgintuvėlius (pvz., 1,5 ml Eppendorfo mėgintuvėlius) ir iki homogenizavimo užšaldomos – 80 °C temperatūroje arba tiesiogiai homogenizuojamos ant ledo dviem plastikinėmis piestelėmis. (Kiti metodai gali būti taikomi, jeigu tai atliekama ant ledo ir rezultatas yra homogeniška masė). Svarbu: mėgintuvėliai turėtų būti tinkamai sunumeruoti, kad žuvies galvą ir uodegą būtų galima susieti su atitinkama jų kūno dalimi, naudojama lytinių liaukų histologinei analizei atlikti.

(5) Gavus homogenišką masę, įpilama ledo šaltumo homogenizavimo buferio (*), kurio turi būti keturis kartus daugiau nei sveria audiniai. Toliau dirbkite piestelėmis, kol mišinys taps homogeniškas. Svarbi pastaba: kiekvienai žuviai naudojamos naujos piestelės.

(6) Iki centrifugavimo 30 minučių 50 000 × g greičiu 4 °C temperatūroje mėginiai padedami ant ledo.

(7) Pipete įlašinkite po 20 µl supernatanto bent į du mėgintuvėlius panardindami pipetės galiuką žemiau paviršinio riebalų sluoksnio ir atsargiai surinkdami supernatantą be riebalų ar audinių dalelių.

(8) Iki panaudojimo mėgintuvėliai laikomi – 80 °C temperatūroje.

(*) **Homogenizavimo buferis:**

— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % proteazės inhibitorių mišinys („Sigma“): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl proteazės inhibitorių mišinio.

— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), pvz., „Bie & Berntsen“ gamybos (Danija).

— Proteazės inhibitorių mišinys: „Sigma“ gamybos (žinduolių audiniams). Produkto numeris P 8340.

— *Pastaba.* Homogenizavimo buferį reikėtų panaudoti tą pačią dieną, kurią jis buvo pagamintas. Naudodami laikykite tirpalą ant ledo.

▼**M6**

7 priedėlis

Sustiprinti vitelogenino mėginiai ir pamatinis tyrimo etalonas

Kiekvieną vitelogenino analizės atlikimo dieną bus išanalizuojamas sustiprintas mėginys, paruoštas naudojant etaloninį bandymo standartą. Etaloniniam bandymo standartui paruošti naudojamas vitelogeninas bus iš kitos partijos nei ta, kuri naudota atliekamo bandymo etaloniniams kalibravimo tirpalams paruošti.

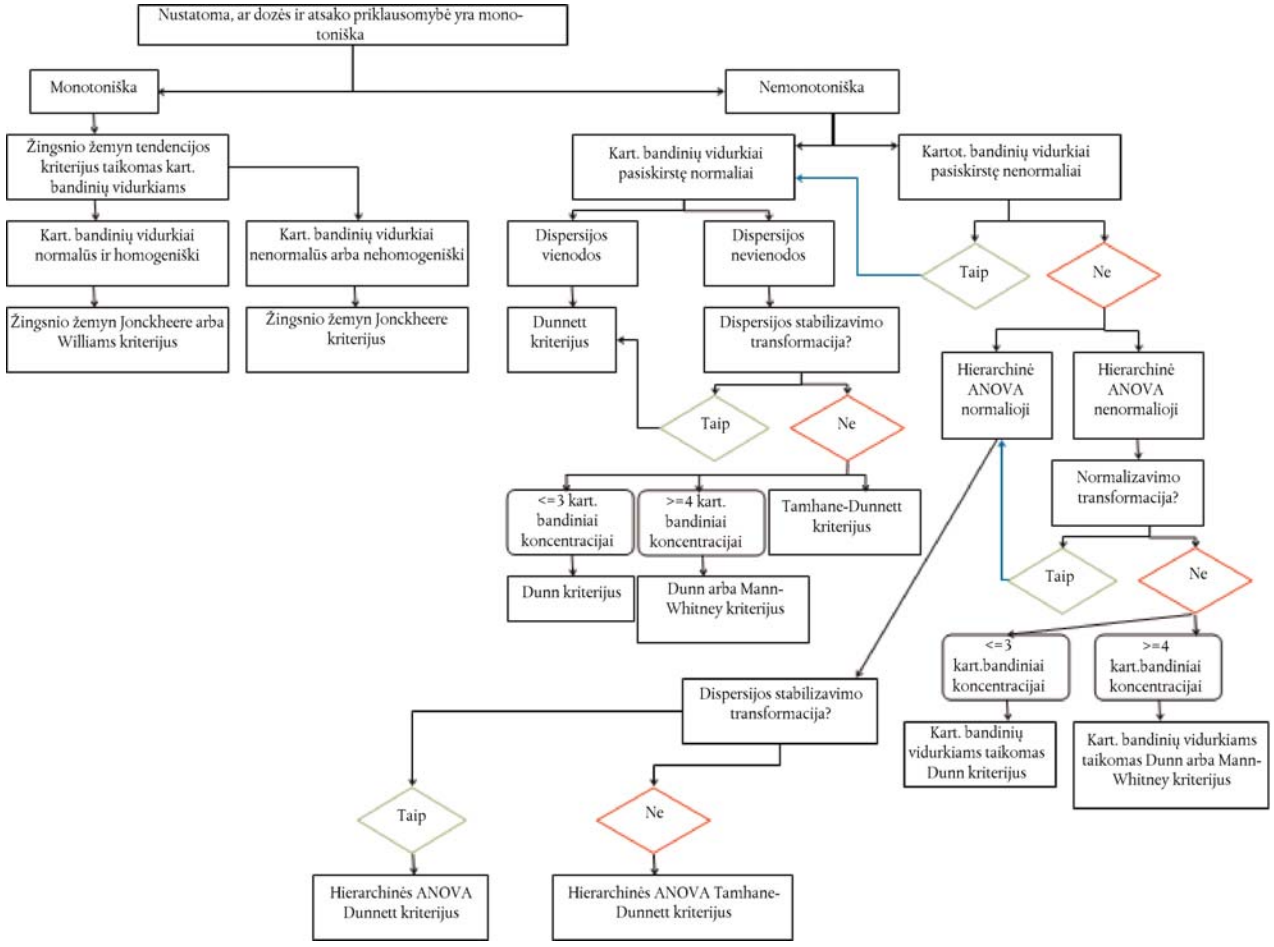
Sustiprintas mėginys bus paruošiamas į kontrolinio patino plazmą pridedant žinomą etaloninio bandymo standarto kiekį. Mėginys bus stiprinamas tol, kol vitelogenino koncentracija taps 10–100 kartų didesnė nei numatoma kontrolinio patino vitelogenino koncentracija. Stiprinamas kontrolinio patino plazmos mėginys gali būti paimtas iš vienos žuvies arba iš kelių žuvų.

Bent dviejose kartotinėse duobutėse bus analizuojamas nesustiprintas kontrolinio patino plazmos poėminis. Sustiprintas mėginys taip pat bus analizuojamas bent dviejose kartotinėse duobutėse. Numatomai koncentracijai apskaičiuoti vidutinis dviejų nesustiprintų kontrolinių patinų plazmos mėginių vitelogenino kiekis bus pridėtas prie apskaičiuoto vitelogenino kiekio, pridėto prie sustiprintų mėginių. Šios numatomos ir išmatuotos koncentracijų santykis bus pateiktas kartu su kiekvienos tą dieną atliktų analizių grupės rezultatais.

▼M6

8 priedėlis

Statistinei analizei skirta srautinė sprendimų diagrama



02008R0440 — LT — 18.05.2017 — 007.001 — 1817

▼M6

C.38. VARLIAGYVIŲ METAMORFOZĖS TYRIMAS

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) Nr. 231 (2009). Poreikis sukurti ir patvirtinti tyrimą, kurį atliekant būtų galima aptikti stuburinių rūšių skydliaukės sistemą veikiančias chemines medžiagas, kyla iš susirūpinimo, kad aplinkoje esančios cheminės medžiagos gali sukelti neigiamų padarinių žmonėms ir laukinei gyvūnijai. 1998 m. EBPO ėmėsi didelės svarbos darbų peržiūrėti esamas ir sukurti naujas endokrininę sistemą galinčių ardyti cheminių medžiagų atrankos ir bandymo gaires. Viena iš darbo dalių buvo cheminių medžiagų, veikiančių stuburinių rūšių skydliaukės sistemą, atrankos TG sukūrimas. Buvo pasiūlytas patobulintas 28 dienų graužikų kartotinės dozės toksiškumo per virškinamąjį traktą bandymas (šio priedo B.7 skyrius) ir varliagyvių metamorfozės tyrimas (AMA). Buvo atliktas patobulinto bandymo metodo B.7 tinkamumo patvirtinimas ir paskelbtas peržiūrėtas bandymo metodas. Buvo vykdyta didelės apimties varliagyvių metamorfozės tyrimo (AMA) tinkamumo patvirtinimo programa, kurią sudarė laboratoriniai ir tarplaboratoriniai tyrimai, įrodantys tyrimo tinkamumą ir patikimumą (1, 2). Vėliau nepriklausomų ekspertų grupė atliko tyrimo tinkamumo patvirtinimo analizę (3). Šis bandymo metodas yra patirties, sukauptos atliekant skydliaukės veiklą veikiančių cheminių medžiagų aptikimo metodų tinkamumo patvirtinimo tyrimus ir kitus darbus EBPO valstybėse narėse, rezultatas.

BANDYMO PRINCIPAS

2. Varliagyvių metamorfozės tyrimas (AMA) yra atrankos tyrimas, skirtas empiriniu būdu nustatyti chemines medžiagas, kurios gali trukdyti normaliai pagumburio-hipofizės-skydliaukės (HPT) ašies funkcijai. AMA atitinka apibendrintąjį stuburinių modelį tiek, kiek jis yra pagrįstas HPT ašies išsaugotomis struktūromis ir funkcijomis. Tai yra svarbus tyrimas, nes varliagyvių metamorfozė yra gerai ištirtas su skydliauke susijęs procesas, kuris reaguoja į HPT ašį veikiančias chemines medžiagas, ir šiuo metu yra vienintelis tyrimas, kuriuo aptinkamas poveikis morfologinio vystymosi stadijos gyvūnų skydliaukės veiklai.

3. Bendrąjį bandymo planą sudaro 51 stadijos *Xenopus laevis* buožgalvių 21 dienos trukmės veikimas ne mažiau kaip trijų skirtingų koncentracijos verčių bandomąja chemine medžiaga ir kontrolinis bandinys su skiedimo vandeniu. Naudojami keturi kiekvienos bandomosios medžiagos koncentracijos kartotiniai bandiniai. Visų bandomąja medžiaga veikiamų grupių lervų tankis bandymo pradžioje yra 20 buožgalvių viename bandymo inde. Stebimos vertinamosios baigtys yra užpakalinės galūnės ilgis (HLL), atstumas nuo snukio iki išeinamosios angos (SVL), vystymosi stadija, šlapio kūno masė, skydliaukės histologija ir kasdieniai gaištamumo stebėjimo duomenys.

METODO APRAŠYMAS

Bandymo gyvūnų rūšys

4. *Xenopus laevis* paprastai augina viso pasaulio laboratorijos ir juos lengva gauti iš komercinių tiekėjų. Šios gyvūnų rūšies reprodukciją ištisus metus galima nesunkiai sukelti darant žmogaus chorioninio gonadotropino (hCG) injekcijas ir gautas lervas galima auginti dideliais kiekiais įprastu būdu iki pasirinktų vystymosi stadijų, kad būtų galima naudoti konkrečioms stadijoms skirtus bandymų protokolus. Pageidautina, kad tyrime naudojamos lervos būtų gautos iš suaugusių gyvūnų toje pačioje laboratorijoje. Galima taikyti alternatyvią procedūrą, kuri nėra pageidautina, kai ikrai arba

▼M6

embrionai būtų tiekiami į bandymą atliekančią laboratoriją ir aklimatizuojami; nepriimtina atsisiųsti lervos stadijų bandymo gyvūnus.

Įranga ir pagalbiniai reikmenys

5. Bandymui atlikti būtina ši įranga ir pagalbiniai reikmenys:

a) poveikio sistema (žr. toliau pateiktą aprašymą);

b) stikliniai arba nerūdijančiojo plieno akvariumai (žr. toliau pateiktą aprašymą);

c) auginimo indai;

d) temperatūros reguliavimo aparatūra (pvz., šildytuvai arba aušintuvai (reguliuojami iki 22° ± 1 °C));

e) termometras;

f) dviejų okuliarų skrodimo mikroskopas;

g) skaitmeninė kamera, kurios skyra ne mažesnė kaip 4 megapikseliai, su mikroreguliavimo funkcija;

h) skaitmeninio vaizdo gavimo programinė įranga;

i) Petri lėkštelė (pvz., 100 × 15 mm) arba panašių matmenų permatoma plastikinė kamera;

j) analizinės svarstyklės, kuriomis galima sverti tūkstantųjų tikslumu (mg);

k) ištirpusio deguonies matuoklis;

l) pH metras;

m) šviesos stiprio matuoklis, kuris matuoja liuksais;

n) įvairūs laboratoriniai stikliniai indai ir įrankiai;

o) dozuojamosios pipetės (nuo 10 iki 5 000 µl) arba atitinkamų tūrių pipečių rinkiniai;

p) bandomoji cheminė medžiaga, kurios pakaktų tyrimui atlikti, pageidautina, vienos partijos;

q) analizės prietaisai, kurie tiktų bandomajai cheminei medžiagai tirti, arba analizės paslaugos pagal rangos sutartį.

Cheminis bandomumas

6. AMA pagrįstas veikimo vandeniniu tirpalu protokolo taikymu, kai bandomoji cheminė medžiaga į bandymo kameras tiekiama pratekamąja sistema.

▼M6

Tačiau pratekamieji metodai tinka ne visų tipų cheminėms medžiagoms bandyti – tai priklauso nuo cheminės medžiagos fizikinių ir cheminių savybių. Todėl, prieš taikant šį protokolą, reikėtų gauti bandomumui nustatyti svarbią pradinę informaciją apie cheminę medžiagą ir EBPO gairėse reikėtų ieškoti informacijos apie sunkiai tiriamų cheminių medžiagų ir mišinių vandeninės terpės toksiškumo bandymus (4). Charakteristikos, kurios rodo, kad cheminę medžiagą gali būti sunku tirti vandeninėse sistemose, yra tokios: dideli oktanolio ir vandens pasiskirstymo koeficientai (log K_{ow}), didelis lakumas, jautrumas hidrolizei ir jautrumas fotolizei laboratorijos aplinkos apšvietimo sąlygomis. Bandomumui nustatyti gali būti svarbūs kiti veiksniai ir jie turėtų būti nustatyti kiekvienu atveju atskirai. Jei sėkmingas cheminės medžiagos bandymas naudojant pratekamąją bandymo sistemą neįmanomas, galima naudoti statinio atnaujinimo sistemą. Jei nė vienos iš sistemų bandomajai cheminei medžiagai pritaikyti neįmanoma, tada pagal šį protokolą bandymas neatliekamas.

Poveikio sistema

7. Jei įmanoma, pirmenybė teikiama pratekamajai skiediklio sistemai palyginti su statinio atnaujinimo sistema. Jei bandomosios cheminės medžiagos fizikinių ir (arba) cheminių savybių neįmanoma priderinti prie pratekamosios skiediklio sistemos, galima naudoti alternatyvią poveikio sistemą (pvz., statinio atnaujinimo). Sistemos komponentai, kurie liečiasi su vandeniu, turėtų būti iš stiklo, nerūdijančiojo plieno ir (arba) politetrafluoretileno. Tačiau galima naudoti tinkamus plastikus, jei jie nekenkia bandymui. Bandymo indai turėtų būti stikliniai arba nerūdijančiojo plieno akvariumai su vertikaliaisiais tiekimo vamzdžiais, kuriais būtų užtikrinamas vandens tūris maždaug nuo 4,0 iki 10,0 l ir minimalus vandens gylis nuo 10 cm iki 15 cm. Sistema turėtų tikti bandyti visas poveikio koncentracijos vertes ir kontrolinį bandinį, naudojant keturis kartotinius vienos koncentracijos bandinius. Kiekvieno indo srautas turėtų būti pastovus, atsižvelgiant į biologinių sąlygų ir veikimo chemine medžiaga užtikrinimą (pvz., 25 ml/min). Indų su bandomąja medžiaga vieta poveikio sistemoje turėtų būti priskirta atsitiktinai, kad būtų sumažinti galimi padėties veiksniai, įskaitant nežymius temperatūros, apšvietos ir kt. pokyčius. Reikėtų naudoti liuminescencinį apšvietimą 12 h dienos šviesos ir 12 h tamsos laikotarpiui gauti, kad apšvietos intervalas vandens paviršiuje būtų nuo 600 iki 2 000 liuksų (liumenų/m^2). Kiekvieno bandymo indo vandens temperatūra turėtų būti 22° ± 1 °C, pH – nuo 6,5 iki 8,5, ištirpusio deguonies (DO) koncentracija > 3,5 mg/l (> 40 % oro soties). Vandens temperatūra, pH ir ištirpusio deguonies koncentracija turėtų būti matuojami ne rečiau kaip kartą per savaitę; temperatūrą pageidautina matuoti nepertraukiamai bent viename bandymo inde. 1 priedėlyje aprašytos bandymų sąlygos, kuriomis reikėtų vykdyti protokolą. Dėl papildomos informacijos apie pratekamųjų poveikio sistemų ir (arba) statinio atnaujinimo sistemų įrengimą žr. ASTM standartų apie bandomųjų medžiagų ūmaus toksiškumo žuvims, makrobestuburiams ir varliagyviams bandymų vadovą (5) bei bendruosius vandens toksikologijos bandymus.

Vandens kokybė

8. Galima naudoti bet kokį vietinį vandenį (pvz., šaltinio vandenį arba per aktyvintąsias anglis filtruotą vandentiekio vandenį), kuriame gali normaliai augti ir vystytis *X. laevis* buožgalviai. Kadangi iš skirtingų vietų paimto vietinio vandens kokybė gali labai skirtis, reikėtų atlikti vandens kokybės analizę, ypač jei nėra ankstesnių duomenų apie vandens tinkamumą *Xenopus* auginti. Ypač reikėtų žiūrėti, kad vandenyje nebūtų vario, chloro ir chloraminų, kurie yra toksiški varlėms ir buožgalviams. Be to, rekomenduojama analizuoti vandenį foninei fluorido, perchlorato ir chlorato (geriamojo vandens dezinfekcijos šalutinių produktų) koncentracijai nustatyti, nes visi šie anijonai yra skydliaukės jodo pernešimo substratai ir padidinta kiekvieno iš šių anijonų koncentracija gali iškreipti tyrimo rezultatus.

▼M6

Analizę reikėtų atlikti prieš bandymų pradžią ir bandymo vandenyje paprastai neturėtų būti šių anijonų.

Jodido koncentracija bandymo vandenyje

9. Lervos kartu su vandeniu ir maistu turi gauti pakankamai jodo, kad skydliaukė galėtų sintetinti tiroksiną. Šiuo metu nėra empiriškai nustatytų gairių dėl minimalių jodido koncentracijos verčių. Tačiau jodido prieinamumas gali turėti įtakos skydliaukės sistemos atsakui į skydliaukę veikiančius agentus, ir yra žinoma, kad jodidas keičia skydliaukės bazinį aktyvumą, todėl jodido kiekis yra nagrinėtinas aspektas, kai aiškinami skydliaukės histopatologijos rezultatai. Todėl ataskaitoje reikėtų pateikti išmatuotas bandymo vandens jodido koncentracijos vertes. Atsižvelgiant į turimus tinkamumo patvirtinimo tyrimų duomenis, buvo įrodyta, kad protokolas tinka, kai bandymo vandens jodido (I^-) (I-) koncentracijos vertės yra nuo 0,5 μg/l iki 10 μg/l. Geriausia būtų, kad minimali jodido koncentracija bandymo vandenyje būtų 0,5 μg/l. Jei bandymo vanduo yra atkuriamas iš dejonizuoto vandens, į jį turi būti dedama ne mažesnės kaip 0,5 μg/l koncentracijos jodo. Kiekvienas papildomas jodo arba kitų druskų pridėjimas į bandymo vandenį turėtų būti nurodytas ataskaitoje.

Gyvūnų laikymas

Suaugusių gyvūnų priežiūra ir veisimas

10. Suaugę gyvūnai prižiūrimi ir veisiami pagal standartines rekomendacijas, o išsamesnė informacija skaitytojui pateikiama standartiniame vadove *Varlių embrionų teratogenezės tyrimas* (FETAX) (6). Tokios standartinės rekomendacijos yra tinkamos priežiūros ir tinkamo veisimo metodų pavyzdys, tačiau jų griežtai laikytis nereikalaujama. Veisimui paskatinti suaugusių patelių ir patinų poroms (3–5) daroma žmogaus chorioninio gonadotropino (hCG) injekcija. Patelėms ir patinams daroma maždaug 800 IU–1 000 IU ir 600 IU–800 IU hCG, ištirpinto 0,6–0,9 % fiziologiniame tirpale, injekcija. Veislinės poros laikomos dideliuose induose, netrikdomos ir statinėmis sąlygomis, kad būtų skatinamas apglėbimas. Reikėtų, kad kiekvienas veisimo indas turėtų antrąjį dugną iš nerūdijančiojo plieno arba plastikinio tinklo, per kurį į indo dugną galėtų kristi ikrų masė. Jei injekcija varlėms daroma vėlai po pietų, didesnė dalis ikrų paprastai būna padėta iki kitos dienos vidurdienio. Gavus ir apvaisinus pakankamai ikrų, suaugę gyvūnai turėtų būti pašalinti iš veisimo indų.

Lervų priežiūra ir atranka

11. Pašalinus suaugusius gyvūnus iš veisimo indų, ikrai surenkami ir jų gyvybingumas įvertinamas naudojant reprezentatyvų visų veisimo indų embrionų rinkinį. Reikėtų pasilikti geriausią (-ias) atskirą (-as) vadą (-as) (rekomenduojama imti 2–3, kad, atsižvelgiant į embrionų gyvybingumą ir reikiamo embrionų skaičiaus buvimą (ne mažiau kaip 1 500), būtų įvertinta vadų kokybė). Visi tiriami organizmai turėtų būti gauti per vieną ikrų dėjimą (t. y. vadų nereikėtų tarpusavyje maišyti). Embrionai pernešami į didelį plokščią padėklą arba lėkštę ir visi akivaizdžiai negyvi arba nenormalūs ikrai (žr. (5) apibrėžtį) pašalinami pipete arba akių lašų lašintuvu. Visų trijų vadų sveiki embrionai pernešami į tris atskirus inkubavimo indus. Po keturių dienų nuo pernešimo į inkubavimo indus pasirenkama

▼M6

geriausia vada pagal gyvybingumą ir išsiritimo sėkmę ir lervos pernešamos į reikiamą auginimo indų, kuriuose yra 22° ± 1 °C temperatūra, skaičių. Be to, tam tikras papildomų lervų skaičius pernešamas į papildomus indus, kad jomis būtų galima pakeisti auginimo induose per pirmąją savaitę žuvusias lervas. Ši procedūra užtikrina pastovų organizmų tankį, taigi sumažina atskiros vados palikuonių vystymosi skirtumus. Visi auginimo indai kasdien išvalomi sifonu. Dėl saugos geriau naudoti vinilo arba nitrilo pirštines, o ne latekso. Pirmąją savaitę žuvusias lervas reikėtų šalinti kasdien ir jas pakeisti atsarginėmis lervomis, kad būtų išsaugotas organizmų tankis. Maitinti reikėtų mažiausiai du kartus per dieną.

12. Per laikotarpį iki veikimo bandomąja medžiaga buožgalviai pratinami prie tų sąlygų, kurios bus per jų veikimo bandomąja medžiaga laikotarpį, įskaitant maisto tipą, temperatūrą, šviesos bei tamsos ciklą ir kultūros terpę. Todėl rekomenduojama, kad laikotarpiu iki veikimo ir veikimo laikotarpiu būtų naudojama ta pati kultūros terpė ar skiedimo vanduo. Jei buožgalviams laikyti laikotarpiu iki veikimo naudojama statinė kultūros sistema, kultūros terpę reikėtų visiškai pakeisti mažiausiai du kartus per savaitę. Laikotarpiu iki veikimo reikėtų vengti perpildymo dėl didelio lervų tankio, nes tokie veiksniai galėtų reikšmingai veikti buožgalvių vystymąsi paskesniu bandymo tarpsniu. Todėl auginimo tankis turėtų būti ne didesnis kaip maždaug keturi buožgalviai/l kultūros terpėje (statinė poveikio sistema) arba 10 buožgalvių/l kultūros terpėje (esant, pvz., 50 ml/min srautui laikotarpio iki veikimo arba auginimo sistemoje). Šiomis sąlygomis buožgalviai turėtų vystytis dvylikos dienų laikotarpiu nuo 45 ar 46 stadijos iki 51 stadijos. Šios pradinės populiacijos reprezentatyvieji buožgalviai turėtų būti apžiūrimi kasdien vystymosi stadijai nustatyti, kad būtų galima nustatyti, kada yra tinkamas laikas pradėti juos veikti bandomąja medžiaga. Reikėtų imtis priemonių, kad buožgalviams sukeliamas stresas ir trauma būtų kiek įmanoma mažesni, ypač, perkeliant, valant akvariumus ir tvarkant lervas. Reikėtų vengti stresą sukeliančių sąlygų arba veiksmų, pvz., didelio ir (arba) nenutrūkstamo triukšmo, akvariumų tapšnojimo, virpesių akvariumuose, per didelės veiklos laboratorijoje ir staigių aplinkos terpės pokyčių (apšvietimo, temperatūros, pH, ištirpusio deguonies (DO), vandens srautų ir kt.). Jei per 17 dienų nuo apvaisinimo buožgalviai neišsivysto iki 51 stadijos, kaip galima priežastis galėtų būti per didelis stresas.

Lervų kultūra ir maitinimas

13. Visą laikotarpį iki veikimo bandomąja medžiaga (po Nieuwkoop ir Faber (NF) 45 ar 46 stadijos (8)) ir visą 21 dienos bandymo laikotarpį buožgalviai maitinami, pvz., prekyboje esančiu buožgalvių maistu, naudotu atliekant tinkamumo patvirtinimo tyrimus (taip pat žr. 1 priedėlį), arba kitu maistu, kuris tinka vienodiems varliagyvių metamorfozės tyrimo rezultatams gauti. Maitinimo režimas laikotarpiu iki veikimo turėtų būti kruopščiai reguliuojamas, kad atitiktų besivystančių buožgalvių poreikius. T. y., tik ką išsiritusiems buožgalviams maistą reikėtų duoti mažomis porcijomis kelis kartus per dieną (ne mažiau kaip du kartus). Reikėtų vengti maisto pertekliaus, kad *i)* būtų išlaikyta vandens kokybė ir *ii)* žiauniniai filtrai būtų apsaugoti nuo užsikimšimo maisto dalelėmis ir liekanomis. Jei buožgalviai maitinami tinkamumo patvirtinimo tyrimams naudotu maistu, dienos maisto davinys turėtų būti didinamas buožgalviams augant iki maždaug 30 mg/gyvūnui/dienai prieš pat bandymo pradžią. Atliekant tinkamumo patvirtinimo tyrimus buvo įrodyta, kad šis prekyboje esantis maistas užtikrina reikiamą *X. laevis* buožgalvių augimą ir vystymąsi ir jį sudaro smulkios dalelės, kurios ilgai išsilaiko suspenduotos vandens stulpelyje ir išsiplauna srautu. Todėl suminis dienos maisto kiekis turėtų būti padalytas į mažesnes porcijas ir maitinama ne mažiau kaip du kartus per

▼M6

dieną. Maitinimo šiuo maistu režimas pateiktas 1 lentelėje. Maitinimo normos turėtų būti užrašytos. Galima maitinti sausu maistu arba skiedimo vandenyje paruoštu jo pradiniu tirpalu. Toks pradinis tirpalas turi būti ruošiamas iš naujo kas antrą dieną ir laikomas 4 °C temperatūroje, kai nenaudojamas.

1 lentelė.

Maitinimo prekyboje esančiu buožgalvių maistu režimas, taikomas *X. laevis* buožgalviams atliekant tinkamumo patvirtinimo tyrimus AMA pradiniu laikotarpiu pratekėjimo sąlygomis

Tyrimo diena	Maisto davinys (mg maisto/gyvūnui/dienai)
0–4	30
5–7	40
8–10	50
11–14	70
15–21	80

Analizinė chemija

14. Prieš tyrimo pradžią reikėtų įvertinti bandomosios cheminės medžiagos stabilumą naudojant turimą informaciją apie jos tirpumą, skaidumą ir lakumą. Reikėtų paimti kiekvienos koncentracijos bandymo tirpalų ėminius iš kiekvieno kartotinio bandinio indo, kad būtų atlikta cheminė analizė bandymo pradžioje (0 diena) ir kas savaitę, imant ne mažiau kaip keturis ėminius. Taip pat rekomenduojama nustatyti kiekvieną bandymo koncentraciją ruošiant sistemą prieš bandymo pradžią, kad būtų patikrintas sistemos veikimas. Be to, rekomenduojama analizuoti pradinius tirpalus, kai jie keičiami, ypač, jei pradinio tirpalo tūryje esančio cheminės medžiagos kiekio nepakanka visai įprastinio ėminių ėmimo laikotarpių trukmei aprėpti. Jei tiriamos cheminės medžiagos, kurių negalima aptikti esant kai kurioms arba visoms bandymo koncentracijos vertėms, reikėtų matuoti pradinių tirpalų koncentraciją ir užrašyti sistemos srautus, kad būtų apskaičiuotos nominalios koncentracijos vertės.

Cheminės medžiagos tiekimas

15. Bandomosios cheminės medžiagos tiekimo į sistemą būdas, atsižvelgiant į jos fizikines ir chemines savybes, gali skirtis. Vandenyje tirpias chemines medžiagas galima ištirpinti bandymo vandens alikvotinėse dalyse tokios koncentracijos, kuri atitiktų tiekimo pratekamąja sistema tikslinę bandymo koncentraciją. Chemines medžiagas, kurios kambario temperatūroje yra skysčiai ir mažai tirpsta vandenyje, galima tiekti taikant skysčio prisotinimo skysčiu metodus. Chemines medžiagas, kurios kambario temperatūroje yra kietos medžiagos ir mažai tirpsta vandenyje, galima tiekti naudojant stiklo pluošto kolonėlę kaip sotintuvą (7). Pirmenybė teikiama bandymo sistemai, kurioje nenaudojamas nešiklis, tačiau skirtingos bandomosios cheminės medžiagos turės skirtingas fizikines ir chemines savybes, dėl kurių greičiausiai teks taikyti skirtingus vandens su bandomąja chemine medžiaga ruošimo būdus. Pageidautina nenaudoti tirpiklių arba nešiklių, nes: *i)* tam tikri tirpikliai patys gali būti toksiški ir (arba) sukelti nepageidaujamus arba netikėtus endokrininius atsakus, *ii)* bandant chemines medžiagas virš jų tirpumo vandenyje (kaip gali dažnai pasitaikyti

▼M6

naudojant tirpiklius) efektyviosios koncentracijos gali būti nustatytos netiksliai, ir *iii)* atliekant ilgalaikius bandymus dėl tirpiklių naudojimo gali susidaryti nemaža biologinė plėvelė, susijusi su mikrobų aktyvumu. Tirpiklius galima naudoti kaip kraštutinę priemonę sunkiai bandomoms medžiagoms tirti, taip pat EBPO gairėse reikėtų ieškoti informacijos apie sunkiai tiriamų cheminių medžiagų ir mišinių vandeninės terpės toksiškumo bandymus (4), kad būtų nustatytas geriausias bandymo metodas. Tirpiklis pasirenkamas atsižvelgiant į cheminės medžiagos chemines savybes. Tirpikliai, kurie buvo nustatyti kaip efektyvi priemonė atliekant vandens terpės toksiškumo bandymus, yra acetonas, etanolis, metanolis, dimetilformamidas ir trietilenglikolis. Jei naudojamas tirpiklinis nešiklis, jo koncentracija turėtų būti mažesnė nei ilgalaikio nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC); EBPO gairėse nurodyta ne didesnė kaip 100 µl/l; naujai atliktoje apžvalgoje rekomenduojama, kad tirpiklio koncentracija skiedimo vandenyje būtų tik 20 µl/l (12). Jei naudojami tirpikliniai nešikliai, be netirpiklinių kontrolinių ėminių (švaraus vandens) reikėtų įvertinti atitinkamus tirpiklio kontrolinius ėminius. Jei cheminės medžiagos neįmanoma įterpti su vandeniu dėl fizikinių ir cheminių charakteristikų (mažas tirpumas) arba riboto cheminio prieinamumo, galima svarstyti jos tiekimą su maistu. Poveikio per maistą srityje atlikta preliminarių darbų, tačiau šis veikimo būdas nėra plačiai taikomas. Metodo pasirinkimas turėtų būti aprašytas ir patikrintas atliekant analizę.

Bandymo koncentracijos verčių parinkimas

Didelės bandymo koncentracijos nustatymas

16. Šiame bandyme didelė bandymo koncentracija turėtų būti nustatyta, atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos ribinį tirpumą, ūmaus toksiškumo cheminių medžiagų maksimalią toleruojamąją koncentraciją (MTC) arba 100 mg/l, nelygu, kuri yra mažiausia.

17. MTC apibrėžiama kaip didžiausia cheminės medžiagos bandomoji koncentracija, kuriai esant ūmus gaištamumas mažesnis kaip 10 %. Šis būdas taikomas kai yra empiriniai ūmaus gaištamumo duomenys, pagal kuriuos galima įvertinti MTC. MTC įvertinimas gali būti netikslus ir paprastai reikalauja tam tikro profesinio išmanymo. Nors regresijos modelių taikymas iš esmės galėtų būti patikimiausias MTC vertinimo būdas, tinkamą apytikrę MTC vertę galima gauti pagal esamus ūmaus gaištamumo duomenis, imant 1/3 ūmios LC50 vertės. Tačiau tiriamų rūšių ūmaus gaištamumo duomenų gali nebūti. Jei rūšies specifinių ūmaus toksiškumo duomenų nėra, galima atlikti 96 h LC_{50} bandymą su buožgalviais, kurie yra reprezentatyvūs (t. y. yra tos pačios stadijos) bandomiems atliekant AMA. Jei yra duomenų apie kitas vandens gyvūnų rūšis (pvz., žuvų arba kitų varliagyvių rūšių LC_{50} tyrimai), galima profesionaliai spręsti apie galimą MTC įvertį, pagrįstą ekstrapoliavimu tarp rūšių.

18. Arba, jei cheminė medžiaga nėra ūmiai toksiška ir jos tirpumas didesnis kaip 100 mg/l, didžiausia bandymo koncentracija (HTC) reikėtų laikyti 100 mg/l, nes paprastai ši koncentracija laikoma „praktiškai netoksine“.

▼M6

19. Nors ši procedūra nėra rekomenduojama, galima taikyti statinio atnaujinimo metodus, jei pratekamieji metodai netinka MTC gauti. Jei taikomi statinio atnaujinimo metodai, bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos stabilumas turėtų būti dokumentuotas ir atitikti bandymo charakteristikų kriterijų ribas. Rekomenduojami dvidešimt keturių valandų atnaujinimo laikotarpiai. Didesnės nei 72 h trukmės atnaujinimo laikotarpiai nepriimtini. Be to, kiekvieno atnaujinimo laikotarpio pabaigoje prieš pat atnaujinimą reikėtų matuoti vandens kokybės parametrus (pvz., DO, temperatūrą, pH ir kt.).

Bandymo koncentracijų intervalas

20. Turi būti *ne mažiau kaip* trys bandymo koncentracijos vertės ir švaraus vandens kontrolinis bandinys (ir prireikus nešiklio kontrolinis bandinys). Didžiausios ir mažiausios bandymo koncentracijos vertės turėtų skirtis mažiausiai viena eile. Maksimalus skirtumo tarp koncentracijų faktorius yra 0,1, o minimalus – 0,33.

PROCEDŪRA

Bandymo pradžia ir eiga

0 diena

21. Veikti bandomąja medžiaga reikėtų pradėti tada, kai pakankamas pradinės populiacijos buožgalvių skaičius pasiekia 51 vystymosi stadiją pagal Nieuwkoop ir Faber (8), tai yra 17 arba mažiau dienų po apvaisinimo. Norint parinkti bandymo gyvūnus, sveikus ir normalios išvaizdos pradinės populiacijos buožgalvius reikėtų sudėti į vieną indą, kuriame būtų reikiamas tūris skiedimo vandens. Norint nustatyti buožgalvių vystymosi stadiją, juos reikėtų paimti po vieną iš kaupiamojo indo mažu tinklu arba koštuvu ir pernešti į permatomą matavimo kamerą (pvz., 100 mm Petri lėkštelę) su skiedimo vandeniu. Nustatant stadiją pageidautina anestezijos netaikyti, tačiau prieš apžiūrą galima atskirai anestezuoti buožgalvius 100 mg/l trikaino metansulfonatu (pvz., MS-222), tinkamai buferuotu natrio hidrokarbinatu (pH 7,0). Jei anestezija taikoma, pvz., tinkamo MS-222 naudojimo metodika turėtų būti gauta iš patirties turinčių laboratorijų ir pateikta ataskaitoje kartu su bandymo rezultatais. Su pernešamais gyvūnais reikėtų elgtis atsargiai, kad stresas būtų kuo mažesnis ir būtų išvengta sužeidimo.

22. Gyvūnų vystymosi stadija nustatoma naudojant dviejų okuliarų skrodimo mikroskopą. Siekiant sumažinti galutinį vystymosi stadijos kintamumą, svarbu, kad ji būtų nustatyta kuo tiksliau. Pagal Nieuwkoop ir Faber (8), pagrindinis 51 stadijos organizmų vystymosi požymis yra užpakalinių galūnių morfologija. Užpakalinių galūnių morfologinės charakteristikos turėtų būti ištirtos stebint per mikroskopą. Norint gauti išsamią informaciją apie buožgalvių stadijos nustatymą, reikėtų susipažinti su visu Nieuwkoop ir Faber (8) vadovu, tačiau stadiją galima patikimai nustatyti pagal gerai matomus morfologinius požymius. Šią lentelę galima naudoti tam, kad būtų supaprastintas ir standartizuotas per visą tyrimą atliekamas stadijos nustatymo procesas, identifikuojant su skirtingomis stadijomis susijusius gerai matomus morfologinius požymius ir darant prielaidą, kad vystymasis yra normalus.

▼M6

2 lentelė.

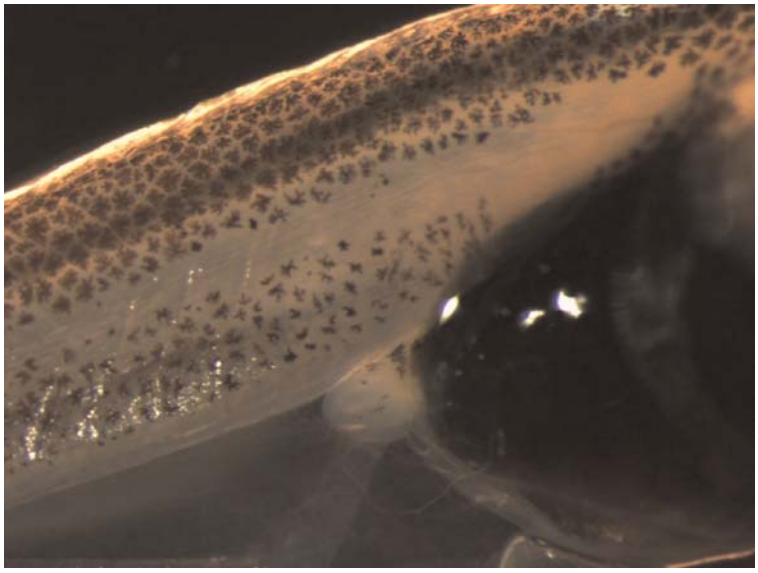
Gerai matomi stadijų nustatymo morfologiniai požymiai, pagrįsti Neuwkoop ir Faber nurodymais

Gerai matomi morfologiniai požymiai	Vystymosi stadija															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Užpakalinė galūnė	X	X	X	X	X	X	X									
Priekinė galūnė						X	X	X	X	X						
Kaukolės ir snukio struktūra										X	X	X	X			
Juslinio nervo morfologija											X	X	X			
Uodegos ilgis													X	X	X	X

23. Visi buožgalviai turėtų būti 51 stadijos, kad būtų galima pradėti bandymą. Geriausiai matomas šios stadijos nustatymo požymis yra 1 paveiksle pavaizduotos užpakalinės galūnės morfologija.

1 paveikslas.

51 stadijos *X. laevis* buožgalvio užpakalinės galūnės morfologija.



24. Be vystymosi stadijos papildomai galima pasirinkti bandymo gyvūnų matmenis. Reikėtų išmatuoti Neuwkoop ir Faber 51 stadijos maždaug 20 buožgalvių poėmio viso kūno ilgį (ne SVL) 0 dieną. Apskaičiavus šios grupės gyvūnų vidutinį viso kūno ilgį, galima nustatyti minimalias ir maksimalias viso kūno ilgio ribas, taikant vidutinės vertės ± 3 mm intervalą (51 stadijos buožgalvių viso kūno ilgio vidutinė vertė yra nuo 24,0 mm iki 28,1 mm). Tačiau vystymosi stadija yra pagrindinis parametras nustatant kiekvieno bandymo gyvūno tinkamumą bandymui. Nereikėtų naudoti buožgalvių, turinčių aiškiai matomų vystymosi defektų arba žaizdų.

▼M6

25. Pirmiau aprašytus stadijos kriterijus atitinkantys buožgalviai laikomi švariame veisimui skirtame vandenyje iki stadijos nustatymo proceso pabaigos. Baigus stadijos nustatymą, lervos atsitiktinai skirstomos tarp veikimo indų tol, kol kiekviename iš jų yra po 20 lervų. Tada kiekvieno veikimo indo gyvūnai apžiūrimi nenormalios išvaizdos gyvūnams nustatyti (pvz., žaizdos, nenormalus plaukimo būdas ir kt.). Akivaizdžiai nesveikai atrodančius buožgalvius reikėtų pašalinti iš veikimo indų ir pakeisti iš naujo atrinktomis lervomis iš kaupiamojo indo.

Stebėjimai

26. Daugiau išsamios informacijos apie bandymo pabaigos procedūras ir buožgalvių apdorojimą pateikta EBPO gairėse apie varliagyvių skydliaukės histologiją (9).

7 dienos matavimai

27. 7 dieną iš kiekvieno bandymo indo kartotinių bandinių paimama po penkis atsitiktinai parinktus buožgalvius. Taikoma atsitiktinė procedūra kiekvienam bandymo organizmui turėtų užtikrinti vienodą parinkimo tikimybę. Tai galima pasiekti taikant kokį nors randomizavimo metodą, bet reikia, kad kiekvienas buožgalvis būtų pagautas tinklu. Neatsirinkti buožgalviai grąžinami į pradinį indą, o atsirinkti buožgalviai humaniškai numarinami nuo 150 iki 200 mg/l, pvz., MS-222, tinkamai buferuotu natrio hidrokarbonatu iki pH 7,0. Numarinti buožgalviai plaunami vandeniu, nusausinami sugeriamuoju popieriumi ir miligramo tikslumu nustatoma jų kūno masė. Nustatomas kiekvieno buožgalvio užpakalinių galūnių ilgis, atstumas nuo snukio iki išeinamosios angos ir vystymosi stadija (naudojant dviejų okuliarų skrodimo mikroskopą).

21 dienos matavimai (bandymo pabaiga)

28. Bandymo pabaigoje (21 diena) likę buožgalviai pašalinami iš bandymo indų ir humaniškai numarinami nuo 150 iki 200 mg/l, pvz., MS-222, tinkamai buferuotu natrio hidrokarbonatu, kaip nurodyta pirmiau. Buožgalviai plaunami vandeniu, nusausinami sugeriamuoju popieriumi ir miligramo tikslumu nustatoma jų kūno masė. Matuojama kiekvieno buožgalvio vystymosi stadija, SVL ir užpakalinių galūnių ilgis.

29. Visos lervos dedamos į Davidson fiksavimo tirpalą nuo 48 iki 72 h, kaip viso kūno ėminiai arba kaip išpjauti galvos audinio ėminiai su apatiniu žandikauliu histologiniam vertinimui atlikti. Iš kiekvieno kartotinio bandinio indo reikėtų paimti iš viso po penkis buožgalvius histopatologiniam tyrimui. Kadangi folikulinių ląstelių aukštis priklauso nuo stadijos (10), tinkamiausias histologinės analizės ėminių ėmimo būdas yra, jei įmanoma, naudoti stadiją atitinkančius individus. Norint parinkti stadiją atitinkančius individus, reikėtų nustatyti visų lervų stadiją prieš atranką ir vėlesnį apdorojimą renkant ir išsaugant duomenis. Tai yra būtina, nes dėl normalių vystymosi skirtumų bus skirtingas pasiskirstymas pagal stadijas kiekviename kartotinio bandinio inde.

30. Histopatologiniam tyrimui parinkti gyvūnai (n = 5 iš kiekvieno kartotinio bandinio indo), jei įmanoma, turėtų būti suderinti su kontrolinio bandinio medianine stadija (jungtinių kartotinių bandinių). Jei kartotinio bandinio inde yra daugiau kaip penkios tinkamos stadijos lervos, atsitiktinai parenkamos penkios lervos.

▼M6

31. Jei kartotinio bandinio inde yra mažiau kaip penkios tinkamos stadijos lervos, reikėtų atsitiktinai parinkti gretimos aukštesnės arba žemesnės vystymosi stadijos individus, kad iš viso vieno kartotinio bandinio imties dydis būtų penkios lervos. Sprendimą dėl papildomų gretimos žemesnės arba aukštesnės vystymosi stadijos lervų paėmimo reikėtų priimti atsižvelgiant į pasiskirstymą pagal stadijas kontroliniuose ir veikimo induose. T. y., jei vystymosi vėlavimas yra susijęs su veikimu chemine medžiaga, reikėtų imti gretimos žemesnės stadijos papildomas lervas. Kita vertus, jei veikimas chemine medžiaga yra susijęs su vystymosi spartėjimu, reikėtų imti gretimos aukštesnės stadijos papildomas lervas.

32. Jei dėl veikimo bandomąja chemine medžiaga įvyksta didelių buožgalvių vystymosi pokyčių, gali nebūti bandomąja medžiaga paveiktų lervų stadijų ir apskaičiuotos kontrolinės medianinės vystymosi stadijos pasiskirstymo sanklotos. Tik šiais atvejais parinkimo procesą reikėtų keisti naudojant stadiją, kuri skiriasi nuo kontrolinės medianinės stadijos, kad skydliaukės histopatologijai naudojamų lervų imtys atitiktų stadiją. Be to, jei stadijos yra neaiškios (t. y. asinchroninės), histologinei analizei turėtų būti atsitiktinai parinkti 5 buožgalviai iš kiekvieno kartotinio bandinio indo. Ataskaitoje reikėtų pagrįsti visų lervų, kurių stadija neatitinka kontrolinės medianinės vystymosi stadijos, imčių ėmimą.

Biologinių vertinamųjų baigčių nustatymas

33. Pagrindinių vertinamųjų baigčių matavimas 21 dienos veikimo laikotarpiu atliekamas 7 ir 21 dieną, tačiau bandymo gyvūnus būtina apžiūrėti kasdien. 3 lentelėje pateikta matavimo vertinamųjų baigčių ir atitinkamų stebėjimo laiko momentų apžvalga. Išsamesnė informacija apie apikalinių vertinamųjų baigčių matavimo ir histologinio vertinimo technines procedūras pateikta EBPO gairėse (9).

3 lentelė.

AMA pagrindinių vertinamųjų baigčių stebėjimo laiko momentai

Apikalinės vertinamosios baigtys	Kasdien	7 diena	21 diena
— Gaištamumas	•		
— Vystymosi stadija		•	•
— Užpakalinių galūnių ilgis		•	•
— Atstumas nuo snukio iki išeinamosios angos		•	•
— Šlapio kūno masė		•	•
— Skydliaukės histologija			•

▼M6

Apikalinės vertinamosios baigtys

34. Vystymosi stadija, užpakalinių galūnių ilgis, SVL ir šlapio kūno masė yra AMA apikalinės vertinamosios baigtys, kurių kiekviena trumpai aptariama toliau. Papildoma techninė informacija apie šių duomenų rinkimą pateikta nurodytose gairėse, įskaitant kompiuterinės analizės procedūras, kurias rekomenduojama taikyti.

Vystymosi stadija

35. *X. laevis* buožgalvių vystymosi stadija nustatoma taikant Nieuwkoop ir Faber stadijų nustatymo kriterijus (8). Vystymosi stadijų duomenys naudojami nustatyti, ar vystymasis yra spartusis, asinchroninis, pavėlavęs ar nepaveiktas. Vystymosi spartėjimas arba vėlavimas nustatomas lyginant kontrolinių bandinių pasiektą medianinę stadiją ir bandomąja medžiaga paveiktų grupių stadiją. Ataskaitoje nurodoma, kad vystymasis yra asinchroninis, kai ištirti atskiro buožgalvio audiniai nėra netaisyklingai suformuoti arba nenormalūs, bet įvairių audinių morfogenezės arba vystymosi santykiniai laiko intervalai yra iškreipti.

Užpakalinių galūnių ilgis

36. Skydliaukės hormonai valdo užpakalinių galūnių diferenciaciją ir augimą, kurie yra pagrindiniai vystymosi požymiai, kurie jau naudojami vystymosi stadijai nustatyti. Užpakalinių galūnių vystymasis naudojamas vystymosi stadijai nustatyti kokybiškai, bet šiame dokumente jis laikomas kiekybine vertinamąja baigtimi. Todėl užpakalinių galūnių ilgis matuojamas kaip vertinamoji baigtis siekiant nustatyti poveikį skydliaukės ašiai (2 paveikslas). Dėl nuoseklumo matuojamas kairiosios užpakalinės galūnės ilgis. Užpakalinių galūnių ilgis įvertinamas 7 ir 21 bandymo dieną. Užpakalinių galūnių ilgio matavimas 7 dieną yra paprastas, kaip pavaizduota 2 paveiksle. Tačiau užpakalinių galūnių ilgio matavimas 21 dieną yra sudėtingesnis dėl galūnės išlinkių. Todėl užpakalinių galūnių ilgį 21 dieną reikėtų pradėti matuoti nuo kūno sienelės ir eiti išilgai galūnės vidurio linijos per visus kampinius nuokrypius. Užpakalinių galūnių ilgio pokyčiai 7 dieną, nors ir nėra akivaizdūs 21 dieną, vis dar laikomi reikšmingais galimo poveikio skydliaukei požymiais. Ilgio matavimo duomenys gaunami iš skaitmeninių fotografijų, naudojant vaizdo analizės programas, kaip aprašyta EBPO gairėse apie varliagyvių skydliaukės histologiją (9).

Kūno ilgis ir šlapio kūno masė

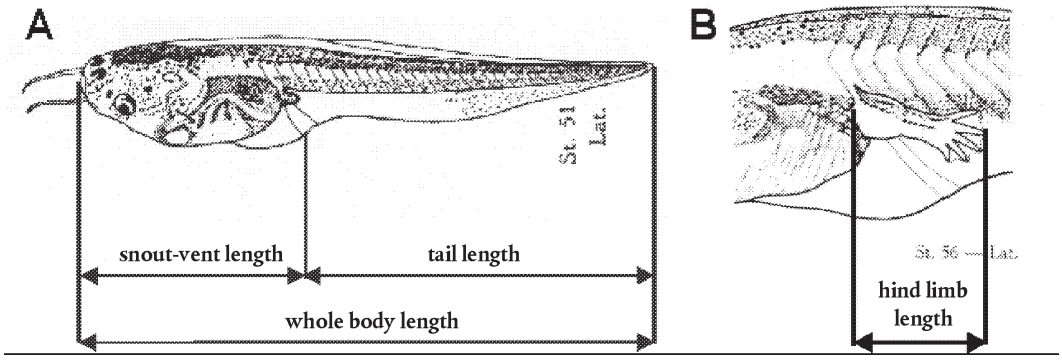
37. Atstumo nuo snukio iki išeinamosios angos (SVL) (2 paveikslas) ir šlapio kūno masės nustatymas įtraukti į bandymo protokolą, siekiant įvertinti bandomosios cheminės medžiagos galimus poveikius buožgalvių augimo spartai palyginti su kontroline grupe, ir yra naudingi nustatant apibendrintąjį bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą. Prilipusio vandens šalinimas matuojant masę buožgalviams gali sukelti streso sąlygas ir gali būti pažeista oda, todėl 7 dieną šie matavimai atliekami su buožgalvių poėmiu, o visi likę buožgalviai matuojami baigus bandymą (21 dieną). Dėl nuoseklumo kaip matavimo galinė riba naudojama išeinamosios angos priekinė pusė.

38. Atstumas nuo snukio iki išeinamosios angos (SVL) naudojamas buožgalvių augimui įvertinti, kaip pavaizduota 2 paveiksle.

▼M6

2 paveikslas.

(A) Kūno ilgio matavimo būdai ir (B) *X. laevis* buožgalvių užpakalinių galūnių ilgio matavimas (1)



Skydliaukės histologija

39. Nors vystymosi stadija ir užpakalinių galūnių ilgis yra svarbios vertinamosios baigtys vertinant su bandomąja medžiaga susijusius metamorfinio vystymosi pokyčius, pats vystymosi vėlavimas negali būti laikomas antitiroidinio veikimo diagnostiniu rodikliu. Kai kuriuos pokyčius galima pastebėti tik atliekant įprastinę histopatologinę analizę. Diagnostinius kriterijus sudaro skydliaukės hipertrofija ir atrofija, folikulinių ląstelių hipertrofija, folikulinių ląstelių hiperplazija ir kaip papildomi kokybiniai kriterijai: folikulo ertmės plotas, koloido kokybė ir folikulinių ląstelių aukštis ar forma. Ataskaitoje reikėtų pateikti sunkumo laipsnius (4 laipsniai). Informacija apie histologinės analizės ėminių gavimą ir apdorojimą bei audinių ėminių histologinės analizės atlikimą pateikta: „Varliagyvių metamorfozės tyrimas. 1 dalis. Morfologinių ėminių ėmimo ir histologinių preparatų gavimo techninis vadovas“ ir „Varliagyvių metamorfozės tyrimas. 2 dalis. Tyrimų rezultatų aiškinimas, diagnostiniai kriterijai, sunkumo klasifikavimas ir atlasas“ (9). Laboratorijos, prieš pradėdamos skydliaukės histologinę analizę ir įvertinimą ir atliekančios tyrimą pirmą kartą, mokymosi tikslais turėtų klausti patyrusių patologų patarimo. Dėl akivaizdžių ir reikšmingų apikalinių vertinamųjų baigčių pokyčių, rodančių vystymosi spartėjimą ar asinchroniškumą, gali nebereikti atlikti skydliaukės histopatologinės analizės. Tačiau akivaizdžių morfologinių pokyčių nebuvimas arba vystymosi vėlavimo įrodymai patvirtina histologinės analizės būtinumą.

Gaištamumas

40. Visi bandymo indai turėtų būti kasdien tikrinami ieškant žuvusių buožgalvių ir jų skaičius užrašomas kiekvienam indui atskirai. Radus negyvų buožgalvių, reikėtų užrašyti datą, koncentraciją ir indo numerį. Negyvi gyvūnai turėtų būti pašalinti iš bandymo indo kai tik jie pastebimi. Didesnis kaip 10 % gaištamumas gali rodyti netinkamas bandymo sąlygas arba bandomosios cheminės medžiagos toksinį poveikį.

Papildomi stebėjimai

41. Reikėtų užrašyti neįprasto elgesio atvejus ir aiškiai matomus vystymosi defektus bei sužalojimus. Reikėtų užrašyti datą, koncentraciją ir indo numerį, pastebėjus neįprastą elgesį, aiškius vystymosi defektus arba sužalojimus. Normalus elgesys apibūdinamas tuo, kad į vandens sluoksnį įleistų buožgalvių uodega yra aukščiau galvos, jie reguliariai ir ritmiškai ja suduoda, periodiškai pakyla į paviršių, judina žiaunų dangtelį ir atsako į dirgiklius. Nenormalaus elgesio požymiai būtų, pvz., plūduriavimas paviršiuje, gulėjimas indo dugne, aukštielninkas arba nereguliarus plaukimas, retas pakilimas į paviršių ir atsako į dirgiklius nebuvimas. Be to, reikėtų užrašyti, jei skirtinguose veikimo induose pastebima didelių maisto suvartojimo skirtumų. Be kita ko, prie didelių vystymosi defektų ir sužeidimų

▼M6

būtų galima priskirti morfologinius išsigimimus (pvz., galūnių deformaciją), kraujuojančias žaizdas, bakterinę arba grybelinę infekciją. Šie požymiai yra kokybiniai ir juos reikėtų laikyti panašiais klinikiniams ligos ar streso požymiams ir lyginti su kontroliniais gyvūnais. Jei reiškiniai arba jų dažnumas yra didesnis induose su chemine medžiaga nei kontroliniuose induose, juos reikėtų aiškinti kaip aiškaus toksiškumo įrodymą.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Duomenų rinkimas

42. Visus duomenis reikėtų rinkti naudojant elektronines arba rankines sistemas, kurios atitinka gerą laboratorinę praktiką (GLP). Tyrimo duomenis turėtų sudaryti:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— bandomosios cheminės medžiagos apibūdinimas: fizikinės ir cheminės savybės; informacija apie stabilumą ir biologinį skaidumą;

— cheminė informacija ir duomenys: tirpalų ruošimo metodas ir dažnumas. Informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą sudaro bandomosios cheminės medžiagos ir, jei tinka kai kuriais atvejais, ne pradinės cheminės medžiagos faktinės ir nominaliosios koncentracijos vertės. Gali tekti atlikti bandomosios cheminės medžiagos pradinių tirpalų ir bandymo tirpalų matavimus;

— tirpiklis (jei ne vanduo): tirpiklio pasirinkimo pagrindimas ir tirpiklio apibūdinimas (tipas, naudota koncentracija);

Bandymo sąlygos:

— darbo eigos duomenys: juos sudaro pastebėjimai apie bandymo sistemos veikimą, jos aplinką ir infrastruktūrą. Tipinius duomenis sudaro: aplinkos temperatūros, bandymo temperatūros, dienos šviesos trukmės, svarbių poveikio sistemos komponentų būklės (pvz., siurblių, ciklų skaitiklių, slėgio vertės), srautų, vandens lygių, pradinių tirpalų butelių keitimo ir maitinimo duomenys. Bendruosius vandens kokybės parametrus sudaro: pH, ištirpęs deguonis, laidis, suminis jodo kiekis, šarmingumas ir kietumas;

— nukrypimai nuo bandymo metodo: šią informaciją turėtų sudaryti visa informacija arba išsamūs visų nukrypimų nuo bandymo metodo aprašymai;

Rezultatai:

— biologiniai stebėjimai ir duomenys: juos sudaro kasdieniai gaištamumo, maisto suvartojimo, nenormalaus plaukimo elgesio, apsnūdimo, pusiausvyros praradimo, defektų, sužeidimų ir kt. duomenys. Stebėjimus ir duomenis, surinktus iš anksto nustatytais intervalais, sudaro: vystymosi stadija, užpakalinių galūnių ilgis, atstumas nuo snukio iki išeinamosios angos ir šlapio kūno masė;

▼M6

— statistinės analizės metodai ir taikytų metodų pagrindimas; statistinės analizės rezultatai, pageidautina, lentelių pavidalu;

— histologiniai duomenys: juos sudaro išsamūs aprašymai, taip pat specifinių stebėjimo duomenų sunkumo klasė ir dažnumo balas, kaip išsamiai aprašyta rekomendaciniame histopatologijos dokumente;

— ad hoc stebėjimai: šie stebėjimai turėtų apimti aprašomojo pobūdžio tyrimo aprašymus, kurių negalima priskirti pirmiau nurodytoms kategorijoms.

Duomenų pateikimas ataskaitoje

43. 2 priedėlyje pateiktos lentelinės skaičiuoklės kiekvienos dienos duomenims rinkti, kurias galima naudoti kaip neapdorotų duomenų įvesties ir visuminių statistinių duomenų skaičiavimo rekomendacijas. Be to, pateiktos ataskaitų rengimo lentelės, kurios yra patogus vertinamųjų baigčių duomenų santraukos pateikimo būdas. Histologinio vertinimo ataskaitų lentelės pateiktos 2 priedėlyje.

Bandymo charakteristikų kriterijai ir jo priimtinumas ar tinkamumas

44. Paprastai, jei yra didelių nukrypimų nuo bandymo metodo, gauti duomenys yra nepakankamai priimtini, kad juos būtų galima aiškinti arba pateikti ataskaitoje. Todėl buvo sukurti šie 4 lentelėje pateikti kriterijai kaip rekomendacijos nustatant atliekamo bandymo kokybę ir bendrąsias kontrolinių organizmų charakteristikas.

4 lentelė.

AMA charakteristikų kriterijai

Kriterijus	Priimtinos ribos
Bandymo koncentracijos vertės	Variacijos koeficientas (CV) yra ≤ 20 % (išmatuotos bandymo koncentracijos kintamumas) 21 dienos bandymo laikotarpiu
Kontrolinio bandinio gyvūnų gaištamumas	≤ 10 %, bet kurio kartotinio kontrolinio bandinio indo gyvūnų gaištamumas neturėtų būti didesnis kaip 2 buožgalviai
Minimali medianinė kontrolinės grupės gyvūnų vystymosi stadija bandymo pabaigoje	57
Kontrolinės grupės gyvūnų vystymosi stadijos sklaida	Vystymosi stadijų skirstinio 10-oji ir 90-oji procentilės neturėtų skirtis daugiau kaip 4 stadijomis
Ištirpusio deguonies koncentracija	≥ 40 % soties ore (*)
pH	pH turėtų būti 6,5–8,5. Skirtumas tarp vienos bandomosios grupės kartotinių bandinių ir tarp bandomųjų grupių neturėtų būti didesnis kaip 0,5
Vandens temperatūra	22° ± 1 °C, skirtumas tarp vienos bandomosios grupės kartotinių bandinių ir tarp bandomųjų grupių neturėtų būti didesnis kaip 0,5 °C
Bandymo koncentracijos vertės, kurioms negaunama aiškaus toksiškumo	≥ 2
Kartotinių bandinių charakteristikos	≤ 2 kartotiniai bandiniai gali neatitikti reikalavimų per visą tyrimą

▼M6

Kriterijus	Priimtinos ribos
Specialiosios tirpiklio naudojimo sąlygos	Jei kaip nešiklis naudojamas tirpiklis, reikėtų naudoti tirpiklio kontrolinius bandinius ir švaraus vandens kontrolinius bandinius, o rezultatus pateikti ataskaitoje
	Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tirpiklio kontrolinių bandinių ir švaraus vandens kontrolinių bandinių grupių apdorojami specialiu būdu. Daugiau informacijos pateikta toliau
Specialiosios statinio atnaujinimo sistemos sąlygos	Ataskaitoje reikėtų pateikti reprezentatyvios cheminės analizės prieš atnaujinimą ir po jo duomenis
	Amoniako koncentracija turėtų būti matuojama prieš pat atnaujinimą
	Visi vandens kokybės parametrai, išvardyti 1 priedėlio 1 lentelėje, turėtų būti matuojami prieš pat atnaujinimą
	Atnaujinimo laikotarpio trukmė neturėtų būti didesnė kaip 72 h
	Reikiamas maitinimo grafikas (50 % dienos normos sudaro prekyboje esantis buožgalvių maistas)

(*) Vandens aeravimą gali užtikrinti barboteriai. Barboterius rekomenduojama įrengti tokiame lygyje, kad jie nesukeltų buožgalviams nereikalingo streso.

Tyrimo tinkamumas

45. Tyrimas turėtų atitikti šiuos reikalavimus, kad jis galėtų būti laikomas priimtinu ar tinkamu:

Tinkamas tyrimo bandymas, kuriuo nustatomas neigiamas cheminės medžiagos poveikis skydliaukės veiklai:

(1) bet kurios bandomosios grupės (įskaitant jos kontrolinius bandinius) buožgalvių gaištamumas negali būti didesnis kaip 10 %; bet kuriame kartotinio bandinio inde buožgalvių gaištamumas negali būti didesnis kaip trys buožgalviai, priešingu atveju laikoma, kad kartotinis bandinys neatitinka reikalavimų;

(2) analizei turėtų būti pateikti ne mažiau kaip dviejų bandomųjų grupių visi keturi reikalavimus atitinkantys kartotiniai bandiniai;

(3) analizei turėtų būti pateikti ne mažiau kaip dviejų bandomųjų grupių, kurių atveju nestebimas aiškus toksiškumas, bandiniai.

Tinkamas tyrimo bandymas, kuriuo nustatomas teigiamas cheminės medžiagos poveikis skydliaukės veiklai:

(1) kontrolinės grupės gaištamumas gali būti ne didesnis kaip du buožgalviai vienam kontroliniam bandiniui.

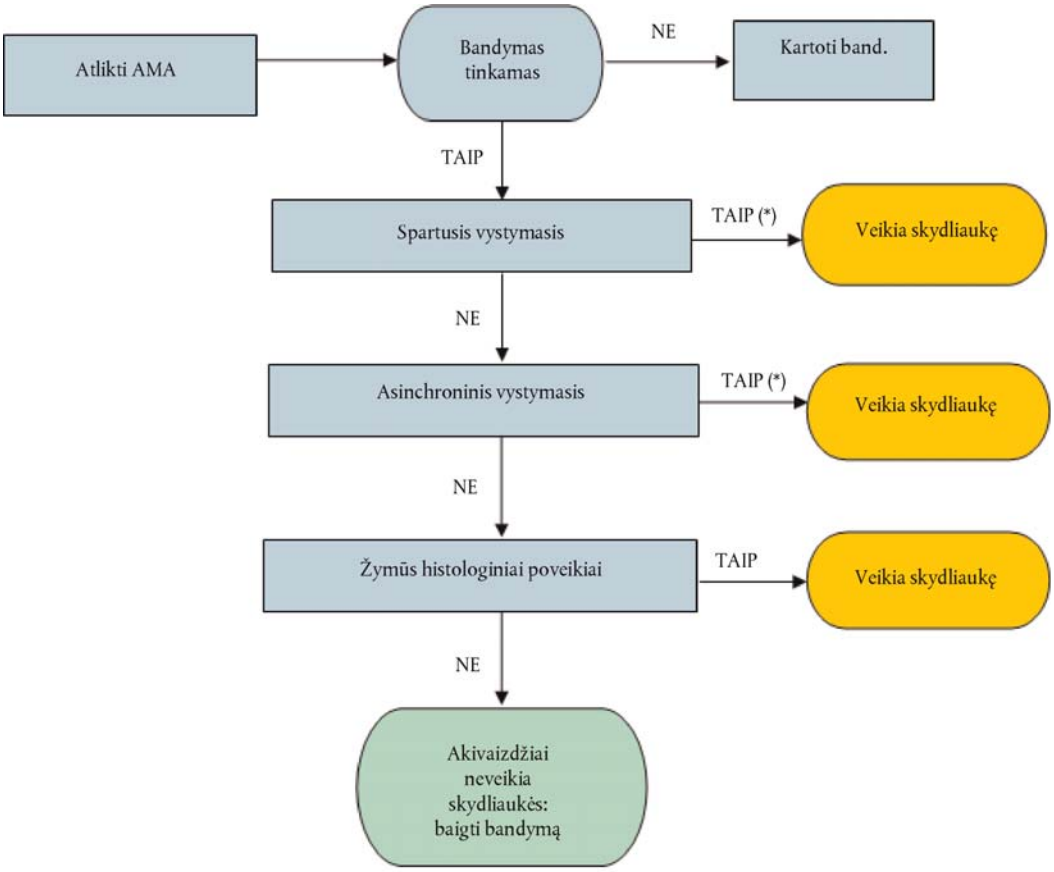
Sprendimo atlikti AMA priėmimo loginė schema

46. Buvo sukurta sprendimo atlikti AMA priėmimo loginė schema, kurioje būtų pateikti biologinio tyrimo atlikimo ir jo rezultatų aiškinimo loginiai veiksmai (žr. 3 paveikslo schemą). Iš esmės pagal sprendimo priėmimo loginę schemą didesnis svoris tenka sparčiojo vystymosi, asinchroninio vystymosi ir skydliaukės histopatologijos vertinamosioms baigtims, o vėluojančio vystymosi, atstumo nuo snukio iki išeinamosios angos ir šlapio kūno masės parametrams, kuriems įtakos gali turėti bendras toksiškumas, tenka mažesnis svoris.

▼M6

3 paveikslas.

Sprendimo atlikti AMA priėmimo loginė schema



(*) Nežiūrint į reikšmingus sparčiojo ir asinchroninio vystymosi skirtumus, kai kurios reguliavimo institucijos gali pareikalauti, kad būtų atlikta histologijos analizė. Šį tyrimą atliekanti įstaiga prieš tyrimo pradžią raginama tartis su kompetentingomis institucijomis, kad būtų nustatytos reikiamos vertinamosios baigtys.

Spartusis vystymasis (nustatytas taikant vystymosi stadiją, SVL ir HLL)

47. Žinoma, kad spartųjį vystymąsi sukelia tik su skydliaukės hormonais susiję poveikiai. Tai gali būti periferinių audinių poveikiai, pvz., tiesioginė sąveika su skydliaukės hormonų receptoriais (pvz., su T4), arba poveikiai, kurie keičia cirkuliuojančių skydliaukės hormonų koncentraciją. Abiem atvejais tai laikoma pakankamu įrodymu, kad cheminė medžiaga daro įtaką skydliaukės veiklai. Spartusis vystymasis vertinamas vienu iš dviejų būdų. Pagal pirmąjį, taikant standartizuotą metodą, išsamiai aprašytą Nieuwkoop ir Faber (8) galima įvertinti bendrąją vystymosi stadiją. Taikant antrąjį, galima kiekybiškai įvertinti specifines morfologines savybes, pvz., užpakalinių galūnių ilgį 7 ir 21 dieną, kuris yra teigiamai susijęs su skydliaukės hormonų receptoriaus agonistiniais poveikiais. Jei statistiškai reikšmingai pailgėja užpakalinė galūnė, bandymas rodo, kad cheminė medžiaga daro įtaką skydliaukės veiklai.

▼M6

48. Gyvūnų spartesnio vystymosi, palyginti su kontroline populiacija, bandymo įvertinimas bus pagrįstas šių keturių vertinamųjų baigčių statistinės analizės rezultatais:

— užpakalinės galūnės ilgio (normalizuotu SVL atžvilgiu) 7 tyrimo dieną;

— užpakalinės galūnės ilgio (normalizuotu SVL atžvilgiu) 21 tyrimo dieną;

— vystymosi stadijos 7 tyrimo dieną;

— vystymosi stadijos 21 tyrimo dieną.

49. Užpakalinių galūnių ilgio statistinė analizė turėtų būti atliekama matuojant kairiąją užpakalinę galūnę. Užpakalinės galūnės ilgis normalizuojamas, imant gyvūno užpakalinės galūnės ilgio ir atstumo nuo snukio iki išeinamosios angos santykį. Lyginamas kiekvienai bandomajai grupei gautų normalizuotų verčių vidurkis. Vystymosi spartėjimą rodo chemine medžiaga paveiktos grupės reikšmingas (normalizuoto) vidutinio užpakalinės galūnės ilgio padidėjimas 7 ir (arba) 21 tyrimo dieną, palyginti su kontroline grupe (žr. 3 priedėlį).

50. Vystymosi stadijos statistinę analizę reikėtų atlikti nustatant vystymosi stadijas pagal Nieuwkoop ir Faber aprašytus morfologinius kriterijus (8). Vystymosi spartėjimą rodo tai, kad, atliekant daugybinės dichotomijos analizę, 7 ir (arba) 21 tyrimo dieną aptinkamas reikšmingas bandomosios grupės vystymosi stadijos verčių padidėjimas, palyginti su kontroline grupe.

51. AMA bandymo metodu nustatytas reikšmingas poveikis vienai iš pirmiau išvardytų keturių vertinamųjų baigčių laikomas pakankamu, kad būtų galima padaryti teigiamą išvadą dėl sparčiojo vystymosi. Tai reiškia, kad, nustačius reikšmingą poveikį užpakalinės galūnės ilgiui tam tikru laiko momentu, jo nereikia patvirtinti reikšmingais poveikiais užpakalinės galūnės ilgiui kitu laiko momentu arba reikšmingais poveikiais vystymosi stadijai tuo pačiu laiko momentu. Kita vertus, nustačius reikšmingą poveikį vystymosi stadijai tam tikru laiko momentu, jo nereikia patvirtinti reikšmingais poveikiais vystymosi stadijai kitu laiko momentu arba reikšmingais poveikiais užpakalinės galūnės ilgiui tuo pačiu laiko momentu. Visgi sparčiojo vystymosi įrodymo galia padidėtų, jei reikšmingi poveikiai būtų aptikti daugiau kaip vienai vertinamajai baigčiai.

Asinchroninis vystymasis (nustatytas taikant vystymosi stadijos kriterijus)

52. Asinchroninis vystymasis apibūdinamas morfogenezės santykiniu laikiniu poslinkiu arba to paties buožgalvio skirtingų audinių vystymusi. Negalėjimas aiškiai nustatyti organizmo vystymosi stadijos pagal jai būdingomis laikomų morfologinių vertinamųjų baigčių rinkinį, rodo, kad vykstant metamorfozei audiniai vystosi asinchroniškai. Asinchroninis vystymasis yra poveikio skydliaukei rodiklis. Vienintelis žinomas asinchroninį vystymąsi sukeliantis veikimo būdas yra cheminių medžiagų poveikis periferiniam skydliaukės hormonų veikimui ir (arba) skydliaukės hormonų metabolizmui besivystančiuose audiniuose, pvz., stebimas pagal dejodinazės inhibitorius.

▼**M6**

53. Bandymo gyvūnų asinchroninio vystymosi, palyginti su kontroline populiacija, įvertinimas pagrįstas bandymo gyvūnų makroskopinės morfologijos vertinimu 7 ir 21 tyrimo dieną.

54. Nieuwkoop ir Faber pateiktas *Xenopus laevis* normalaus vystymosi aprašymas (8) yra normalios audinių rekonstrukcijos sekos identifikavimo schema. Terminas „asinchroninis vystymasis“ taikomas konkrečiai tiems buožgalvių makroskopinės morfologijos vystymosi nukrypimams, kurie neleidžia vienareikšmiškai nustatyti vystymosi stadijos pagal Nieuwkoop ir Faber kriterijus (8), nes pagrindiniai morfologiniai požymiai rodo skirtingų stadijų charakteristikas.

55. Taikant terminą „asinchroninis vystymasis“ turima omenyje, kad reikėtų atsižvelgti tik į tam tikrų audinių rekonstrukcijos eigos nukrypimus, palyginti su kitų audinių rekonstrukcijos eiga. Kai kuriuos klasikinius fenotipus sudaro priekinių galūnių atsiradimo vėlavimas arba jų nebuvimas nepaisant normalaus arba sparčiojo užpakalinių galūnių ir uodegos audinių vystymosi, arba priešlaikinė žiaunų rezorbcija užpakalinių galūnių morfogenezės stadijos ir uodegos rezorbcijos atžvilgiu. Gyvūno vystymasis užrašomas kaip asinchroninis, jei neįmanoma priskirti vystymosi stadijos, nes gyvūnas neatitinka tam tikros Niewkoop ir Faber stadijos (8) daugumos reikšmingų vystymosi kriterijų arba jei ypač vėluoja arba sparčiai vystosi vienas arba keli pagrindiniai elementai (pvz., uodega visiškai rezorbuota, bet priekinės galūnės nepasirodė). Atliekamas kokybinis vertinimas ir reikėtų ištirti visą grupę Nieuwkoop ir Faber išvardytų reikšmingų elementų (8). Tačiau nebūtina užrašyti stebimų gyvūnų įvairių reikšmingų elementų vystymosi būsenos. Gyvūnai, kurie registruojami kaip asinchroninio vystymosi gyvūnai, Nieuwkoop ir Faber (8) vystymosi stadijai nepriskiriami.

56. Taigi esminis kriterijus, pagal kurį nenormalaus morfologinio vystymosi atvejai priskiriami asinchroniniam vystymuisi, yra tai, kad įvyksta audinių rekonstrukcijos ir audinių morfogenezės santykinis laiko poslinkis, o paveiktų audinių morfologija nėra aiškiai nenormali. Vienas šio makroskopinių morfologinių defektų aiškinimo pavyzdys yra pavėluota užpakalinių galūnių morfogenezė kitų audinių vystymosi atžvilgiu, kuri atitinka „asinchroninio vystymosi“ kriterijų, bet užpakalinių galūnių nebuvimas, pirštų defektai (pvz., ektrodaktilija, polidaktilija) arba kiti aiškūs galūnių defektai neturėtų būti laikomi asinchroniniu vystymusi.

57. Atsižvelgiant į tai, pagrindinius morfologinius kriterijus, kurių suderintą metamorfozę reikėtų įvertinti, turėtų sudaryti užpakalinių galūnių morfogenezė, priekinių galūnių morfogenezė, priekinių galūnių atsiradimas, uodegos rezorbcijos stadija (ypač uodeginio peleko rezorbcijos) ir galvos morfologija (pvz., žiaunų dydis ir žiaunų rezorbcijos stadija, apatinio žandikaulio morfologija, Meckel kremzlės išsikišimas).

58. Atsižvelgiant į cheminės medžiagos veikimo būdą, gali pasitaikyti skirtingų makroskopinių morfologinių fenotipų. Kai kuriuos klasikinius fenotipus sudaro priekinės galūnės atsiradimo vėlavimas arba jos nebuvimas nepaisant normalaus ar sparčiojo užpakalinių galūnių ir uodegos audinių vystymosi, priešlaikinė žiaunų rezorbcija palyginti su užpakalinių galūnių ir uodegos rekonstrukcija.

▼M6

Histopatologija

59. Jei cheminė medžiaga nesukelia aiškaus toksiškumo, nepaspartina vystymosi arba nesukelia asinchroninio vystymosi, įvertinama skydliaukių histopatologija naudojantis atitinkamomis gairėmis (9). Vystymosi vėlavimas nesant toksiškumo yra žymus antitiroidinio veikimo rodiklis, bet vystymosi stadijos analizė yra mažiau jautri ir mažiau tinka diagnozei nei skydliaukės histopatologinė analizė. Todėl šiuo atveju reikia atlikti skydliaukių histopatologinę analizę. Poveikis skydliaukės histologijai buvo įrodytas nesant poveikio vystymuisi. Jei yra skydliaukės histopatologijos pokyčių, laikoma, kad cheminė medžiaga veikia skydliaukę. Jei skydliaukių vystymosi vėlavimo arba histologinių pažeidimų nėra, laikoma, kad cheminė medžiaga skydliaukės neveikia. Šis sprendimas pagrįstas tuo, kad skydliaukę veikia TSH (skydliaukės stimuliavimo hormonas), todėl bet kuri cheminė medžiaga, kuri pakeičia skydliaukės hormonų cirkuliaciją taip, kad pasikeičia TSH išsiskyrimas, sukels jos histopatologinius pokyčius. Skydliaukės hormonų cirkuliaciją gali pakeisti įvairūs veikimo būdai ir mechanizmai. Taigi, nors skydliaukės hormonų lygis rodo su skydliauke susijusį poveikį, šio lygio nepakanka, kad būtų nustatyta, kuris veikimo būdas ar mechanizmas yra susijęs su atsaku.

60. Kadangi šiai vertinamajai baigčiai neįmanoma pritaikyti pagrindinių statistinių metodų, poveikį, susijusį su veikimu bandomąja chemine medžiaga, įvertina patologas.

Vėluojantis vystymasis (nustatytas taikant vystymosi stadiją, HLL, kūno masę, SVL)

61. Vystymasis gali vėluoti dėl antitiroidinių mechanizmų ir dėl netiesioginio toksiškumo. Nedidelis vėlavimas kartu su aiškiais toksiškumo požymiais gali rodyti nespecifinį toksinį poveikį. Su skydliauke nesusijusio toksiškumo įvertinimas yra esminis bandymo elementas, kuris mažina klaidingų teigiamų rezultatų tikimybę. Per didelis gaištamumas yra akivaizdus įrodymas, kad pasireiškia kiti toksiškumo mechanizmai. Panašiai nedidelis augimo sulėtėjimas, nustatytas pagal šlapio kūno masę ir (arba) SVL, taip pat leidžia daryti prielaidą, kad daromas toksinis poveikis, nesusijęs su skydliauke. Akivaizdus augimo spartėjimas stebimas tų cheminių medžiagų, kurios neigiamai veikia normalų vystymąsi, atveju. Taigi didesnių gyvūnų buvimas nebūtinai rodo su skydliauke nesusijusį toksiškumą. Tačiau nustatant su skydliauke susijusį toksiškumą niekuomet nereikėtų remtis vien tik augimu. Poveikis skydliaukei turėtų būti nustatomas augimo duomenis derinant kartu su vystymosi stadija ir skydliaukės histopatologija. Nustatant aiškų toksiškumą taip pat reikėtų atsižvelgti į kitas vertinamąsias baigtis, įskaitant edemą, kraujuojančias žaizdas, mieguistumą, mažesnį maisto suvartojimą, netvarkingą ar pakitusį plaukimą ir kt. Jei visoms koncentracijos vertėms matomi aiškaus toksiškumo požymiai, bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti iš naujo bandoma esant mažesnei koncentracijai prieš nustatant, ar cheminė medžiaga gali veikti skydliaukę ar jos neveikia.

62. Statistiškai reikšmingas vystymosi vėlavimas, nesant kitų aiškaus toksiškumo požymių, rodo, kad cheminė medžiaga veikia skydliaukę (yra antagonistas). Nesant aiškių statistinių atsakų, šį rezultatą gali patvirtinti skydliaukės histopatologijos rezultatai.

▼M6

Statistinė analizė

63. Statistinė duomenų analizė turėtų būti atliekama pagal procedūras, aprašytas dokumente *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application (11)*. Visoms tolydžiosioms kiekybinėms vertinamosioms baigtims (HLL, SVL, šlapio kūno masė), kurios atitinka monotonišką dozės ir atsako priklausomybę, reikėtų taikyti Jonckheere-Terpstra kriterijų mažėjimo tvarka, kad būtų nustatytas reikšmingas veikimo bandomąja chemine medžiaga poveikis.

64. Jei tolydžiųjų vertinamųjų baigčių atveju dozės ir atsako priklausomybė nėra monotoniška, reikėtų įvertinti duomenų normalumą (pageidautina taikant Shapiro-Wilk ar Anderson-Darling kriterijų) ir sklaidos homogeniškumą (pageidautina, taikant Levene kriterijų). Abiem atvejais tikrinama atliekant ANOVA liekanų analizę. Vietoj šių oficialių normalumo ir sklaidos homogeniškumo tikrinimų galima klausti ekspertų nuomonės, tačiau pirmenybė teikiama oficialiems tikrinimams. Jei nustatomas nenormalumas arba sklaidos heterogeniškumas, reikėtų ieškoti normalizuojančios ir sklaidą stabilizuojančios transformacijos būdo. Jei duomenys (galbūt po transformacijos) pasiskirsto normaliai ir sklaida yra homogeniška, reikšmingas veikimo bandomąja medžiaga poveikis nustatomas taikant Dunnett kriterijų. Jei duomenų (galbūt po transformacijos) pasiskirstymas yra normalus, bet sklaida yra heterogeniška, reikšmingas veikimo bandomąja medžiaga poveikis nustatomas taikant Tamhane-Dunnett ar T3 kriterijų arba Mann-Whitney-Wilcoxon U kriterijų. Jei normalizavimo transformacijos neįmanoma rasti, reikšmingas veikimo bandomąja medžiaga poveikis nustatomas pagal Mann-Whitney-Wilcoxon U kriterijų, naudojant Bonferroni-Holm p verčių pataisą. Dunnett kriterijus taikomas nepriklausomai nuo ANOVA F kriterijaus, o Mann-Whitney kriterijus taikomas nepriklausomai nuo visuminio Kruskall-Wallis kriterijaus.

65. Reikšmingo gaištamumo nesitikima, tačiau jį reikėtų įvertinti taikant Cochran-Armitage kriterijų mažėjimo tvarka, jei duomenys atitinka monotonišką dozės ir atsako priklausomybę, priešingu atveju – pagal Fisher tikslųjį kriterijų su Bonferroni-Holm pataisa.

66. Reikšmingas veikimo bandomąja medžiaga poveikis vystymosi stadijai nustatomas mažėjimo tvarka taikant Jonckheere-Terpstra kriterijų, kuris būtų taikomas kartotinių bandinių medianinėms vertėms. Kaip alternatyvą ir kaip pageidautiną metodą poveikiui nustatyti, reikėtų taikyti daugybinės dichotomijos Jonckheere kriterijų rezultatams nuo 20-osios iki 80-osios procentilės, nes jį taikant atsižvelgiama į pasiskirstymo profilio pokyčius.

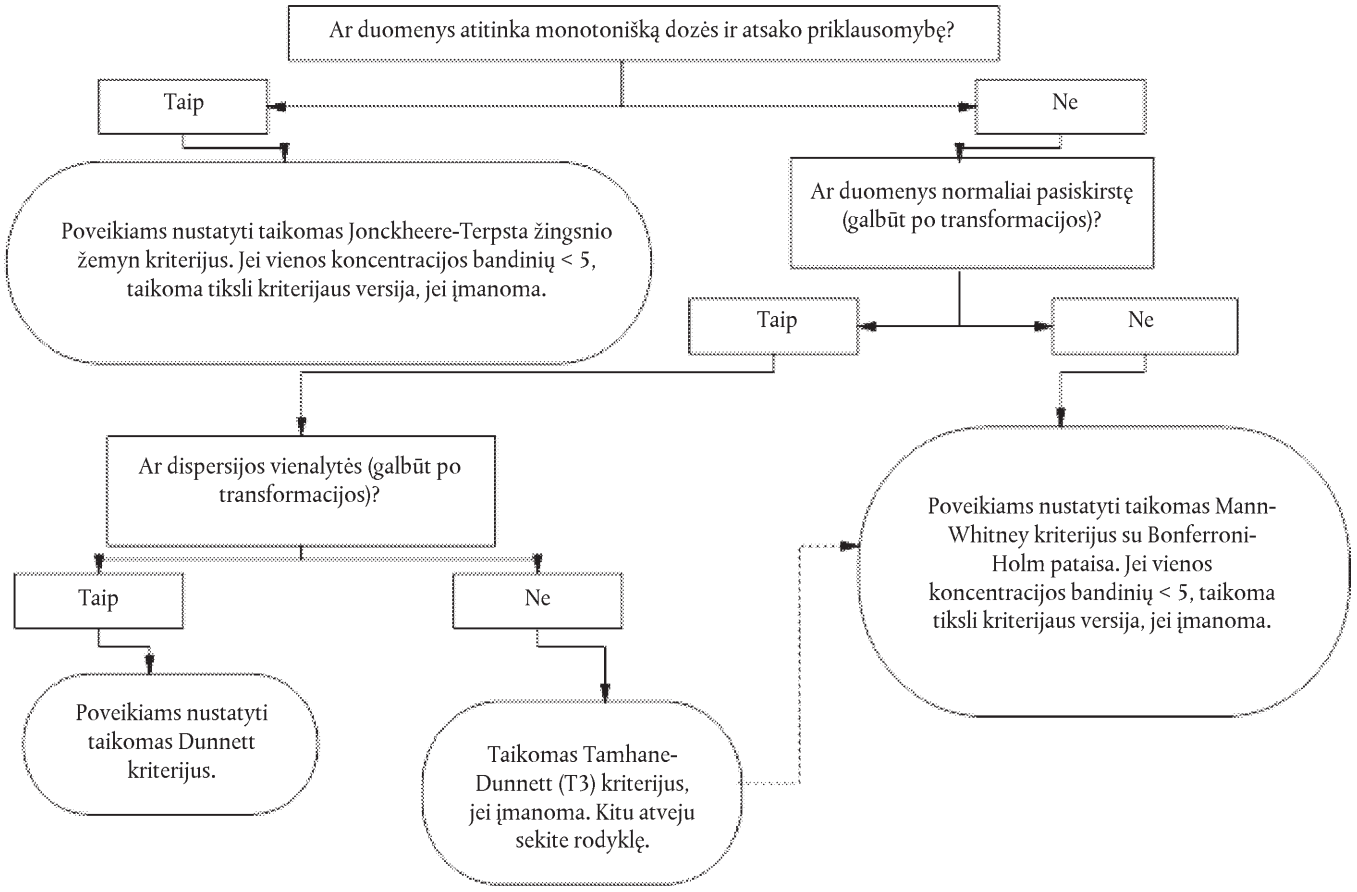
67. Tinkamas analizės vienetas yra kartotinis bandinys, todėl duomenis sudaro kartotinių bandinių medianos, jei taikomas Jonckheere-Terpstra ar Mann-Whitney U kriterijus, arba kartotinių bandinių vidurkiai, jei taikomas Dunnett kriterijus. Dozės ir atsako priklausomybės monotoniškumą galima įvertinti vizualiai pagal kartotinių bandinių ir bandomųjų koncentracijų vidurkius ar medianas arba pagal pirmiau aprašytus oficialius kriterijus (11). Jei iš kiekvienos bandomosios ar kontrolinės grupės gaunami mažiau negu penki kartotiniai bandiniai, reikėtų taikyti tikslias Jonckheere-Terpstra ir Mann-Whitney kriterijų randomizavimo versijas, jei yra. Visų nurodytų kriterijų statistinis reikšmingumo lygmuo yra 0,05.

68. 4 paveiksle pateikta tolydžiųjų duomenų statistinių kriterijų taikymo schema.

▼M6

4 paveikslas.

Statistinių metodų taikymo tolydžiojo atsako duomenims schema



▼M6

Specialieji duomenų analizės aspektai

Reikalavimų neatitinkančių bandomųjų grupių naudojimas

69. Sprendžiant, ar kurio nors kartotinio bandinio arba visos bandomosios grupės gyvūnai rodo aiškius toksiškumo požymius ir juos reikėtų pašalinti iš analizės, atsižvelgiama į kelis veiksnius. Aiškus bet kurio kartotinio bandinio toksiškumas apibrėžiamas kaip > 2 gaištamumas, kurį galima paaiškinti toksiškumu, bet ne technine klaida. Kitus aiškaus toksiškumo požymius sudaro kraujavimas, nenormalus elgesys, nenormalūs plaukimo judesiai, nevalgumas ir visi kiti klinikiniai ligos požymiai. Gali prireikti kokybinio subletalių toksiškumo požymių įvertinimo ir jį reikėtų atlikti lyginant su švaraus vandens kontrolinėmis grupėmis.

Tirpiklio kontroliniai bandiniai

70. Tirpiklio naudojimas turėtų būti laikomas kraštutine priemone, kai yra išnagrinėtos visos kitos veikimo chemine medžiaga galimybės. Jei naudojamas tirpiklis, kartu turėtų būti naudojamas švaraus vandens kontrolinis bandinys. Baigus bandymą reikėtų įvertinti galimą tirpiklio poveikį. Tai daroma atliekant statistinį tirpiklio kontrolinės grupės ir švaraus vandens kontrolinės grupės palyginimą. Tinkamiausios šios analizės vertinamosios baigtys, į kurias reikėtų atsižvelgti, yra vystymosi stadija, SVL ir šlapio kūno masė, nes jie gali būti paveikti net jei bandomoji medžiaga ir nėra toksiška skydliaukei. Jei tarp tirpiklio kontrolinės grupės ir švaraus vandens kontrolinės grupės vertinamųjų baigčių aptinkamas statistiškai reikšmingas skirtumas, tyrimo atsako vertinamosios baigtys nustatomos atsižvelgiant į švaraus vandens kontrolinę grupę. Jei tarp visų išmatuotų švaraus vandens kontrolinės grupės ir tirpiklio kontrolinės grupės atsako kintamųjų statistiškai reikšmingo skirtumo nėra, tyrimo atsako vertinamosios baigtys nustatomos naudojant jungtinius skiedimo vandens ir tirpiklio kontrolinių grupių duomenis.

Bandomosios grupės, kurios pasiekia 60 ir vėlesnę vystymosi stadiją

71. Po 60 stadijos dėl audinių rezorbcijos ir absoliučiojo vandens kiekio sumažėjimo mažėja buožgalvių dydis ir masė. Taigi šlapio kūno masės ir SVL matavimų negalima tinkamai naudoti statistinei augimo spartos skirtumų analizei. Todėl > NF60 organizmų šlapio kūno masės ir ilgio duomenis reikėtų atmesti ir jų negalima naudoti atliekant kartotinių bendinių vidurkių arba kartotinių bandinių medianų analizę. Šiuos su augimu susijusius parametrus būtų galima analizuoti dviem skirtingais metodais.

72. Pagal vieną iš metodų šlapio kūno masės ir (arba) SVL statistinė analizė atliekama atsižvelgiant tik į tuos buožgalvius, kurių vystymosi stadija yra lygi 60 arba mažesnė. Manoma, kad šis metodas suteikia pakankamai patikimą informaciją apie galimo poveikio augimui rimtumą tol, kol tik nedidelė bandymo gyvūnų dalis neįtraukiama į analizę (≤ 20 %). Jei vienos ar kelių nominaliųjų koncentracijos verčių didelio buožgalvių skaičiaus vystymosi stadija yra didesnė nei 60 (≥ 20 %), visiems buožgalviams reikėtų atlikti dvifaktorinę ANOVA su hierarchine dispersijos struktūra, kad būtų įvertintas veikimo bandomąja chemine medžiaga poveikis augimui, atsižvelgiant į vėlesnės vystymosi stadijos poveikį augimui. 3 priedėlyje pateiktos rekomendacijos dėl masės ir ilgio dvifaktorinės ANOVA analizės.

NUORODOS

(1) OECD (2004) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 – Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 77, Paris.

▼**M6**

(2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 – Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 76. Paris

(3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 92. Paris

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

(5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002), Philadelphia, PA

(6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus (FETAX). E 1439-98

(7) Kahl,M.D., Russom,C.L., DeFoe,D.L. & Hammermeister,D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, pp. 539-551

(8) Nieuwkoop,P.D. & Faber,J. (1994) Normal Table of Xenopus laevis. Garland Publishing, New York

(9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 82. Paris

(10) Dodd,M.H.I. & Dodd,J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts,B. (ed.), Academic Press, New York, pp. 467-599

(11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. Paris

(12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp. 69-92.

▼M6

1 priedėlis

1 lentelė.

21 dienos varliagyvių metamorfozės tyrimo bandymų sąlygos

Bandomieji gyvūnai		*Xenopus laevis* lervos	
Pradinė lervų stadija		Neuwkoop ir Faber 51 stadija	
Veikimo bandomąja medžiaga laikotarpis		21 diena	
Lervų atrankos kriterijai		Vystymosi stadija ir visas ilgis (neprivalomas)	
Bandomosios medžiagos koncentracijos vertės		Ne mažiau kaip 3 koncentracijos vertės, apimančios maždaug vieną dydžio eilę	
Veikimo bandomąja medžiaga režimas		Pratekėjimo (pageidautina) ir (arba) statinio atnaujinimo	
Bandymo sistemos srautas		25 ml/min (visiškas tūrio pasikeitimas maždaug kas 2,7 h)	
Pirminės vertinamosios baigtys / Nustatymo dienos		Gaištamumas	Kasdien
		Vystymosi stadija	7 ir 21 diena
		Užpakalinių galūnių ilgis	7 ir 21 diena
		Atstumas nuo snukio iki išeinamosios angos	7 ir 21 diena
		Šlapio kūno masė	7 ir 21 diena
		Skydliaukės histologija	21 diena
Skiedimo vanduo/Laboratorinė kontrolė		Vandentiekio vanduo be chloro (filtruotas per aktyvintąsias anglis) arba lygiavertis laboratorijos šaltinis	
Lervų tankis		20 lervų viename bandymo inde (5 / l)	
Bandymo tirpalas / Bandymo indas		4–10 l (ne mažiau kaip 10–15 cm vandens) / Stiklinis arba nerūdijančiojo plieno bandymo indas (pvz., 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Kartotiniai bandiniai		po 4 kartotinius bandymo indus kiekvienai bandomajai koncentracijai ir kontrolinei grupei	
Priimtinas gaištamumas kontrolinių bandinių induose		≤ 10 % viename kartotinio bandinio inde	
Skydliaukės fiksavimas	Gyvūnų skaičius	Visi buožgalviai (5 iš kiekvieno kartotinio bandinio įvertinami pradžioje)	
	Sritis	Galva arba visas kūnas	
	Fiksavimo skystis	Davidsono fiksatorius	
Maitinimas	Maistas	Sera Micron® arba lygiavertis	
	Kiekis / Dažnumas	Dėl maitinimo režimo maitinant Sera Micron® žr. 1 lentelę	
Apšvietimas	Dienos šviesos trukmė	12 h šviesa: 12 h tamsa	

▼**M6**

	Apšvieta	nuo 600 iki 2 000 liuksų (matuojama vandens paviršiuje)
Vandens temperatūra		22° ± 1 °C
pH		6,5–8,5
Ištirpusio deguonies (DO) koncentracija		> 3,5 mg/l (> 40 % soties ore)
Analizinės chemijos ėminių grafikas		Kartą per savaitę (4 ėminių ėmimo kartai/bandymui)

▼M6

2 priedėlis

Neapdorotų duomenų ir suvestinių duomenų pateikimo lentelės

1 lentelė.

Bendroji informacija apie bandomąją cheminę medžiagą

Cheminė informacija			
	Įrašoma bandomoji cheminė medžiaga, koncentracijos vienetai ir bandomosios grupės		
	Bandomoji cheminė medžiaga:		
	Koncentracijos vienetai:		
	1 bandomoji grupė		
	2 bandomoji grupė		
	3 bandomoji grupė		
	4 bandomoji grupė		
	Data (0 diena):		Įrašyti datą (m. mėn. d.)
	Data (7 diena):		Įrašyti datą (m. mėn. d.)
	Data (21 diena):		Įrašyti datą (m. mėn. d.)

2 lentelė.

Neapdorotų 7 ir 21 dienos duomenų rinkimo lentelės

X DIENA
DATA 00.00.00

	Koncentracija	Bandomosios grupės numeris	Kartotinio bandinio numeris	Individo numeris	Individo identifikavimo žymuo	Vystymosi stadija	SVL ilgis (mm)	Užpakalinės galūnės ilgis (mm)	Viso šlapio kūno masė (mg)
EILUTĖ	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIJA	BL	HLL	MASĖ
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							

▼**M6**

	Koncentracija	Bandomosios grupės numeris	Kartotinio bandinio numeris	Individo numeris	Individo identifikavimo žymuo	Vystymosi stadija	SVL ilgis (mm)	Užpakalinės galūnės ilgis (mm)	Viso šlapio kūno masė (mg)
EILUTĖ	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIJA	BL	HLL	MASĖ
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							
32	0,00	2							
33	0,00	2							

▼**M6**

	Koncentracija	Bandomosios grupės numeris	Kartotinio bandinio numeris	Individo numeris	Individo identifikavimo žymuo	Vystymosi stadija	SVL ilgis (mm)	Užpakalinės galūnės ilgis (mm)	Viso šlapio kūno masė (mg)
EILUTĖ	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIJA	BL	HLL	MASĖ
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							

▼**M6**

	Koncentracija	Bandomosios grupės numeris	Kartotinio bandinio numeris	Individo numeris	Individo identifikavimo žymuo	Vystymosi stadija	SVL ilgis (mm)	Užpakalinės galūnės ilgis (mm)	Viso šlapio kūno masė (mg)
EILUTĖ	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIJA	BL	HLL	MASĖ
59	0,00	3							
60	0,00	3							
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

▼M6

3 lentelė.

Apskaičiuotos 7 ir 21 dienos vertinamųjų baigčių duomenų suvestinės

		Vystymosi stadija			SVL (mm)		Užpakalinės galūnės ilgis (mm)		Masė (mg)	
Bandomosios grupės Nr.	Kartotinio bandinio Nr.	min	mediana	maks	vidurkis	std nuokrypis	vidurkis	std nuokrypis	vidurkis	std nuokrypis
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Pastaba. Skaičiavimo duomenys langeliuose susiję su 2 lentelės duomenų įvestimis.

4 lentelė.

Dienos gaištamumo duomenys

Bandymo diena	Data	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#Vertė!																
2	#Vertė!																
3	#Vertė!																
4	#Vertė!																
5	#Vertė!																

▼**M6**

Bandymo diena	Data	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	#Vertė!																
7	#Vertė!																
8	#Vertė!																
9	#Vertė!																
10	#Vertė!																
11	#Vertė!																
12	#Vertė!																
13	#Vertė!																
14	#Vertė!																
15	#Vertė!																
16	#Vertė!																
17	#Vertė!																
18	#Vertė!																
19	#Vertė!																
20	#Vertė!																
21	#Vertė!																
Iš viso kartotiniuose bandiniuose		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Iš viso bandomosiose grupėse		0				0				0				0			

Pastaba. Skaičiavimo duomenys langeliuose susiję su 1 lentelės duomenų įvestimis.

5 lentelė.

Vandens kokybės kriterijai

Poveikio sistema (pratekamoji/statinio atnaujinimo):
Temperatūra:
Apšvieta:
Šviesos ir tamsos ciklas:
Maistas:
Maitinimo dažnumas:
Vandens pH:
Jodo koncentracija bandymo vandenyje:

▼**M6**

6 lentelė.

Cheminių duomenų suvestinė

Cheminės medžiagos pavadinimas:																					
CAS #:																					
Bandymo diena	Data	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																				
1	#Vertė!																				
2	#Vertė!																				
3	#Vertė!																				
4	#Vertė!																				
5	#Vertė!																				
6	#Vertė!																				
7	#Vertė!																				
8	#Vertė!																				
9	#Vertė!																				
10	#Vertė!																				
11	#Vertė!																				
12	#Vertė!																				
13	#Vertė!																				
14	#Vertė!																				
15	#Vertė!																				
16	#Vertė!																				
17	#Vertė!																				
18	#Vertė!																				
19	#Vertė!																				
20	#Vertė!																				
21	#Vertė!																				

Pastaba. Skaičiavimo duomenys langeliuose susiję su 1 lentelės duomenų įvestimis.

▼**M6**

7 lentelė.

Histopatologijos esminių kriterijų ataskaitos lentelės

Data: Cheminė medžiaga: Patologas:

1 kartotinio bandinio kontrolinio gyvūno ID	2 kartotinio bandinio kontrolinio gyvūno ID	Skydliaukės hipertrofija	Skydliaukės atrofija	Folikulinių ląstelių hipertrofija	Folikulinių ląstelių hiperplazija
Iš viso:					

1 kartotinio bandomojo gyvūno ID	2 kartotinio bandomojo gyvūno ID	Skydliaukės hipertrofija	Skydliaukės atrofija	Folikulinių ląstelių hipertrofija	Folikulinių ląstelių hiperplazija
Iš viso:					

1 kartotinio bandomojo gyvūno ID	2 kartotinio bandomojo gyvūno ID	Skydliaukės hipertrofija	Skydliaukės atrofija	Folikulinių ląstelių hipertrofija	Folikulinių ląstelių hiperplazija
Iš viso:					

▼**M6**

8 lentelė.

Papildomi histopatologiniai kriterijai

Data: Cheminė medžiaga: Patologas:

1 kartotinio bandinio kontrolinio gyvūno ID	2 kartotinio bandinio kontrolinio gyvūno ID	Folikulo ertmės ploto padidėjimas	Folikulo ertmės ploto sumažėjimas
Viso:			

1 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID	2 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID	Folikulo ertmės ploto padidėjimas	Folikulo ertmės ploto sumažėjimas
Viso:			

1 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID	2 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID	Folikulo ertmės ploto padidėjimas	Folikulo ertmės ploto sumažėjimas
Viso:			

1 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID	2 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID	Folikulo ertmės ploto padidėjimas	Folikulo ertmės ploto sumažėjimas
Viso:			

▼**M6**

9 lentelė.

Histopatologinių duomenų išsamus aprašymas

Data:

Cheminė medžiaga:

Patologas:

		Aprašymas
1 kartotinio bandinio kontrolinio gyvūno ID		
2 kartotinio bandinio kontrolinio gyvūno ID		
1 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID		
2 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID		

▼**M6**

1 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID		
2 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID		
1 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID		
2 kartotinio bandinio bandomojo gyvūno ID		

▼M6

10 lentelė.

AMA vystymosi stadijos x dienos (7 arba 21) lentelės šablonas

		Kontrolinis bandinys				1 dozė					2 dozė					3 dozė				
Vertinamoji baigtis	Kartotinis bandinys	Vidurkis	SD	CV	N	Vidurkis	SD	CV	N	p vertė	Vidurkis	SD	CV	N	p vertė	Vidurkis	SD	CV	N	p vertė
Užpakalinės galūnės ilgis (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Vidurkis:																			
SVL (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Vidurkis:																			
Šlapio kūno masė (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Vidurkis:																			

▼M6

11 lentelė.

AMA vystymosi stadijos *x* dienos (7 arba 21) duomenų pateikimo lentelės šablonas

		Kontrolinis bandinys				1 dozė					2 dozė					3 dozė				
	Kartotinis bandinys	Mediana	Min	Maks	N	Mediana	Min	Maks	N	p vertė	Mediana	Min	Maks	N	p vertė	Mediana	Min	Maks	N	p vertė
Vystymosi stadija	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Vidurkis:																			

02008R0440 — LT — 18.05.2017 — 007.001 — 1856

▼M6

3 priedėlis

Alternatyvus masės ir ilgio analizės metodas, taikomas, kai daugiau kaip 20 % buožgalvių būdinga vėlyvoji vystymosi stadija esant vienai ar kelioms koncentracijos vertėms

Jei esant vienai arba kelioms nominaliosios koncentracijos vertėms didelė dalis buožgalvių (≥ 20 %) pasiekia vėlesnę nei 60 stadiją, visiems buožgalviams reikėtų taikyti dvifaktorinę ANOVA su hierarchine dispersijos struktūra, kad būtų įvertinti su veikimu bandomąja chemine medžiaga susiję augimo veiksniai, atsižvelgiant į vėlyvosios vystymosi stadijos poveikį augimui.

Siūloma naudoti visus duomenis, bet atsižvelgti į vėlyvosios vystymosi stadijos poveikį. Tai galima padaryti taikant dvifaktorinę ANOVA su hierarchine (įdėtąja) sklaidos struktūra. Apibrėžiama, kad gyvūno vėlyvoji stadija yra „taip“ (LateStage=„Yes“), jei jo vystymosi stadija yra 61 arba vėlesnė. Kitais atvejais apibrėžiama, kad vėlyvoji stadija yra „ne“ (LateStage=„No“). Tada galima atlikti dviejų faktorių ANOVA naudojant koncentracijos verčių ir vėlyvosios stadijos sąveiką, kai kart(konc) yra atsitiktinis faktorius, o buožgalvių (kart) – atsitiktinis poveikis. Taikant šį metodą, kartotinis bandinys vis dar laikomas analizės vienetu, gaunant iš esmės tuos pačius rezultatus kaip atliekant kart*vėlyvosios stadijos vidurkių svertinę analizę vidurkiui tenkančių gyvūnų skaičiaus atžvilgiu. Jei duomenys neatitinka ANOVA normalumo arba dispersijos vienalytiškumo reikalavimų, galima atlikti normalizuotą rangų transformaciją prieštaravimui pašalinti.

Be standartinių ANOVA F kriterijų dėl koncentracijos, vėlyvosios stadijos ir jų sąveikos poveikių, sąveikos F kriterijus gali būti „padalytas“ į du papildomus ANOVA F kriterijus, vienas – vėlyvosios stadijos „ne“ vidutinių atsako verčių pagal visas koncentracijos vertes, kitas – vėlyvosios stadijos „taip“ vidutinių atsako verčių pagal visas koncentracijos vertes. Toliau kiekvieno vėlyvosios stadijos lygio bandomosios medžiagos dozių vidurkiai lyginami kontrolinių bandinių atžvilgiu. Galima atlikti tendencijos analizę taikant tinkamus skirtumus arba paprastą lyginimą paporiui, jei yra įrodymų, kad tam tikro vėlyvosios stadijos kintamojo lygio dozės ir atsako priklausomybė yra nemonotoniška. Bonferroni-Holm p verčių pataisa daroma tik tada, jei atitinkama F kriterijaus dalis yra nereikšminga. Tai galima atlikti taikant SAS ir galbūt kitus statistinės programinės įrangos rinkinius. Gali kilti problemų, kai ne visoms koncentracijos vertėms gaunami vėlyvosios stadijos gyvūnai, bet jas galima išspręsti paprastu būdu.

▼**M6**

4 priedėlis

Apibrėžtys

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

▼M6

C.39. KOLEMBOLŲ REPRODUKCIJOS DIRVOŽEMYJE BANDYMAS

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 232 (2009). Šis bandymo metodas sukurtas siekiant įvertinti cheminių medžiagų poveikį kolembolų reprodukcijos našumui dirvožemyje. Bandymas pagrįstas esamomis procedūromis (1) (2). Partenogenetinės *Folsomia candida* ir lytinio dauginimosi *Folsomia fimetaria* yra dvi prieinamiausios kolembolų rūšys, jos yra auginamos ir jų galima nusipirkti. Jei reikia įvertinti specifines buveines, kurių nenaudoja šios dvi rūšys, procedūrą galima pritaikyti kitoms kolembolų rūšims, jei jos gali atitikti bandymo tinkamumo kriterijus.

2. Dirvožemyje gyvenančios kolembolos yra ekologiškai tinkamos rūšys ekotoksikologiniams bandymams atlikti. Kolembolos yra šešiakojai gyvūnai su plonu egzoskeletu, kuris yra ypač laidus vandeniui ir orui, ir šios rūšies nariuotakojus cheminės medžiagos paveikia kitais būdais ir kitu laipsniu negu sliekus ir enchitrėjus.

3. Daugelio žemės ekosistemų kolembolų populiacijos tankis paprastai yra 10^5 m^{-2} dirvožemio ir lapų paklotės sluoksnio (3) (4). Suaugusių gyvūnų ilgis paprastai yra 0,5–5 mm, jų indėlis į suminę dirvožemio gyvūnų biomasę ir kvėpavimą yra mažas ir įvertinamas nuo 1 % iki 5 % (5). Todėl jų svarbiausias vaidmuo gali būti mitybos mikroorganizmais ir mikrofauna procesų reguliatorių vaidmuo. Kolembolos yra labai įvairių dirvožemyje ir jo paviršiuje gyvenančių bestuburių gyvūnų, pvz., erkių, šimtakojų, vorų, žygių ir trumpasparnių vabalų, grobis. Kolembolos prisideda prie skaidymo procesų rūgščiuose dirvožemiuose, kuriuose jos ir enchitrėjai galbūt yra svarbiausi tokių dirvožemių bestuburiai, nes sliekų ir diplopodų paprastai nėra.

4. *F. fimetaria* paplitusi visame pasaulyje ir dažnai pasitaiko kelių tipų dirvožemyje, nuo smėlio iki priemolio ir nuo švelniojo iki šiurkščiojo humuso dirvožemyje. Tai beakė nepigmentuota kolembola. Ji aptinkama visos Europos žemės ūkio paskirties dirvožemyje (6). Tai visaėdis gyvūnas, jos maistą sudaro grybienos hifai, bakterijos, pirmuonys ir detritas. Ėsdama ji sąveikauja su augalų patogeninių grybelių užkratais (7) ir gali turėti įtakos mikorizei, kaip nustatyta *F. candida* atveju. Kaip ir dauguma kolembolų rūšių, ji dauginasi lytiniu būdu, todėl būtinas nuolatinis patinėlių buvimas kiaušinėliams apvaisinti.

5. *F. candida* taip pat paplitusi visame pasaulyje. Nors daugumoje natūralių dirvožemių jos pasitaiko nedažnai, jų labai daug būna ten, kur gausu humuso. Tai beakė nepigmentuota kolembola. Ji turi gerai išvystytą furką (šokamąjį organą), aktyviai laksto ir lengvai šokinėja, jei būna sutrikdyta. Ekologinis *F. candida* vaidmuo panašus į *F. fimetaria* vaidmenį, bet jos buveinės yra daugiau organinių medžiagų turintys dirvožemiai. Ji dauginasi partenogenetiniu būdu. Patinų gali būti mažiau nei 1 tūkstančiui.

BANDYMO PRINCIPAS

6. Sinchroninės suaugusios kolembolos (*F. fimetaria*) arba jaunikliai (*F. candida*) veikiami kelių koncentracijos verčių bandomąja chemine medžiaga, įmaišyta į modifikuotą dirbtinį dirvožemį (8), turintį 5 % organinės medžiagos (arba alternatyvų dirvožemį). Bandymo scenarijų galima padalyti į du etapus:

— intervalo nustatymo bandymą, jei turima per mažai informacijos apie toksiškumą, kai pagrindinės vertinamosios baigtys yra gaištamumas ir

▼M6

reprodukcija, *F. fimetaria* atveju vertinami po 2 savaičių, o *F. candida* – po 3 savaičių.

— galutinį reprodukcijos bandymą, kai vertinamas iš motininių gyvūnų gautas suminis jauniklių skaičius ir motininių gyvūnų išgyvenamumas. Šis galutinis bandymas su *F. fimetaria* trunka 3 savaites, o su *F. candida* – 4 savaites.

Bandomosios cheminės medžiagos toksinis poveikis suaugusių gyvūnų gaištamumui ir reprodukcijos našumui išreiškiamas kaip LC_x ir EC_x, duomenims pritaikant tinkamą modelį netiesinės regresijos metodu, kad būtų galima įvertinti koncentraciją, kuri sukeltų *x* % gaištamumą arba reprodukcijos našumo sumažėjimą, arba kitaip išreiškiamas kaip NOEC/LOEC vertė (9).

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

7. Reikėtų žinoti bandomosios cheminės medžiagos fizikines savybes, tirpumą vandenyje, log K_{ow}, dirvožemio ir vandens pasiskirstymo koeficientą ir garų slėgį. Pageidautina turėti papildomos informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos kitimą dirvožemyje, pvz., fotolizės, hidrolizės ir biotinio skaidymo greitį. Reikėtų dokumentuoti cheminio bandomosios cheminės medžiagos identifikavimo pagal IUPAC duomenis, CAS numerį, partiją, siuntą, struktūrinę formulę ir grynumą, jei yra duomenų.

8. Šis bandymo metodas gali būti atliekamas ir su vandenyje tirpiomis, ir su netirpiomis cheminėmis medžiagomis. Tačiau atitinkamai skirtųsi bandomosios cheminės medžiagos įterpimo būdas. Bandymo metodas netinka lakiosioms cheminėms medžiagoms, t. y. cheminėms medžiagoms, kurių Henrio konstanta arba oro ir vandens pasiskirstymo koeficientas yra didesnis už vienetą, arba cheminėms medžiagoms, kurių garų slėgis 25 °C temperatūroje didesnis kaip 0,0133 Pa.

BANDYMO TINKAMUMAS

9. Bandomąja medžiaga nepaveikti kontroliniai bandiniai turėtų atitikti šiuos kriterijus, kad bandymo rezultatas galėtų būti laikomas tinkamu:

— vidutinis gaištamumas bandymo pabaigoje neturėtų būti didesnis kaip 20 %;

— vidutinis jauniklių skaičius vienam indui bandymo pabaigoje turėtų būti ne mažesnis kaip 100;

— variacijos koeficientas, apskaičiuotas galutinio bandymo pabaigoje esančių jauniklių skaičiui, turėtų būti mažesnis kaip 30 %.

ETALONINĖ CHEMINĖ MEDŽIAGA

10. Etaloninę cheminę medžiagą, kurios koncentracija būtų pasirinkto tipo dirvožemio EC_{50}, reikėtų bandyti reguliariais laiko tarpais arba galbūt įtraukti į kiekvieną bandymą, kad būtų patikrinta, ar bandymo organizmų atsakas bandymo sistemoje yra normalaus lygio. Tinkama etaloninė medžiaga yra boro rūgštis, kuri turėtų sumažinti abiejų rūšių reprodukciją 50 % (10) (11), kai jos yra maždaug 100 mg/kg sausojo dirvožemio masės.

BANDYMO APRAŠYMAS

Bandymo indai ir įranga

11. Kaip bandymo indai tiktų talpyklos, į kurias telpa 30 g drėgno dirvožemio. Talpyklų medžiaga turėtų būti stiklas arba inertinis plastikas (netoksinis). Tačiau indų iš plastiko reikėtų vengti, jei dėl sorbcijos sumažėja bandomosios cheminės medžiagos veikimas. Bandymo indų skerspjūvio plotas turėtų būti toks, kad faktinis dirvožemio sluoksnio storis bandymo inde galėtų būti

▼M6

2–4 cm. Indai turi būti su dangčiais (pvz., stiklo ar polietileno), kurie suprojektuoti garavimui mažinti, bet kartu užtikrintų dujų mainus tarp dirvožemio ir atmosferos. Talpykla turėtų būti bent iš dalies skaidri, kad galėtų praleisti šviesą.

12. Reikalinga įprastinė laboratorijos ir ši specialioji įranga:

— džiovinimo spinta;

— stereomikroskopas;

— pH metras ir liuksmetras;

— tinkamos tiksliosios svarstyklės;

— reikiama temperatūros kontrolės įranga;

— reikiama oro drėgmės kontrolės įranga (nebūtina, jei ekspozicijos indai uždengti dangčiu);

— reguliuojamos temperatūros inkubatorius arba maža patalpa;

— pincetai arba mažos siurbimo galios oro siurbimo įtaisas.

Bandymo dirvožemio paruošimas

13. Naudojamas modifikuotas dirbtinis dirvožemis (8), kurio organinės medžiagos kiekis – 5 %. Taip pat galima naudoti natūralų dirvožemį, jei dirbtinis dirvožemis nepanašus į natūralų dirvožemį. Rekomenduojama tokia dirbtinio dirvožemio sudėtis (sausos medžiagos, išdžiovintos iki pastoviosios masės 105 °C temperatūroje, atžvilgiu):

— 5 % kiminų durpių, išdžiovintų ore ir smulkiai sumaltų (priimtinas dalelių dydis 2 ± 1 mm);

— 20 % kaolino (pageidautinas didesnis kaip 30 % kaolinito kiekis);

— maždaug 74 % išdžiovinto ore pramoninio smėlio (atsižvelgiant į reikiamą $CaCO_3$ kiekį), daugiausia smulkaus smėlio, kurio daugiau kaip 50 % dalelių būtų nuo 50 iki 200 mikronų. Tikslus smėlio kiekis priklauso nuo $CaCO_3$ kiekio (žr. toliau), nes kartu jie turėtų sudaryti iki 75 %.

— 1,0 % kalcio karbonato ($CaCO_3$, miltelių pavidalo, analiziškai grynas), kad būtų gauta 6,0 ± 0,5 pH vertė; pridedamo kalcio karbonato kiekis iš esmės gali priklausyti nuo durpių kokybės arba tipo (žr. 1 pastabą).

1 pastaba. Reikiamas $CaCO_3$ kiekis priklausys nuo dirvožemio substrato komponentų ir turėtų būti nustatytas matuojant iš anksto inkubuotų drėgno dirvožemio ėminių pH prieš pat bandymą.

2 pastaba. Rekomenduojama matuoti dirvožemio pH ir galima (nebūtina) C/N santykį, katijonų mainų talpą ir organinės medžiagos kiekį, kad vėlesniame etape būtų įmanoma normalizuoti ir geriau aiškinti rezultatus.

3 pastaba. Prireikus, pvz., atsižvelgiant į specifinius bandymo tikslus, kaip bandymo ir (arba) kultūros auginimo substratą galima naudoti natūralius dirvožemius iš neužterštų vietų. Tačiau naudojant natūralų dirvožemį, jį reikėtų apibūdinti nurodant bent kilmę (surinkimo vietą), pH, tekstūrą (dalelių dydžio pasiskirstymą), katijonų mainų talpą ir organinės medžiagos kiekį, ir jame neturėtų būti jokių teršalų. Jei naudojamas natūralus dirvožemis, prieš jį naudojant galutiniam bandymui patariama įrodyti, ar jis tinka bandymui atlikti ir ar atitinka bandymo tinkamumo kriterijus.

▼M6

14. Sausos dirvožemio sudedamosios dalys gerai sumaišomos (pvz., dideliu laboratoriniu maišikliu). Dirbtinio dirvožemio maksimali vandens sulaikymo geba (WHC) nustatoma pagal 5 priedėlyje aprašytas procedūras. Bandymo dirvožemio drėgmės kiekis turėtų būti optimalus, kad būtų gauta puri ir poringa dirvožemio struktūra, kuri sudarytų sąlygas kolemboloms patekti į poras. Jis paprastai yra nuo 40 % iki 60 % maksimalios WHC.

15. Nuo 2 iki 7 dienų prieš bandymo pradžią sausas dirbtinis dirvožemis iš anksto drėkinamas rūgštingumo pusiausvyrai pasiekti ar stabilizuoti įpilant dejonizuoto vandens, kuris turėtų sudaryti maždaug pusę galutinio vandens kiekio. Norint nustatyti pH, naudojamas dirvožemio ir 1 mol/l kalio chlorido (KCl) ar 0,01 mol/l kalcio chlorido ($CaCl_2$) tirpalo mišinys santykiu 1:5 (pagal 6 priedėlį). Jei dirvožemio rūgštingumas didesnis nei nustatytas pH intervalas, jį galima reguliuoti įdedant reikiamą $CaCO_3$ kiekį. Jei dirvožemio pH per didelis, jį galima sumažinti kolemboloms nekenksminga neorganine rūgštimi.

16. Iš anksto sudrėkintas dirvožemis dalijamas į tiek dalių, kiek yra bandymo koncentracijos verčių (ir etaloninės medžiagos, jei naudojama) ir bandymui naudojamų kontrolinių bandinių skaičius. Įdedama bandomųjų cheminių medžiagų, ir vandens kiekis reguliuojamas pagal 24 pastraipą.

Bandymo gyvūnų atranka ir paruošimas

17. Rekomenduojama partenogenetinė rūšis *F. candida*, nes atliekant bandymo metodo tarplaboratorinį tyrimą (11) ši rūšis dažniau nei *F. fimetaria* atitinka tinkamumo kriterijus dėl išgyvenamumo. Jei naudojamos alternatyvios rūšys, jos turėtų atitikti 9 pastraipoje nurodytus tinkamumo kriterijus. Bandymo gyvūnus reikėtų gerai maitinti nuo bandymo pradžios iki 23–26 dienų *F. fimetaria* amžiaus ir 9–12 dienų *F. candida* amžiaus. Kiekviename kartotiniame bandinyje *F. fimetaria* skaičius turėtų būti 10 patinų ir 10 patelių, o *F. candida* – 10 patelių (žr. 2 ir 3 priedėlius). Sinchroniniai gyvūnai parenkami iš lėkštelių atsitiktinai ir tikrinama kartotiniam bandiniui priskiriamos kiekvienos partijos gyvūnų sveikata ir fizinė būklė. Kiekviena 10 ar 20 gyvūnų grupė dedama į atsitiktinai parinktą bandymo indą ir pasirenkamos didelės *F. fimetaria* patelės, kad jas būtų galima tinkamai atskirti nuo *F. fimetaria* patinų.

Bandymo koncentracijos medžiagų ruošimas

18. Galima taikyti keturis bandomosios cheminės medžiagos įterpimo būdus: 1) bandomosios cheminės medžiagos maišymas su dirvožemiu kaip nešiklį naudojant vandenį, 2) bandomosios cheminės medžiagos maišymas su dirvožemiu kaip nešiklį naudojant organinį tirpiklį, 3) bandomosios cheminės medžiagos maišymas su dirvožemiu kaip nešiklį naudojant smėlį arba 4) dirvožemio paviršiaus padengimas bandomąja chemine medžiaga. Tinkamo metodo parinkimas priklauso nuo cheminės medžiagos charakteristikų ir bandymo tikslo. Apskritai rekomenduojama, kad bandomoji cheminė medžiaga būtų maišoma su dirvožemiu. Tačiau gali tekti taikyti įterpimo procedūras, kurios atitiktų praktinį cheminės medžiagos naudojimo būdą (pvz., purkšti skystąjį preparatą arba naudoti specialias pesticidų sudėtis, pvz., granules arba sėklų beicavimo priemones). Dirvožemis apdorojamas prieš įdedant kolembolas, išskyrus atvejus, kai bandomąja chemine medžiaga dengiamas dirvožemio paviršius – kolembolos jau turėtų būti dirvožemyje.

Vandenyje tirpi bandomoji cheminė medžiaga

19. Ruošiamas bandomosios cheminės medžiagos tirpalas dejonizuotame vandenyje, kurio kiekio pakaktų visiems vienos bandymo koncentracijos kartotiniams bandiniams paruošti. Prieš įdedant į bandymo indą, bandomosios cheminės medžiagos tirpalas gerai sumaišomas su viena iš anksto sudrėkinto dirvožemio partija.

Vandenyje netirpi bandomoji cheminė medžiaga

20. Jei cheminės medžiagos netirpsta vandenyje, bet tirpsta organiniuose tirpikliuose, bandomąją cheminę medžiagą galima ištirpinti mažiausiame įmanomame tinkamo tirpiklio (pvz., acetono) tūryje, visą laiką užtikrinant tinkamą cheminės medžiagos sumaišymą su dirvožemiu ir jo sumaišymą su reikiamu

▼M6

kvarcinio smėlio kiekiu. Reikėtų naudoti tik lakiuosius tirpiklius. Jei naudojamas organinis tirpiklis, reikėtų, kad visų bandymo koncentracijos verčių bandiniai ir papildomas tirpiklio neigiamas kontrolinis bandinys turėtų tą patį mažiausią tirpiklio kiekį. Maišymo indų nereikėtų tam tikrą laiką uždengti, kad su maišoma bandomąja chemine medžiaga patekęs tirpiklis galėtų išgaruoti, ir užtikrinti, kad per šį laiką neišsisklaidytų toksinė cheminė medžiaga.

Vandenyje ir organiniuose tirpikliuose mažai tirpi bandomoji cheminė medžiaga

21. Jei cheminės medžiagos mažai tirpsta vandenyje ir organiniuose tirpikliuose, reikiamai bandymo koncentracijai gauti su bandomąja chemine medžiaga maišomas kvarcinis smėlis, kuris turėtų sudaryti dalį viso į dirvožemį dedamo smėlio. Kvarcinio smėlio ir bandomosios cheminės medžiagos mišinys dedamas į iš anksto sudrėkintą dirvožemį ir gerai sumaišomas, įpylus dejonizuoto vandens kiekį, kuris turi užtikrinti reikiamą dirvožemio drėgmę. Galutinis mišinys padalijamas į bandymo indus. Procedūra kartojama su kiekviena bandymo koncentracija, taip pat ruošiamas atitinkamas kontrolinis bandinys.

Dirvožemio paviršiaus padengimas bandomąja chemine medžiaga

22. Jei bandomoji cheminė medžiaga yra pesticidas, galbūt ją reikėtų purkšti ant dirvožemio paviršiaus. Dirvožemis apdorojamas įdėjus kolembolas. Iš pradžių į bandymo indus dedamas sudrėkinto dirvožemio substratas, paskui įleidžiami gyvūnai ir bandymo indai pasveriami. Siekiant išvengti tiesioginio gyvūnų paveikimo bandomąja medžiaga dėl jų tiesioginio sąlyčio su bandomąja chemine medžiaga, ji purškiama praėjus ne mažiau kaip pusvalandžiui po kolembolų įleidimo. Dirvožemio paviršių bandomąja chemine medžiaga reikėtų padengti kuo tolygiau, ją purškiant tinkamu laboratoriniu purkštuvu, kad būtų modeliuojamas laukų purškimas. Reikėtų purkšti temperatūrai kintant ne daugiau kaip ± 2 °C ir purškiamų vandeninių tirpalų, emulsijų arba dispersijų purškimo norma turėtų atitikti rizikos vertinimo rekomendacijas. Srautas turėtų būti tikrinamas taikant atitinkamą kalibravimo metodą. Specialios sudėties preparatus, pvz., granules arba sėklų beicavimo priemones galima būtų įterpti žemės ūkyje taikomu būdu. Maistas dedamas po purškimo.

PROCEDŪRA

Bandymo sąlygos

23. Vidutinė bandymo temperatūra turėtų būti 20 ± 1 °C, o temperatūros intervalas – 20 ± 2 °C. Bandymas atliekamas reguliuojamų šviesos ir tamsos ciklų sąlygomis (pageidautina, 12 h šviesos ir 12 h tamsos), bandymo indų zonos apšvietai esant nuo 400 iki 800 liuksų.

24. Dirvožemio drėgmė tikrinama indus pasveriant bandymo pradžioje, per vidurį ir pabaigoje. Masės nuostoliai > 2 % kompensuojami įpilant dejonizuoto vandens. Reikėtų pabrėžti, kad vandens nuostolius būtų galima sumažinti užtikrinant didelę oro drėgmę (> 80 %) bandymo inkubatoriuje.

25. pH reikėtų matuoti intervalo nustatymo bandymo ir galutinio bandymo pradžioje ir pabaigoje. Reikėtų išmatuoti vieną papildomą kontrolinį bandinį ir po vieną papildomą apdoroto dirvožemio (visų koncentracijos verčių) bandinį, kurie būtų paruošti ir prižiūrimi kaip bandymo kultūrų bandiniai, bet be kolembolų.

Bandymo procedūra ir matavimai

26. Į bandymo indą dedamas kiekvienos bandymo koncentracijos dirvožemio kiekis, atitinkantis 30 g naujai paruošto dirvožemio masės. Taip pat ruošiami kontroliniai bandiniai su vandeniu be bandomosios cheminės medžiagos. Jei

▼M6

bandomajai cheminei medžiagai įterpti naudojamas nešiklis, be bandymo bandinių serijos turėtų būti viena kontrolinių bandinių tik su nešikliu serija. Tirpiklio arba dispergento koncentracija turėtų atitikti jų koncentraciją bandymo induose su bandomąja chemine medžiaga.

27. Atskiri gyvūnai atsargiai pernešami į kiekvieną bandymo indą (atsitiktinai paskirstyti tarp bandymo indų) ir dedami dirvožemio paviršiuje. Siekiant užtikrinti efektyvų pernešimą, galima naudoti mažo slėgio oro siurbimo įtaisą. Vienos bandymo koncentracijos kartotinių bandinių ir kontrolinių bandinių skaičius priklauso nuo taikomos bandymo schemos. Bandymo indai atsitiktinai išdėstomi bandymo inkubatoriuje ir kas savaitę jų padėtis atsitiktinai keičiama.

28. Vienam bandymo indui reikėtų naudoti dvidešimt suaugusių *F. fimetaria* gyvūnų, 10 patinų ir 10 patelių, kurių amžius 23–26 dienos. 21 dieną kolembolos ištraukiamos iš dirvožemio ir suskaičiuojamos. *F. fimetaria* lytis nustatoma pagal sinchronizuotos gyvūnų partijos gyvūnų dydį. Patelės yra gerokai didesnės nei patinai (žr. 3 priedėlį).

29. Vienam bandymo indui reikėtų naudoti dešimt *F. candida* jauniklių, kurių amžius 9–12 dienų. 28 dieną kolembolos ištraukiamos iš dirvožemio ir suskaičiuojamos.

30. Tinkamas maisto šaltinis yra kaip buitinis produktas parduodamos sausos granuliuotos kepimo mielės, kurių pakankamas kiekis, pvz., 2–10 mg, dedamas į kiekvieną indą bandymo pradžioje ir maždaug po dviejų savaičių.

31. Bandymo pabaigoje įvertinamas gaištamumas ir reprodukcija. Po 3 savaičių (*F. fimetaria*) arba po 4 savaičių (*F. candida*) kolembolos ištraukiamos iš bandymo dirvožemio (žr. 4 priedėlį) ir suskaičiuojamos (12). Kolembola užrašoma kaip negyva, jei jos nėra tarp ištrauktųjų gyvūnų. Kolembolų ištraukimo ir skaičiavimo metodų tinkamumas turėtų būti patvirtintas. Į tinkamumo kriterijų įtraukiamas didesnis kaip 95 % jauniklių ištraukimo efektyvumas, kurį galima patikrinti, pvz., įdedant žinomą jų skaičių į dirvožemį.

32. Bandymo procedūros praktinės eigos suvestinė ir laiko grafikas aprašyti 2 priedėlyje.

Bandymo planas

Intervalo nustatymo bandymas

33. Prireikus atliekamas intervalo nustatymo bandymas imant, pvz., penkias bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertes 0,1, 1,0, 10, 100 ir 1 000 mg/kg sauso dirvožemio masės ir po du kartotinius kiekvienos koncentracijos ir kontrolinius bandinius. Papildoma panašių cheminių medžiagų bandymo ar iš literatūros paimta informacija apie kolembolų gaištamumą ar reprodukciją taip pat gali būti naudinga priimant sprendimą dėl intervalui nustatyti atliekamo bandymo koncentracijos verčių intervalo.

34. Intervalo nustatymo bandymo naudojant *F. fimetaria* trukmė yra dvi savaitės, o *F. candida* – 3 savaitės, kad būtų užtikrinta, jog bus gauta viena jauniklių vada, gavimas. Bandymo pabaigoje įvertinamas kolembolų gaištamumas ir reprodukcija. Reikėtų užrašyti suaugusių gyvūnų ir jauniklių skaičių.

Galutinis bandymas

35. Jei reikia nustatyti EC_x (pvz., EC_{10}, EC_{50}), reikėtų atlikti bandymą imant dvylika koncentracijos verčių. Rekomenduojama imti mažiausiai du kartotinius kiekvienos bandymo koncentracijos bandinius ir šešis kartotinius kontrolinius bandinius. Koncentracijos verčių faktorius kinta atsižvelgiant į dozės ir atsako priklausomybę.

▼M6

36. Jei reikia nustatyti NOEC/LOEC, reikėtų naudoti bent penkias koncentracijos vertes, sudarančias geometrinę progresiją. Rekomenduojama imti keturis kartotinius kiekvienos bandymo koncentracijos bandinius ir aštuonis kartotinius kontrolinius bandinius. Koncentracijos verčių išdėstymo faktorius neturėtų būti didesnis kaip 1,8.

37. Taikant jungtinį metodą, galima nustatyti NOEC/LOEC ir EC_x. Jei taikomas šis jungtinis metodas, reikėtų naudoti aštuonias koncentracijos vertes, sudarančias geometrinę progresiją. Rekomenduojama imti keturis kartotinius kiekvienos apdorojimo dozės bandinius ir aštuonis kartotinius kontrolinius bandinius. Koncentracijos verčių išdėstymo faktorius neturėtų būti didesnis kaip 1,8.

38. Jei atliekant intervalo nustatymo bandymą nestebima jokio poveikio esant didžiausiai koncentracijai (t. y. 1 000 mg/kg), reprodukcijos bandymas gali būti atliekamas kaip ribinis bandymas, naudojant 1 000 mg/kg bandymo koncentracijos bandinius ir kontrolinį bandinį. Ribinis bandymas suteiks galimybę įrodyti, kad esant ribinei koncentracijai nėra statistiškai reikšmingo poveikio. Reikėtų naudoti aštuonis kartotinius apdoroto dirvožemio ir kontrolinius bandinius.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

39. Reprodukcijos našumas (pvz., viename bandymo inde gautų jauniklių skaičius) yra pagrindinė vertinamoji baigtis. Pagal statistinės analizės, pvz., ANOVA procedūras, bandomosios dozės lyginamos, taikant Student t kriterijų, Dunnett kriterijų ar Williams kriterijų. Atskiriems gautiems bandomųjų dozių vidurkiams apskaičiuojami 95 % pasikliovimo intervalai.

40. Kontroliniuose bandiniuose, kurie nebuvo veikiami bandomąja medžiaga, išgyvenusių suaugusių gyvūnų skaičius yra pagrindinis tinkamumo kriterijus ir jį reikėtų dokumentuoti. Kaip ir intervalo nustatymo bandymo atveju, visi kiti padarytos žalos požymiai taip pat turėtų būti pateikti ataskaitoje.

LCx ir ECx

41. ECx vertės, įskaitant su jomis susijusias parametro apatinę ir viršutinę 95 % pasikliovimo ribas, skaičiuojamos taikant tinkamus statistinius metodus (pvz., logistinę ar Weibull funkciją, sutrumpintą Spearman-Karber metodą arba paprastą interpoliaciją). EC_x gaunama į nustatytą lygtį įstatant vertę, atitinkančią kontrolinio bandinio vidurkio x %. Norint apskaičiuoti EC50 arba kitą EC_x, reikėtų atlikti viso duomenų rinkinio regresinę analizę. LC_{50} paprastai įvertinama atliekant probit regresinę analizę arba panašią analizę, kurią atliekant atsižvelgiama į binominio pasiskirstymo gaištamumo duomenis.

NOEC/LOEC

42. Jei numatoma, kad NOEC/LOEC nustatyti bus taikoma statistinė analizė, būtina turėti vienam indui taikomą statistiką (atskiri indai laikomi kartotiniais bandiniais). Reikėtų taikyti tinkamus statistinius metodus pagal EBPO 54 dokumentą dėl ekotoksiškumo duomenų statistinės analizės šiuolaikinių metodų. Taikymo rekomendacijos (9). Apskritai, neigiamas cheminės medžiagos poveikis, palyginti su kontroliniu bandiniu, tiriamas taikant vienpusį hipotezės tikrinimą, kai $p \leq 0,05$.

43. Normalusis pasiskirstymas ir sklaidos homogeniškumas gali būti tikrinami taikant tinkamą statistinį kriterijų, pvz., Shapiro-Wilk kriterijų ir Levene kriterijų ($p \leq 0,05$). Galima atlikti vienfaktorinę sklaidos analizę (ANOVA) ir vėliau taikyti daugybinio lyginimo kriterijų. Galima taikyti daugybinio lyginimo kriterijus (pvz., Dunnett kriterijų) arba tendencijos kriterijus mažėjimo tvarka (pvz., Williams kriterijų), kad būtų apskaičiuota, ar yra reikšmingų skirtumų ($p \leq 0,05$) tarp kontrolinių bandinių ir įvairios koncentracijos chemine medžiaga paveiktų bandinių (rekomenduojamas kriterijus pasirenkamas pagal EBPO dokumentą 54 (9)). Kitais atvejais NOEC ir LOEC

▼M6

galima būtų nustatyti taikant neparametrinius metodus (pvz., Bonferroni U kriterijų pagal Holm ar Jonckheere-Terpstra tendencijos kriterijų).

Ribinis bandymas

44. Jei buvo atliekamas ribinis bandymas (lyginamas tik kontrolinis ir tik vienos bandomosios dozės bandinys) ir yra vykdomi parametrinių kriterijų procedūrų reikalavimai (normalumas, homogeniškumas), metrinius atsakus galima įvertinti taikant Student kriterijų (t kriterijų). Jei šie reikalavimai nevykdomi, galima taikyti nelygių sklaidų t kriterijų (Welch t kriterijų) arba neparametrinį kriterijų, pvz., Mann-Whitney U kriterijų.

45. Jei norima nustatyti reikšmingus skirtumus tarp kontrolinių bandinių (kontrolinių ir tirpiklio kontrolinių bandinių), kiekvienos kontrolinės grupės kartotinius bandinius galima bandyti pagal aprašytąjį ribinį bandymą. Jei šiais bandymais reikšmingų skirtumų neaptinkama, visi kontroliniai ir tirpiklio kontroliniai bandiniai gali būti sujungti. Priešingu atveju visus bandomųjų dozių bandinius reikėtų lyginti su tirpiklio kontroliniais bandiniais.

Bandymo ataskaita

46. Bandymo ataskaitoje turi būti bent ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga

— bandomosios cheminės medžiagos, partijos ir siuntos identifikavimo duomenys, CAS numeris, grynumas;

— bandomosios cheminės medžiagos fizikinės ir cheminės savybės (pvz., log K_{ow}, tirpumas vandenyje, garų slėgis, Henrio konstanta (H) ir pageidautina informacija apie bandomosios cheminės medžiagos kitimą dirvožemyje), jei yra;

— jei bandoma ne grynoji cheminė medžiaga, reikėtų nurodyti bandomosios cheminės medžiagos ir priedų sudėtį;

Bandymo organizmai

— rūšių ir bandymo organizmų tiekėjo identifikavimo duomenys, veisimo sąlygų aprašymas ir bandymo organizmų amžiaus intervalas;

Bandymo sąlygos

— bandymo plano ir procedūros aprašymas;

— bandymo dirvožemio paruošimo duomenys; natūralaus dirvožemio, išsami specifikacija, jei naudojamas (kilmė, laikinis kitimas, dalelių dydžio pasiskirstymas, pH, organinių medžiagų kiekis);

— dirvožemio vandens sulaikymo geba;

— bandomosios cheminės medžiagos įterpimo į dirvožemį būdo aprašymas;

— bandymo sąlygos: apšvieta, šviesos ir tamsos ciklų trukmė, temperatūra;

— maitinimo režimo aprašymas, bandymo metu naudojamo maisto tipas ir kiekis, maitinimo dienos;

— dirvožemio pH ir vandens kiekis bandymo pradžioje ir pabaigoje (kontrolinio ir kiekvienos bandomosios dozės bandinių);

— išsamus gyvūnų ištraukimo metodo aprašymas ir ištraukimo efektyvumas.

▼M6

Bandymo rezultatai

— jauniklių skaičius bandymo pabaigoje kiekviename bandymo inde;

— suaugusių gyvūnų skaičius bandymo pabaigoje kiekviename bandymo inde ir jų gaištamumas (%);

— akivaizdžių fiziologinių ar patologinių simptomų arba aiškių elgesio pokyčių aprašymas;

— rezultatai, gauti naudojant etaloninę cheminę medžiagą;

— NOEC/LOEC vertės, gaištamumo LC_x, reprodukcijos EC_x (dažniausiai LC_{50}, LC_{10}, EC_{50} ir EC_{10}) ir 95 % pasikliovimo intervalai. Pritaikyto modelio grafikas, naudotas atliekant skaičiavimus, jo funkcijos lygtis ir parametrai (žr. (9));

— visa informacija ir pastebėjimai, kurie būtų naudingi aiškinant rezultatus;

— taikyto kriterijaus galia, jei tikrinama hipotezė (9);

— nukrypimai nuo šiame bandymo metode aprašytų procedūrų ir visi neįprasti reiškiniai atsiradę bandymo metu;

— bandymo tinkamumas;

— jei vertinama NOEC, minimalus aptinkamas skirtumas.

NUORODOS

(1) Wiles JA and Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (ed. H Løkke and CAM Van Gestel), pp. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester

(2) ISO (1999) Soil Quality – Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. No. 11267. International Organisation for Standardisation, Geneve

(3) Burges A and Raw F (Eds) (1967) Soil Biology. Academic Press. London

(4) Petersen H and Luxton M (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388

(5) Petersen H (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. Acta Zoologica Fennica 195: 111-118

(6) Hopkin SP (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. 330pp (ISBN 0-19-854084-1)

(7) Ulber B (1983) Einfluss von *Onychirurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (Eds), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Belgium), 30 August-2 September 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, pp. 261-268

(8) Šio priedo C.36 skyrius, Plėšriųjų erkių (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*) reprodukcijos dirvožemyje bandymas.

(9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD Paris

(10) Scott-Fordsmand JJ and Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen 61 pp. Danish Ministry for the Environment.

▼**M6**

(11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project No. 1256, pp. 66.

(12) Krogh PH, Johansen K and Holmstrup M (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. Appl. Soil Ecol. 7, 201-205

(13) Fjellberg A (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.

(14) Edwards C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In Soil Zoology (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, London, pp. 412-416

(15) Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a not on the use of a fungistatic substance in the cultures. Entomologists' Monthly Magazine 96:138-140.

▼M6

1 priedėlis

Apibrėžtys

Šiame bandymo metode taikomos šios apibrėžtys (šiame bandyme visos poveikio koncentracijos vertės yra išreikštos bandomosios cheminės medžiagos mase sausojo bandymo dirvožemio masei):

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant jokio poveikio nepastebima. Atliekant šį bandymą, NOEC atitinkanti koncentracija per nustatytą veikimo laikotarpį nepadaro statistiškai reikšmingo poveikio ($p < 0,05$), palyginti su kontroline grupe.

Mažiausia pastebėto poveikio koncentracija (LOEC) – mažiausia bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant pastebimas statistiškai reikšmingas poveikis ($p < 0,05$), palyginti su kontroliniais bandiniais, per nustatytą tos medžiagos veikimo laikotarpį.

ECx (x % poveikį sukelianti poveikio koncentracija) – bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant bandomieji organizmai patiria x % poveikį per atitinkamą tos medžiagos veikimo laikotarpį, palyginti su kontroliniu bandiniu. Pavyzdžiui, EC_{50} yra koncentracija, kuri, kaip įvertinta, iki bandymo vertinamosios baigties per nustatytą bandomosios medžiagos veikimo laikotarpį paveikia 50 % atitinkamos populiacijos.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

▼M6

2 priedėlis

Kolembolų bandymo pagrindiniai veiksmai ir laiko grafikas

Bandymo etapus galima apibendrinti taip:

Laikas (diena)	Veiksmas
– 23 iki – 26	Ruošiama sinchronizuota *F. fimetaria* kultūra
– 14	Ruošiamas dirbtinis dirvožemis (maišomos sausosios sudedamosios dalys) Tikrinama ir atitinkamai koreguojama dirbtinio dirvožemio pH vertė Matuojama maksimali dirvožemio vandens sulaikymo geba (WHC)
– 9 iki – 12	Ruošiama sinchronizuota *F. candida* kultūra
– 2 iki – 7	Iš anksto drėkinamas dirvožemis
– 1	Jaunikliai suskirstomi į partijas Ruošiami pradiniai tirpalai ir įterpiama cheminė medžiaga, jei būtina naudoti tirpiklį
0	Ruošiami pradiniai tirpalai ir įterpiama cheminė medžiaga, jei naudojama kietoji, vandenyje tirpi cheminė medžiaga ar ją reikia purkšti ant paviršiaus. Matuojamas dirvožemio pH ir sveriami indai. Įdedamas maistas. Įleidžiamos kolembolos.
14	*F. fimetaria* intervalo nustatymo bandymo atveju: Bandymas baigiamas, gyvūnai ištraukiami, matuojama dirvožemio pH vertė ir vandens nuostoliai (sveriama) Galutinio bandymo atveju: Matuojamas drėgmės kiekis, papildoma vandens ir įdedama 2–10
21	Galutinio *F. candida* bandymo atveju: Bandymas baigiamas, gyvūnai ištraukiami, matuojama dirvožemio pH vertė ir vandens nuostoliai (sveriama) Range-finding *F. candida*: Terminate test, extract animals, measure soil pH and loss of water (weight)
28	Definitive *F. candida* test: Terminate test, extract animals, measure soil pH and loss of water (weight)

▼M6

3 priedėlis

Rekomendacijos dėl *F. fimetaria* ir *F. candida veisimo ir sinchronizavimo*

Šiame vadove pateiktas datas ir trukmės vertes reikia atskirai patikrinti kiekvienos konkrečios kolembolų veislės atveju, siekiant užtikrinti, kad tinkamu laiku būtų gauti pakankamai sinchronizuoti jaunikliai. Tinkamą kiaušinėlių ir sinchronizuotai išsiritusių jauniklių surinkimo dieną iš esmės lemia kiaušinėlių dėjimo po suaugusių gyvūnų perkėlimo ant naujo substrato ir išsiritimo iš kiaušinėlių dienos.

Rekomenduojama turėti nuolatinę pradinę kultūrą, kurią sudarytų, pvz., 50 indų ar Petri lėkštelių. Pradinei kultūrai turėtų būti užtikrintos geros maitinimo sąlygos, kas savaitę tiekiant maistą, vandenį ir šalinant seną maistą bei negyvų gyvūnų kūnus. Jei ant substrato yra per mažai kolembolų, gali vykti inhibavimas dėl didesnio grybelių augimo. Jei kiaušinėliams gaminti pradinė kultūra naudojama per dažnai, ji gali pavargti. Nuovargio požymiai yra negyvi suaugę gyvūnai ir pelėsiai ant substrato. Kiaušinėlius, kurie liktų nuo sinchronizuotų gyvūnų gavimo, galima panaudoti kultūrai atjauninti.

Sinchronizuotai gautos *F. fimetaria* kultūros patinai ir patelės visų pirma skiriasi pagal dydį. Patinai yra aiškiai mažesni nei patelės, bet juda greičiau nei jos. Reikia nedaug patirties, kad būtų galima tiksliai atpažinti lytį, kurią galima patvirtinti atliekant lytinės zonos apžiūrą po mikroskopu (13).

1. **Auginimas**

1.a. *Kultūros auginimo substrato paruošimas*

Kultūros auginimo substratas yra gipsas (kalcio sulfatas) ir aktyvintosios anglys. Taip gaunamas drėgnas substratas, kurio aktyvintųjų anglių funkcija – sugerti dujines atliekas ir išskyras (14) (15). Kad kolembolas būtų lengviau stebėti, galima naudoti įvairių formų medžio anglis. Pvz., medžio anglių milteliai naudojami *F. candida* ir *F. fimetaria* (gaunamas juodai pilkas gipsas):

Substrato sudedamosios dalys:

— 20 ml aktyvintųjų anglių

— 200 ml distiliuoto vandens

— 200 ml gipso

arba

— 50 g aktyvintųjų anglių miltelių

— 260–300 ml distiliuoto vandens

— 400 g gipso.

Prieš naudojant substrato mišinys paliekamas sutirštėti.

1.b. *Veisimas*

Kolembolos laikomos induose, pvz., Petri lėkštelėse (90 mm × 13 mm), kurių dugnas padengtas 0,5 cm gipso ir medžio anglių substrato sluoksniu. Jos auginamos 20 ± 1 °C temperatūroje, taikant 12 h ir 12 h dienos ir tamsos ciklą (400–800 liuksų). Indai laikomi drėgni visą laiką, jų viduje užtikrinant 100 % santykinę oro drėgmę. Ją gali užtikrinti laisvasis vanduo

▼M6

akytame gipse, bet reikėtų vengti vandens plėvelės susidarymo gipso paviršiuje. Vandens nuostolių galima išvengti užtikrinant drėgną aplinkos orą. Visus negyvus gyvūnus ir supelijusį maistą reikėtų iš indų pašalinti. Jei norima paskatinti kiaušinėlių dėjimą, suaugusius gyvūnus reikia perkelti į Petri lėkšteles su nauju gipso ir medžio anglių substratu.

1.c. *Maisto šaltinis*

Kaip vienintelis *F. candida* and *F fimetaria* maistas naudojamos išdžiovintos kepimo mielių granulės. Šviežias maistas duodamas kartą ar du per savaitę, kad būtų išvengta pelijimo. Maistas maža krūvele dedamas tiesiai ant gipso. Dedamų mielių masę reikėtų derinti su kolembolų populiacijos dydžiu, bet paprastai pakanka 2–15 mg.

2. **Sinchronizavimas**

Bandymą reikėtų atlikti su sinchronizuotais gyvūnais, kad būtų gauti vienalyčiai tos pačios stadijos ir dydžio bandymo gyvūnai. Be to, sinchronizavimas sudaro sąlygas atskirti *F. fimetaria* patinus ir pateles nuo 3 savaitės ir vėliau pagal lytinį dimorfizmą, t. y. dydžio skirtumą. Toliau pateikta procedūra yra siūlymas, kaip gauti sinchronizuotų gyvūnų (praktiniai etapai neprivalomi).

2.a. *Sinchronizavimas.*

— Ruošiami indai su 0,5 cm storio gipso ir medžio anglių sluoksniu.

— Į kiaušinėliams dėti paruoštus indus pernešama 150–200 suaugusių *F. fimetaria* ir 50–100 *F. candida i*š geriausių 15–20 pradinės kultūros indų su 4–8 savaičių senumo substratu ir įdedama 15 mg kepimo mielių. Reikia vengti pernešti jauniklius kartu su suaugusiais gyvūnais, nes jauniklių buvimas gali trukdyti kiaušinėlių gamybai.

— Kultūra laikoma 20 ± 1 °C temperatūroje (vidurkis turėtų būti 20 °C) ir esant 12–12 h šviesos ir tamsos ciklui (400–800 liuksų). Būtina užtikrinti šviežią maistą ir drėgme prisotintą orą. Dėl maisto trūkumo gyvūnai gali tuštintis ant kiaušinėlių, ant kurių pradėtų augti grybelis arba *F. candida* gali pradėti ėsti savo pačių kiaušinėlius. Po 10 dienų kiaušinėliai atsargiai surenkami adata bei mentele ir pernešami ant „kiaušinėlių popieriaus“ (filtravimo popieriaus gabaliukai, įmerkti į gipso ir medžio anglių tyrę), kuris dedamas į indą su nauju gipso ir medžio anglių substratu. Ant substrato dedami keli grūdeliai mielių jaunikliams išvilioti, kad jie paliktų kiaušinėlių popierių. Svarbu, kad kiaušinėlių popierius ir substratas būtų drėgni, kitaip kiaušinėliai netektų vandens. Kitas būdas – suaugusius gyvūnus, jiems padėjus kiaušinėlius, 2 arba 3 dienoms galima pašalinti iš sinchronizuotos kultūros dėžučių.

— Po trijų dienų dauguma jauniklių išsiris ant kiaušinėlių popieriaus, o kai kuriuos jauniklius galima rasti po kiaušinėlių popieriumi.

— Siekiant gauti vienodo amžiaus jauniklius, kiaušinėlių popierius su neprasikalusiais kiaušinėliais pincetu pašalinamas iš Petri lėkštelės. Jaunikliai, kurių amžius 0–3 dienos, paliekami lėkštelėje ir maitinami kepimo mielėmis. Neprasikalę kiaušinėliai išmetami.

— Kiaušinėliai ir išsiritę jaunikliai auginami taip pat, kaip suaugę gyvūnai. Konkrečiai *F. fimetaria* reikėtų taikyti šias priemones: užtikrinti pakankamai šviežią maistą, pašalinti seną supelijusį maistą, po 1 savaitės paskirstyti jauniklius į naujas Petri lėkšteles, jei jų tankis didesnis kaip 200.

▼M6

2.b. *Kolembolų apdorojimas bandymo pradžioje*

— 9–12 dienų amžiaus *F. candida* arba 23–26 dienų amžiaus *F. Fimetaria* surenkamos, pvz., siurbiant, įleidžiamos į mažą indą su drėgnu gipso ir medžio anglių substratu ir po dviejų okuliarų mikroskopu tikrinama jų fizinė būklė (sužeisti ir pažeisti gyvūnai pašalinami). Visus etapus reikėtų atlikti kolembolas laikant drėgnoje atmosferoje, kad jos išvengtų džiūvimo streso, pvz., naudojant suvilgytus paviršius ir kt.

— Indas apverčiamas dugnu į viršų ir pastuksenamas, kad kolembolos patektų į dirvožemį. Reikėtų neutralizuoti statinę elektrą, kitaip gyvūnai gali pakilti į orą arba prilipti prie indo sienelių ir išdžiūti. Krūvį galima neutralizuoti naudojant jonizatorių arba po indu padedant šlapią skudurą.

— Maistas turėtų būti paskleistas po visą dirvožemio paviršių, o ne padėtas kaip vienas gabalas.

— Transportavimo ir bandymo laikotarpiu reikėtų vengti trankyti arba kitaip fiziškai trikdyti bandymo indus, nes taip gali būti tankinamas dirvožemis ir trukdoma kolembolų sąveika.

3. **Alternatyvios kolembolų rūšys**

Bandymams pagal šį bandymo metodą galima pasirinkti kitas kolembolų rūšis, pvz., *Proisotoma minuta, Isotoma viridis, Isotoma anglicana, Orchesella cincta, Sinella curviseta, Paronychiurus kimi, Orthonychiurus folsomi, Mesaphorura macrochaeta*. Prieš naudojant alternatyvias rūšis turi būti tenkinamos šios sąlygos:

— jas vienareikšmiškai identifikuoti;

— pagrįsti rūšies pasirinkimą;

— užtikrinti, kad į bandymo etapą būtų įtraukta dauginimosi biologija, nes dauginimasis būtų potencialus tikslinis ekspozicijos parametras;

— žinoti duomenis apie jų gyvenimą: lytinės brandos amžių, išsiritimo iš kiaušinių trukmę ir vystymosi stadijas, per kurias gyvūnai veikiami bandomąja medžiaga;

— užtikrinti optimalias augimo ir reprodukcijos sąlygas naudojant bandymo substratą ir tiekiamą maistą;

— kintamumas turėtų būti pakankamai mažas, kad būtų galima preciziškai ir tiksliai įvertinti toksiškumą.

▼M6

4 priedėlis

Gyvūnų ištraukimas ir skaičiavimas

1. **Gyvūnus galima ištraukti dviem būdais.**

1.a. Pirmasis būdas: galima naudoti reguliuojamo temperatūros gradiento ištraukimo įrenginį, kurio veikimas pagrįstas MacFadyen principais (1). Šiluma tiekiama iš kaitinimo elemento, įrengto ištraukimo dėžutės viršuje (reguliuojama termistoriumi, padėtu dirvožemio bandinio paviršiuje). Rinktuvo indą supančio aušinamojo skysčio temperatūra reguliuojama termistoriumi, įrengtu rinktuvo dėžutės paviršiuje (padėtu žemiau dirvožemio kerno). Termistoriai sujungti su programuojamu valdikliu, kuris didina temperatūrą pagal iš anksto suprogramuotą grafiką. Gyvūnai surenkami į vėsinamą rinktuvo dėžutę (2 °C), kurios dugnas padengtas gipso ir medžio anglių sluoksniu. Ištraukti gyvūnus pradedama 25 °C temperatūroje, kuri automatiškai didinama kas 12 h 5 °C, ir visa ištraukimo trukmė – 48 h. Po 12 h 40 °C temperatūroje ištraukimas baigtas.

1.b. Antrasis būdas: pasibaigus bandymo inkubavimo laikotarpiui, esančių kolembolų jauniklių skaičius įvertinamas flotacijos būdu. Tuo tikslu bandymas atliekamas maždaug 250 ml tūrio induose. Bandymo pabaigoje įpilama 200 ml distiliuoto vandens. Dirvožemis švelniai maišomas mažu teptuku, kad kolembolos galėtų plūduriuoti vandens paviršiuje. Į vandenį galima įpilti truputį, maždaug 0,5 ml juodojo Kentmere fotografinio dažiklio, kad būtų lengviau skaičiuoti, nes jis padidina kontrastą tarp vandens ir baltų kolembolų. Dažiklis nėra toksiškas kolemboloms.

2. **Skaičiavimas:**

Skaičiuoti galima plika akimi arba po optiniu mikroskopu, naudojant ant flotacijos indo padėtą tinklelį arba fotografuojant kiekvieno indo paviršių ir vėliau skaičiuojant kolembolas didelėse nuotraukose arba skaidrėse. Taip pat galima skaičiuoti naudojant skaitmeninius vaizdo apdorojimo metodus (12). Reikėtų patvirtinti visų metodų tinkamumą.

▼M6

5 priedėlis

Dirvožemio maksimalios vandens sulaikymo gebos (WHC) nustatymas

Buvo prieita prie išvados, kad toliau nurodytas maksimalios dirvožemio vandens sulaikymo gebos (WHC) nustatymo metodas yra tinkamas. Jis aprašytas ISO DIS 11268-2 C priede (Dirvožemio kokybė. Teršalų poveikis sliekams (*Eisenia fetida*). 2 dalis. Poveikio dauginimuisi nustatymas).

Tinkamu ėmikliu (vamzdiniu sraigtiniu grąžtu ir kt.) paimamas tam tikras kiekis (pvz., 5 g) dirvožemio substrato. Vamzdžio apačia užkemšama šlapiu filtravimo popieriaus gabalu, vamzdis įtaisomas ant stovo ir statomas į vandens vonią. Vamzdis laipsniškai leidžiamas žemyn tol, kol vandens lygis yra aukščiau dirvožemio viršaus. Tada jį reikėtų palikti vandenyje maždaug trims valandoms. Kadangi galima sulaikyti ne visą dirvožemio kapiliarais absorbuotą vandenį, dirvožemio bandinys maždaug dviem valandoms turėtų būti paliktas vandeniui nutekėti, vamzdį pastačius ant stipriai sudrėkinto smulkiai sumalto kvarcinio smėlio sluoksnio, esančio uždengtame inde (kad neišdžiūtų). Tada bandinys pasveriamas ir išdžiovinamas iki pastoviosios masės 105 °C temperatūroje. Vandens sulaikymo geba (WHC) turėtų būti apskaičiuota taip:

$$\text{WHC (\% sausos medžiagos masės)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

čia:

S – vandens prisotinto substrato masė + vamzdžio masė + filtravimo popieriaus masė;

T – taros masė (vamzdžio masė + filtravimo popieriaus masė);

D – sauso substrato masė.

▼**M6**

6 priedėlis

Dirvožemio PH nustatymas

Šis dirvožemio pH nustatymo metodas pagrįstas aprašymu, pateiktu ISO DIS 10390. Dirvožemio kokybė. pH nustatymas.

Nustatytas dirvožemio kiekis džiovinamas kambario temperatūroje ne trumpiau kaip 12 h. Ruošiama vieno tūrio dirvožemio suspensija (iš ne mažiau kaip 5 g dirvožemio) penkiuose tūriuose 1 mol/l analiziškai gryno kalio chlorido (KCl) arba 0,01 mol/l analiziškai gryno kalcio chlorido ($CaCl_2$). Suspensija stipriai purtoma 5 min ir paliekama nusistovėti ne trumpiau kaip 2 h, bet ne ilgiau kaip 24 h. Vandeninės fazės pH vertė matuojama pH metru, kalibruojamu prieš kiekvieną matavimą pagal tinkamą buferinių tirpalų seriją (pvz., pH 4,0 ir 7,0).

▼M6

C.40. CHIRONOMIDŲ GYVAVIMO CIKLO TRUKMĖS TOKSIŠKUMO BANDYMAS NUOSĖDŲ IR VANDENS SISTEMOJE, NAUDOJANT SODRINTĄ VANDENĮ ARBA SODRINTAS NUOSĖDAS

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) Nr. 233 (2010). Jis sukurtas siekiant įvertinti cheminės medžiagos poveikį gėlavandeniui dvisparniui *Chironomus* sp. bandomąja medžiaga jį veikiant visą jo gyvenimo trukmę (visiškai apimama 1-oji karta (P karta) ir ankstyvoji 2-osios kartos (F1 kartos) dalis). Šis metodas yra esamų bandymo metodų C.28 (1) arba C.27 (15), pagal kuriuos bandomąja chemine medžiaga veikiama sodrintame vandenyje arba sodrintose nuosėdose, tąsa. Jame atsižvelgiama į esamus *Chironomus riparius* ir *Chironomus dilutus* (anksčiau vadinto *C. tentans* (2)) toksiškumo bandymo protokolus, kurie buvo parengti Europoje ir Šiaurės Amerikoje (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9), o vėliau buvo atliktas jų tarplaboratorinis bandymas (1) (7) (10) (11) (12). Taip pat galima naudoti kitas tinkamai dokumentuotas chironomidų rūšis, pvz., *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). Visa *C. riparius* ir *C. yoshimatsui* veikimo bandomąja medžiaga trukmė yra maždaug 44 dienos, o *C. dilutus* – maždaug 100 dienų.

2. Šiame bandymo metode aprašyti veikimo bandomąja medžiaga vandenyje ir nuosėdose scenarijai. Tinkamo scenarijaus pasirinkimas priklauso nuo numatomo bandymo taikymo. Veikimo vandenyje scenarijus, sodrinant vandens sluoksnį, skirtas purškiamų pesticidų sklidimui modeliuoti, ir jis aprėpia pradinę pikinę koncentraciją paviršiniuose vandenyse. Be to, vandens sodrinimo scenariujus taip pat tinka, jei cheminė medžiaga patenka kitais būdais (įskaitant cheminių medžiagų išsiliejimą), bet ne kaupimosi nuosėdose procesams, kurių trukmė yra didesnė nei bandymo laikotarpis. Šiuo atveju ir tada, kai pagrindinis pesticidų patekimo į vandens telkinius būdas yra jų nuotėkis, gali būti, kad labiau tiktų sodrintų nuosėdų schema. Jei numatomi kiti cheminės medžiagos patekimo būdai, bandymo schemą galima nesunkiai pritaikyti. Pavyzdžiui, jei nėra tiriamas bandomosios cheminės medžiagos pasiskirstymas tarp vandeninės fazės ir nuosėdų sluoksnio, bet turi būti kuo labiau sumažinta adsorbcija ant nuosėdų, galima pagalvoti apie nuosėdų pakeitimą dirbtinėmis nuosėdomis (pvz., kvarciniu smėliu).

3. Cheminės medžiagos, dėl kurių reikia bandyti nuosėdose gyvenančius organizmus, gali nuosėdose išsilaikyti ilgai. Nuosėdose gyvenančius organizmus galima veikti keliais būdais. Kiekvieno veikimo būdo santykinė svarba ir jo indėlio į visuminį toksinį poveikį gavimo trukmė priklauso nuo cheminės medžiagos fizikinių ir cheminių savybių. Jei cheminės medžiagos stipriai adsorbuojamos arba su nuosėdomis jungiasi kovalentinėmis jungtimis, tinkamas veikimo būdas galėtų būti užteršto maisto suvalgymas. Siekiant, kad ypač lipofilinių cheminių medžiagų toksiškumas būtų pakankamai įvertintas, galima būtų pagalvoti apie tai, ar maistą į nuosėdas nereikėtų dėti prieš bandomosios cheminės medžiagos įdėjimą (žr. 31 pastraipą). Taigi įmanoma įtraukti visus veikimo būdus ir visus gyvenimo tarpsnius.

4. Matuojamos vertinamosios baigtys yra suminis suaugusių gyvūnų skaičius (1-osios ir 2-osios kartos), vystymosi sparta (1-osios ir 2-osios kartos), visiškai išsiritusių ir gyvų suaugusių gyvūnų lyčių santykis (1-osios ir 2-osios kartos), vienos patelės kiaušinėlių krūvelių skaičius (tik 1-osios kartos) ir kiaušinėlių krūvelių vislumas (tik 1-osios kartos).

5. Rekomenduojama naudoti dirbtines nuosėdas. Dirbtinės nuosėdos keliais aspektais tinkamesnės nei natūralios nuosėdos:

▼M6

— bandymo kintamumas sumažėja, nes nuosėdos sudaro atkuriamą „standartizuotą matricą“ ir nereikia ieškoti švarių nuosėdų šaltinio;

— bandymus galima pradėti bet kuriuo metu, nesant bandymo nuosėdų sezoninio kintamumo ir būtinumo jas iš anksto apdoroti, kad būtų pašalinta tenykštė fauna;

— įprastiniams bandymams reikiamas dirbtinių nuosėdų kiekis kainuoja mažiau nei lauko sąlygomis paimtų nuosėdų;

— naudojant dirbtines nuosėdas, galima palyginti įvairių cheminių medžiagų toksiškumo tyrimų rezultatus ir jas atitinkamai klasifikuoti (3).

6. Taikomos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

7. Pirmosios stadijos chironomidų lervos veikiamos kelių koncentracijos verčių bandomąja chemine medžiaga nuosėdų ir vandens sistemoje. Bandymas prasideda nuo pirmosios stadijos lervų (1-osios kartos) įdėjimo į bandymo stiklines su sodrintomis nuosėdomis arba su vandeniu, sodrinamu chemine medžiaga po lervų įdėjimo. Įvertinamas chironomidų atsiradimas, atsiradimo trukmė bei visiškai išsinėrusių ir gyvų mašalų lyčių santykis. Išsinėrę suaugę mašalai pernešami į veisimo narvelius, kad jiems būtų lengviau spiestis, poruotis ir dėti kiaušinėlius. Įvertinamas gautų kiaušinėlių krūvelių skaičius ir jų vislumas. Iš šių kiaušinėlių krūvelių gaunamos 2-osios kartos pirmosios stadijos lervos. Šios lervos dedamos į naujai paruoštas bandymo stiklines (sodrinimo procedūra atitinka 1-osios kartos procedūrą), kad būtų įvertintas 2-osios kartos gyvybingumas, įvertinant atsiradimą, atsiradimo trukmę bei visiškai išsinėrusių ir gyvų mašalų lyčių santykį (gyvavimo ciklo bandymo scheminis vaizdas pateiktas 5 priedėlyje). Visi duomenys analizuojami taikant regresijos modelį, kad būtų įvertinta koncentracija, sukelianti X % atitinkamos vertinamosios baigties sumažėjimą, arba tikrinant hipotezę, kad būtų nustatyta nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC). Jai nustatyti atsakai, gauti veikiant bandomąja medžiaga, lyginami su atitinkamų kontrolinių bandinių atsakais, taikant statistinius kriterijus. Reikėtų pastebėti, kad taikant sodrinto vandens scenarijų, greitai skaidomoms cheminėms medžiagoms, kiekvienos kartos vėlesnių stadijų (pvz., lėliukės tarpsnio) lervas galbūt veiktų gerokai mažesnė vandens virš nuosėdų koncentracija palyginti su 1-osios stadijos lervomis. Jei tai yra problema, o kiekvienai gyvenimo stadijai būtina palyginamoji bandomosios medžiagos koncentracija, galima būtų apsvarstyti šiuos bandymo metodo pakeitimus:

— lygiagretieji bandymai sodrinant atskiromis gyvenimo stadijomis, arba

— kartotinis bandymo sistemos sodrinimas (arba vandens virš nuosėdų atnaujinimas) abiem bandymo tarpsniais (1-osios ir 2-osios kartos), kai sodrinimo (atnaujinimo) intervalus reikėtų suderinti su bandomosios cheminės medžiagos kitimo charakteristikomis.

Tokie pakeitimai įmanomi tik taikant sodrinto vandens scenarijų, bet ne sodrintų nuosėdų scenarijų.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

8. Turėtų būti žinomas bandomosios cheminės medžiagos tirpumas vandenyje, jos garų slėgis, log K_{ow}, išmatuotas arba apskaičiuotas pasiskirstymo nuosėdose koeficientas ir stabilumas vandenyje. Reikėtų turėti patikimą, žinomo ir patvirtinto tikslumo bei aptikimo ribos analizės metodą bandomosios cheminės medžiagos kiekiui nustatyti vandenyje virš nuosėdų, porose esančiame vandenyje ir nuosėdose. Naudingą informaciją sudaro bandomosios cheminės medžiagos struktūrinė formulė ir grynumas. Taip pat naudinga informacija apie bandomosios cheminės medžiagos kitimą

▼M6

(pvz., išsisklaidymą, abiotinį bei biotinį skaidumą ir kt.). Kitos cheminių medžiagų, kurių fizikinės ir cheminės savybės apsunkina jų tyrimą, bandymo rekomendacijos pateiktos (16).

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

9. Etalonines chemines medžiagas galima bandyti periodiškai, siekiant įsitikinti, ar nepakito laboratorijos populiacijos jautrumas. Kaip ir dafnijų atveju, pakaktų atlikti 48 h trukmės ūmaus toksiškumo bandymą (pagal 17 nuorodą). Tačiau, kol nėra patvirtintos ūmaus toksiškumo rekomendacijos, galima svarstyti lėtinio toksiškumo bandymą pagal šio priedo C.28 skyrių. Etaloninių toksinių cheminių medžiagų, sėkmingai naudotų atliekant tarplaboratorinius ir tinkamumo patvirtinimo tyrimus, pavyzdžiai: lindanas, trifluralinas, pentachlorfenolis, kadmio chloridas ir kalio chloridas. (1) (3) (6) (7) (18).

BANDYMO TINKAMUMAS

10. Taikomos šios bandymo tinkamumo sąlygos:

— bandymo pabaigoje kontrolinio bandinio abiejų kartų lervų išsinėrimas turėtų būti ne mažesnis kaip 70 % (1) (7);

— 85 % visų kontrolinio bandinio abiejų kartų *C. riparius* and *C. yoshimatsui* suaugusių mašalų turėtų išsinerti 12–23 dieną po 1-osios stadijos lervų įleidimo į indus; *C. tentans* priimtinas 20–65 dienų laikotarpis;

— kontrolinio bandinio visiškai išsinėrusių ir gyvų abiejų kartų mašalų vidutinis lyčių santykis (kaip patelių arba patinų dalis) turėtų būti ne mažesnis kaip 0,4 ir ne didesnis kaip 0,6;

— į veisimo narvelį įdėtai vienai 1-osios kartos patelei tenkantis kiaušinėlių krūvelių skaičius kiekviename veisimo narvelyje turėtų būti ne mažesnis kaip 0,6;

— kontrolinio bandinio 1-osios kartos vislių kiaušinėlių krūvelių kiekviename veisimo narvelyje dalis turėtų būti ne mažesnė kaip 0,6;

— abiejų kartų veikimo bandomąja medžiaga laikotarpio pabaigoje kiekviename inde turėtų būti išmatuota pH vertė ir ištirpusio deguonies koncentracija. Deguonies koncentracija visuose induose turėtų būti ne mažesnė kaip 60 % soties ore vertės (ASV ([1])), o vandens virš nuosėdų pH – nuo 6 iki 9;

— vandens temperatūra neturėtų skirtis daugiau kaip ± 1,0 °C.

METODO APRAŠYMAS

Bandymo indai ir veisimo narveliai

11. Lervos bandomaja medžiaga veikiamos maždaug 8,5 cm skersmens 600 ml stiklinėse (žr. 5 priedėlį). Tinka kiti indai, tačiau juose turėtų būti užtikrintas reikiamas vandens virš nuosėdų ir nuosėdų sluoksnio storis. Nuosėdų paviršiaus plotas turėtų būti toks, kad vienai lervai tektų nuo 2 iki 3 cm^2. Nuosėdų sluoksnio ir vandens virš nuosėdų gylio santykis turėtų būti maždaug 1:4. Reikėtų naudoti veisimo narvelius (visi trys matmenys ne mažesni kaip 30 cm), kurių viršus ir mažiausiai vienas

([1]) Gėlojo vandens soties ore vertė (ASV) 20 °C temperatūros ir standartinio atmosferos slėgio sąlygomis lygi 9,1 mg/l (60 % sudaro 5,46 mg/l).

▼M6

šonas turėtų būti metalinis tinklelis (akučių dydis maždaug 1 mm) (žr. 5 priedėlį). Į kiekvieną narvelį dedamas 2 l kristalizatorius su bandymo vandeniu ir nuosėdomis, skirtas kiaušinėliams dėti. Kristalizatoriaus nuosėdų sluoksnio ir vandens virš nuosėdų gylio santykis taip pat turėtų būti maždaug 1:4. Kiaušinėlių krūveles surinkus iš kristalizatoriaus, jos dedamos į 12 duobučių mikrotitravimo plokštelę (po vieną krūvelę į duobutę, kurioje yra ne mažiau kaip 2,5 ml sodrinto kristalizatoriaus vandens), plokštelės uždengiamos dangčiu, kad būtų išvengta reikšmingo garavimo. Taip pat galima naudoti kitus indus, kurie tiktų kiaušinėlių krūvelėms laikyti. Išskyrus mikrotitravimo plokšteles, visi bandymo indai ir kita aparatūra, kuri galėtų liestis su bandymo sistema, turėtų būti pagaminta vien tik iš stiklo arba kitos chemiškai inertinės medžiagos (pvz., politetrafluoretileno).

Rūšių pasirinkimas

12. Atliekant bandymą pageidautina naudoti *Chironomus riparius*. Taip pat galima naudoti *C. yoshimatsui*. *C. dilutus* irgi tinka, bet šią rūšį sunkiau prižiūrėti ir bandymo trukmė turi būti ilgesnė. *C. riparius* kultūrų auginimo metodai pateikti 2 priedėlyje. Taip pat yra informacijos apie *C. dilutus* (5) and *C. yoshimatsui* (14) kultūrų auginimo sąlygas. Rūšies tapatybę reikėtų patvirtinti prieš bandymą, tačiau tai daryti nebūtina prieš kiekvieną bandymą, jei organizmas paimtas iš vietoje išaugintos kultūros.

Nuosėdos

13. Pageidautina naudoti dirbtines nuosėdas (kitaip vadinamas atkurtąsias ar sintetines nuosėdas). Tačiau naudojant natūralias nuosėdas reikėtų nurodyti jų charakteristikas (bent pH, organinės anglies kiekį, taip pat rekomenduojama nustatyti kitus parametrus, pvz., C/N santykį ir granuliometrinę sudėtį) ir jose neturėtų būti jokių teršalų ir kitų organizmų, kurie galėtų konkuruoti su chironomidų lervomis arba jas vartoti. Taip pat rekomenduojama nuosėdas prieš bandymą kondicionuoti bandymo sąlygomis septynias dienas. Rekomenduojama tokia dirbtinių nuosėdų sudėtis (1) (20) (21), kaip aprašyta (1):

a. 4–5 % (sausos medžiagos masės) durpių: pH turėtų būti kuo artimesnis vertės intervalui nuo 5,5 iki 6,0; svarbu, kad durpės būtų smulkiai sumaltos (dalelių dydis ≤ 1 mm) ir išdžiovintos tik ore;

b. 20 % (sausos medžiagos masės) kaolino molio (pageidautina, kad kaolinito kiekis būtų didesnis kaip 30 %);

c. 75–76 % (sausos medžiagos masės) kvarcinio smėlio (smulkusis smėlis, kurio dalelės yra 50–200 μm turėtų sudaryti daugiau kaip 50 procentų kiekio);

d. įpilama dejonizuoto vandens, kad galutinio mišinio vandens kiekis būtų nuo 30–50 %;

e. įdedama chemiškai gryno kalcio karbonato ($CaCO_3$), kad būtų galima nustatyti galutinio nuosėdų mišinio pH vertę 7,0 ± 0.5;

f. galutinio nuosėdų mišinio organinės anglies kiekis turėtų būti 2 % (± 0 5 %) ir jį reikia reguliuoti dedant reikiamą durpių ir smėlio kiekį, kaip nurodyta nuo (a) iki (c).

14. Turėtų būti žinomas durpių, kaolino molio ir smėlio šaltinis. Nuosėdų komponentus reikėtų patikrinti, ar juose nėra cheminės taršos (pvz.,

▼M6

sunkiųjų metalų, chloro organinių junginių, fosforo organinių junginių). Dirbtinių nuosėdų paruošimo pavyzdys aprašytas 3 priedėlyje. Taip pat galima ruošti sausų sudedamųjų dalių mišinį, jei įrodoma, kad užpylus ant jų vandens neatsiskiria nuosėdų sudedamosios dalys (pvz., neplūduriuoja durpių dalelės) ir kad durpės ar nuosėdos yra pakankamai kondicionuotos.

Vanduo

15. Kaip bandymo vanduo tinka bet koks vanduo, kuris atitinka 2 ir 4 priedėliuose išvardytas priimtino skiedimo vandens chemines savybes. Kultūroms auginti ir bandymui atlikti tinka bet koks natūralus vanduo (paviršinis ar gruntinis), atkurtasis vanduo (žr. 2 priedėlį) ar vandentiekio vanduo, iš kurio pašalintas chloras, jei chironomidai jame be streso požymių išgyventų visą kultūros auginimo ir bandymo laikotarpį. Bandymo pradžioje vandens pH vertė turėtų būti nuo 6 iki 9, o suminis kietumas, išreikštas $CaCO_3$, ne didesnis kaip 400 mg/l. Tačiau, jei įtariama, kad yra sąveika tarp kietumo jonų ir bandomosios cheminės medžiagos, reikėtų naudoti mažesnio kietumo vandenį (todėl šiuo atveju nereikėtų naudoti Elendt M4 terpės). Visą tyrimo laikotarpį reikėtų naudoti to paties tipo vandenį. 4 priedėlyje išvardytas vandens kokybės charakteristikas reikėtų matuoti ne rečiau kaip du kartus per metus arba kilus įtarimui, kad jos gerokai pakito.

Pradiniai tirpalai. Sodrintas vanduo

16. a. Bandymo koncentracijos vertės skaičiuojamos pagal vandens sluoksnio, t. y. vandens virš nuosėdų koncentracijos vertes. Pasirinktų koncentracijos verčių bandymo tirpalai paprastai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Pageidautina, kad pradiniai tirpalai būtų ruošiami bandomąją cheminę medžiagą ištirpinant bandymo vandenyje. Kartais gali tekti naudoti tirpiklius arba dispergentus, kad būtų galima gauti tinkamos koncentracijos pradinį tirpalą. Tinkamas tirpiklis, pavyzdžiui, gali būti acetonas, metoksietanolis, etilenglikolio dimetileteris, dimetilformamidas ir trietilenglikolis. Kaip dispergentą galima naudoti Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % metilceliuliozę ir HCO-40. Soliubilizavimo priemonės koncentracija galutinėje bandymo terpėje turėtų būti kiek įmanoma mažesnė t. y. $\leq$ 0,1 ml/l) ir ir ji turėtų būti vienoda visuose veikimo induose. Naudojama soliubilizavimo priemonė neturėtų daryti reikšmingo poveikio išgyvenamumui, kurį rodytų tirpiklio kontroliniai bandiniai, palyginti su neigiamu (vandens) kontroliniu bandiniu. Tačiau reikėtų dėti visas pastangas, kad būtų išvengta tokių medžiagų naudojimo.

Pradiniai tirpalai. Sodrintos nuosėdos

16. b. Pasirinktos koncentracijos sodrintos nuosėdos paprastai ruošiamos tiesiogiai į nuosėdas įpilant bandomosios cheminės medžiagos tirpalo. Dejonizuotame vandenyje ištirpintas bandomosios cheminės medžiagos pradinis tirpalas maišomas su dirbtinėmis nuosėdomis valciniu malūnu, pašarų maišikliu arba rankiniu būdu. Jei bandomoji cheminė medžiaga blogai tirpsta vandenyje, ją galima ištirpinti kuo mažesniame tinkamo organinio tirpiklio (pvz., heksano, acetono arba chloroformo) kiekyje. Šis tirpalas maišomas su 10 g smulkaus kvarcinio smėlio vienam bandymo indui. Palaukiama tol, kol tirpiklis išgaruoja ir visiškai pašalinamas iš smėlio; tada smėlis sumaišomas su reikiamu nuosėdų kiekiu. Bandomajai cheminei medžiagai soliubilizuoti, disperguoti ar emulguoti galima naudoti tik labai lakias medžiagas. Reikėtų turėti omenyje, kad į smėlio kiekį, gautą su bandomosios cheminės medžiagos ir smėlio mišiniu, turi būti atsižvelgta ruošiant nuosėdas (t. y. jas reikėtų ruošti imant mažiau smėlio). Reikėtų imtis priemonių užtikrinant, kad į nuosėdas įterpta

▼M6

bandomoji cheminė medžiaga būtų visiškai ir tolygiai paskirstyta nuosėdose. Prireikus galima analizuoti mažesnius bandinius vienalytiškumo laipsniui nustatyti.

BANDYMO SCHEMA

17. Pagal bandymo schemą parenkamas bandymo koncentracijos verčių skaičius, tarpai tarp jų, kiekvienos koncentracijos indų skaičius, lervų skaičius inde, kristalizatorių ir veisimo narvelių skaičius. ECx, NOEC ir ribinio bandymo schemos aprašytos toliau.

Regresinės analizės schema

18. Bandymas turėtų apimti poveikio koncentraciją (EC_x,) ir dominantį koncentracijos verčių intervalą, kuriame pasireiškia bandomosios cheminės medžiagos poveikis, taip, kad vertinamosios baigties nereikėtų ekstrapoliuoti už gautų duomenų ribų. Reikėtų vengti ekstrapoliuoti iki daug mažesnės nei mažiausioji ir virš daug didesnės nei didžiausioji koncentracijos verčių. Parengiamasis intervalo nustatymo bandymas pagal C.27 ar C.28 bandymo metodus gali padėti pasirenkant tinkamą bandymo koncentracijų intervalą.

19. EC_x nustatyti reikia naudoti ne mažiau kaip penkias koncentracijos vertes ir aštuonis kartotinius vienos koncentracijos bandinius. Kiekvienai koncentracijai reikėtų naudoti du veisimo narvelius (A ir B). Aštuoni kartotiniai bandiniai padalijami į dvi grupes po keturis kartotinius bandinius, skirtus kiekvienam veisimo narveliui. Kartotinių bandinių grupavimas yra būtinas, atsižvelgiant į reikiamą mašalų skaičių narvelyje, kad būtų galima patikimai įvertinti reprodukciją. Tačiau 2-oji karta irgi turi aštuonis kartotinius bandinius, gautus iš veikiamų populiacijų veisimo narvelių. Koncentracijos verčių skirtumo faktorius neturėtų būti didesnis nei du (išimtis galima tais atvejais, kai dozės ir atsako kreivės krypties koeficientas yra mažas). Kiekvienos apdorojimo dozės kartotinių bandinių skaičių galima sumažinti iki šešių (po tris kiekvienam veisimo narveliui), jei skirtingą atsaką sukeliančių bandymo koncentracijos verčių skaičius yra padidėjęs. Didinant kartotinių bandinių skaičių arba mažinant tarpus tarp bandymo koncentracijos verčių gaunami siauresni EC_x pasikliovimo intervalai.

NOEC įvertinimo schema

20. Jei norima nustatyti NOEC, reikėtų naudoti penkias koncentracijos vertes ir ne mažiau kaip aštuonis kartotinius vienos koncentracijos bandinius (po 4 kiekvienam veisimo A ir B narveliui), o koncentracijos verčių skirtumo faktorius neturėtų būti didesnis nei du. Kartotinių bandinių skaičius turėtų būti pakankamas, kad būtų užtikrinta reikiama statistinė galia 20 % skirtumui su kontroliniais bandiniais aptikti, esant 5 % reikšmingumo lygiui (α = 0,05). Vystymosi spartai, vislumui ir vaisingumui paprastai tinka dispersinė analizė (ANOVA), po to taikant Dunnett ar Williams kriterijų (22–25). Išsinėrimo santykiui ir lyčių santykiui gali tikti Cochran-Armitage, Fisher tikslusis kriterijus (su Bonferroni pataisa) ar Mantel-Haentzal kriterijai.

Ribinis bandymas

21. Ribinį bandymą galima atlikti (viena bandymo koncentracija ir kontrolinis (-iai) bandinys (-iai)), jei atliekant neprivalomą parengiamąjį intervalo nustatymo bandymą nebuvo nustatyta jokių poveikių. Ribinio bandymo

▼M6

tikslas – įrodyti, kad bandomosios cheminės medžiagos toksinis poveikis pasireiškia esant koncentracijai, kuri yra didesnė nei bandyta ribinė koncentracija. Vandeniui siūloma 100 mg/l, o nuosėdoms 1 000 mg/kg (sausos medžiagos masės) koncentracija. Paprastai būtini ne mažiau kaip aštuoni kartotiniai apdorojimo dozės ir kontroliniai bandiniai. Reikėtų įrodyti, kad yra reikiama statistinė galia 20 % skirtumui su kontroliniais bandiniais aptikti, esant 5 % reikšmingumo lygiui (α = 0,05). Metrinių vienetų atsakui (pvz., vystymosi sparta) tinkamas statistinis metodas yra *t* kriterijus, jei duomenys atitinka šio kriterijaus reikalavimus (normalusis pasiskirstymas ir vienalytė dispersija). Jei duomenys neatitinka šių reikalavimų, galima taikyti nelygių dispersijų *t* kriterijų arba neparametrinį, pvz., Wilcoxon-Mann-Whitney kriterijų. Išsinėrimo santykiui tinka Fisher tikslusis kriterijus.

PROCEDŪRA

Veikimo bandomąja medžiaga sąlygos

Vandens ir nuosėdų sistemos paruošimas (vandens sodrinimas)

22. a. Į kiekvieną bandymo indą ir kristalizatorių įdedamas atitinkamas dirbtinių nuosėdų kiekis (žr. 13–14 pastraipas ir 3 priedėlį), kad susidarytų ne plonesnis kaip 1,5 cm sluoksnis (kristalizatoriaus sluoksnis galėtų būti šiek tiek plonesnis), bet ne storesnis kaip 3 cm. Vanduo (žr. 15 pastraipą) įpilamas taip, kad nuosėdų sluoksnio storio ir vandens gylio santykis būtų ne didesnis kaip 1:4. Paruošus bandymo indus, nuosėdų ir vandens sistemą reikėtų nestipriai aeruoti maždaug septynias dienas prieš įdedant 1-osios arba 2-osios kartos pirmosios stadijos lervas (žr. 14 pastraipą ir 3 priedėlį). Kristalizatorių nuosėdų ir vandens sistema bandymo metu neaeruojama, nes jie neturi užtikrinti lervų išgyvenamumo (prieš išsiritimą kiaušinėlių krūvelės jau yra surinktos). Prieš pilant vandenį ant nuosėdų, jas galima uždengti plastikiniu disku, kad nuosėdų sudedamosios dalys neatsiskirtų ir smulkiosios dalelės nebūtų iš naujo suspenduotos vandens sluoksnyje. Po to diskas nedelsiant išimamas. Taip pat galima naudoti kitus įtaisus.

Vandens ir nuosėdų sistemos paruošimas (nuosėdų sodrinimas)

22. b. Sodrintos nuosėdos, paruoštos pagal 16b pastraipą, dedamos į indus ir kristalizatorių ir ant jų užpilama tiek vandens, kad nuosėdų ir vandens tūrio santykis būtų 1:4. Nuosėdų sluoksnio storis turėtų būti nuo 1,5 iki 3 cm (kristalizatoriaus sluoksnis galėtų būti šiek tiek plonesnis). Prieš pilant vandenį ant nuosėdų, jas galima uždengti plastikiniu disku, kad nuosėdų sudedamosios dalys neatsiskirtų ir smulkiosios dalelės nebūtų iš naujo suspenduotos vandens sluoksnyje, o paskui diskas nedelsiant išimamas. Taip pat galima naudoti kitus įtaisus. Pageidautina, kad paruoštas sodrintas nuosėdas užpylus vandeniu, būtų palikta laiko bandomajai cheminei medžiagai pasiskirstyti tarp nuosėdų ir vandeninės fazės (4) (5) (7) (18). Būtų gerai, jei tai būtų daroma bandymo temperatūros ir aeravimo sąlygomis. Reikiama pusiausvirinimo trukmė priklauso nuo nuosėdų ir cheminės medžiagos savybių ir gali būti nuo kelių valandų iki kelių dienų, o retais atvejais – iki penkių savaičių. Kadangi per tą laiką galėtų įvykti daugelio cheminių medžiagų suskaidymas, pusiausvyros nelaukiama ir rekomenduojamas 48 h pusiausvirinimo laikotarpis. Tačiau, jei žinoma, kad cheminės medžiagos skaidymo nuosėdose pusėjimo trukmė yra ilga (žr. 8 pastraipą), pusiausvirinimo trukmę galima pailginti. Šio papildomo pusiausvirinimo laikotarpio pabaigoje reikėtų matuoti bandomosios cheminės medžiagos bent didžiausios ir mažiausios dozės koncentraciją vandenyje virš nuosėdų, porų vandenyje ir nuosėdose (žr. 38 pastraipą). Pagal šiuos bandomosios cheminės medžiagos analizės duomenis, atsižvelgiant į išmatuotas koncentracijos vertes, galima apskaičiuoti masės balansą ir pateikti rezultatus.

23. Bandymo indus reikėtų uždengti (pvz., stiklinėmis plokštelėmis). Prireikus tyrimo metu leidžiama įpilti vandens iki pradinio tūrio garavimo nuostoliams kompensuoti. Reikėtų pilti distiliuotą arba dejonizuotą vandenį, kad

▼M6

būtų išvengta galimo druskų kaupimosi. Kristalizatorių veisimo narveliuose uždengti nereikia ir garavimo nuostolius bandymo laikotarpiu galima kompensuoti, bet nebūtina, nes kiaušinėlių krūvelių sąlytis su vandeniu trunka tik maždaug vieną dieną ir kristalizatoriai naudojami tik trumpą bandymo tarpsnį.

Bandymo organizmų įdėjimas

24. Keturias ar penkias dienas prieš įdedant 1-osios kartos pirmosios stadijos lervas kiaušinėlių krūveles reikėtų paimti iš kultūros ir sudėti į mažus indus su auginimo terpe. Galima naudoti pradinės kultūros terpę arba paimti iš naujo paruoštą terpę. Abiem atvejais į auginimo terpę reikėtų įdėti truputį maisto, pvz., kelis lašus smulkiai sumaltų žuvų maisto dribsnių suspensijos filtrato (žr. 2 priedėlį). Reikėtų naudoti tik neseniai padėtų kiaušinėlių krūveles. Paprastai lervos ima ristis praėjus kelioms dienoms po kiaušinėlių padėjimo (nuo 2 iki 3 dienų *C. riparius* 20 °C ir nuo 1 iki 4 dienų *C. dilutus* 23 °C ir *C. yoshimatsui* 25 °C), ir lervos auga per keturias stadijas, iš kurių kiekviena trunka 4–8 dienas. Atliekant bandymą reikėtų naudoti pirmosios stadijos lervas (ne vėliau kaip 48 h po išsiritimo). Pirmosios stadijos lervas būtų galima atpažinti pagal galvos kapsulės plotį (7).

25. Dvidešimt 1-osios kartos pirmosios stadijos lervų buka pipete atsitiktinai paskirstoma į kiekvieną bandymo indą su nuosėdų ir vandens sistema. Vandens aeravimas nutraukiamas dedant lervas į bandymo indą ir dar 24 h neaeruojamas po lervų įdėjimo (žr. 32 pastraipą). Atsižvelgiant į taikomą bandymo schemą (žr. 19 ir 20 pastraipas) vienai koncentracijai turi tekti ne mažiau kaip 120 lervų (6 kartotiniai vienos koncentracijos bandiniai), jei nustatoma EC_x, ir 160 lervų (8 kartotiniai vienos koncentracijos bandiniai), nustatomas ES taškas, arba 80 lervų, jei nustatoma NOEC. Taikant sodrintų nuosėdų schemą, bandomoji medžiaga įterpiama nuo lervų įdėjimo etapo.

Vandens virš nuosėdų sodrinimas

26. Po dvidešimt keturių valandų nuo 1-osios kartos pirmosios stadijos lervų įdėjimo vanduo virš nuosėdų sodrinamas bandomąja chemine medžiaga ir vėl pradedama nestipriai aeruoti (dėl galimų nedidelių bandymo schemos pakeitimų žr. 7 pastraipą). Maži bandomosios cheminės medžiagos tirpalų tūriai pipete įterpiami po vandens paviršiumi. Tada vanduo virš nuosėdų atsargiai maišomas taip, kad nebūtų sudrumstos nuosėdos. Taikant sodrinto vandens schemą, bandomoji medžiaga įterpiama nuo vandens sodrinimo (t. y. praėjus vienai dienai po lervų įdėjimo) etapo.

Suaugusių mašalų surinkimas

27. Išsinėrę 1-osios kartos mašalai surenkami iš bandymo indų siurbtuku, ištraukiamuoju arba panašiu įtaisu (žr. 5 priedėlį) mažiausiai kartą, bet geriau – du kartus per dieną (žr. 36 pastraipą). Reikėtų imtis specialių atsargumo priemonių, kad mašalai nebūtų sužaloti. Iš keturių tos pačios bandomosios dozės indų surinkti mašalai išleidžiami į veisimo narvelį, kuriam jie buvo prieš tai priskirti. Pirmojo (patino) išsinėrimo dieną kristalizatoriai sodrinami, pipete įlašinant nedidelį bandomosios cheminės medžiagos pradinio tirpalo tūrį žemiau vandens paviršiaus (sodrinto vandens schema). Tada vanduo virš nuosėdų atsargiai maišomas taip, kad nebūtų sudrumstos nuosėdos. Į kristalizatorius įpiltos bandomosios cheminės medžiagos koncentracija nominaliai atitinka bandymo indų, kurie yra priskirti tam konkrečiam veisimo narveliui, koncentraciją. Jei taikoma sodrintų nuosėdų schema, kristalizatoriai paruošiami maždaug 11 dieną nuo veikimo bandomąja medžiaga pradžios (t. y nuo lervų 1-osios

▼M6

kartos įdėjimo), taigi jų pusiausvirinimas gali vykti maždaug 48 h iki atsiranda pirmosios kiaušinėlių krūvelės.

28. Kiaušinėlių krūvelės surenkamos iš kristalizatorių ir pincetu arba buka pipete pernešamos į veisimo narvelį. Kiekviena kiaušinėlių krūvelė dedama į indą su auginimo terpe iš to kristalizatoriaus, iš kurio ji buvo paimta (pvz., į 12 duobučių mikrotitravimo plokštelės duobutę kartu su ne mažiau kaip 2,5 ml terpės). Indai su kiaušinėlių krūvelėmis uždengiami dangčiu, kad būtų išvengta stipraus garavimo.

Kiaušinėlių krūvelės paliekamos stebėti ne mažiau kaip šešias dienas nuo jų gavimo, taigi jas galima klasifikuoti kaip vaisingas arba nevaisingas. 2-oji karta pradedama iš kiekvieno veisimo narvelio pasirenkant ne mažiau kaip tris, bet geriau šešias vaisingų kiaušinėlių krūveles, ir paliekama išsiristi, pridėjus truputį maisto. Kiaušinėlių krūvelės turėtų būti gautos didžiausio kiaušinėlių dėjimo momentu, kuris kontroliniuose bandiniuose paprastai būna maždaug 19 bandymo dieną. Geriausia būtų, kad visų bandomosios medžiagos dozių 2-oji karta būtų pradėta tą pačią dieną, bet tai gali būti ne visuomet įmanoma dėl su chemine medžiaga susijusio poveikio lervų vystymuisi. Tokiu atveju didesnės koncentracijos bandinių 2-oji karta būtų pradėta vėliau nei mažesnės dozės ir kontrolinis (tirpiklio) bandiniai.

29. a. Taikant sodrinto vandens schemą, 2-ajai kartai skirta nuosėdų ir vandens sistema ruošiama vandens virš nuosėdų sluoksnį sodrinant bandomąja chemine medžiaga maždaug 1 h prieš įdedant pirmosios stadijos lervas į bandymo indus. Pipete įlašinami nedideli bandomosios cheminės medžiagos pradinių tirpalų tūriai žemiau vandens paviršiaus. Paskui vanduo virš nuosėdų atsargiai maišomas taip, kad nebūtų sudrumstos nuosėdos. Po sodrinimo nestipriai aeruojama.

29. b. Taikant sodrintų nuosėdų schemą, 2-ajai kartai skirta veikimo indų nuosėdų ir vandens sistema ruošiama taip pat, kaip ir 1-ajai kartai.

30. Dvidešimt 2-osios kartos pirmosios stadijos lervų (ne vėliau kaip 48 h po išsiritimo) buka pipete atsitiktinai paskirstoma į kiekvieną bandymo indą su sodrinta nuosėdų ir vandens sistema. Vandens aeravimas nutraukiamas į bandymo indus dedant pirmą pirmosios stadijos lervą ir dar 24 h neaeruojamas po lervų įdėjimo. Atsižvelgiant į taikomą bandymo schemą (žr. 19 ir 20 pastraipas) vienai koncentracijai turi tekti ne mažiau kaip 120 lervų (6 kartotiniai vienos koncentracijos bandiniai), jei nustatoma EC_x, ir 160 lervų (8 kartotiniai vienos koncentracijos bandiniai), nustatomas ES taškas, arba 80 lervų, jei nustatoma NOEC.

Maistas

31. Lervas bandymo induose būtina maitinti, pageidautina, kiekvieną dieną ar bent tris kartus per savaitę. Per pirmąsias jaunų lervų vystymosi 10 parų turėtų pakakti 0,25–0,5 mg (*C. yoshimatui* lervoms 0,35–0,5 mg) per dieną žuvų maisto (vandeninės suspensijos arba smulkiai sumalto maisto, pvz., Tetra-Min arba Tetra-Phyll, išsami informacija pateikta 2 priedėlyje). Vyresnėms lervoms pašaro gali prireikti šiek tiek daugiau: likusiai bandymo trukmės daliai turėtų pakakti 0,5–1 mg vienai lervai per dieną. Maisto kiekį reikėtų sumažinti visų veikimo dozių ir kontrolinių bandinių atvejais, jei nustatomas grybelio augimas arba stebimas kontrolinės grupės gyvūnų gaištamumas. Jei grybelio augimo nepavyksta sustabdyti, bandymą reikėtų pakartoti.

Toksikologinio poveikio per virškinamąjį traktą svarba paprastai yra didesnė tų cheminių medžiagų, kurios rodo didelį giminingumą organinei

▼M6

angliai arba su nuosėdomis jungiasi kovalentinėmis jungtimis, atveju. Todėl bandant tokių savybių medžiagas, lervų išgyvenamumui ir natūraliam augimui užtikrinti maistą į dirbtines nuosėdas reikia dėti prieš stabilizavimo laikotarpį, atsižvelgiant į taikomus reguliavimo įstaigų reikalavimus. Siekiant išvengti vandens kokybės blogėjimo, vietoj žuvų maisto reikėtų naudoti augalines medžiagas, pvz., dėti 0,5 % (sausos medžiagos masės) smulkiai sumaltų didžiosios dilgėlės (*Urtica dioica*), baltojo šilkmedžio (*Morus alba*), persinio dobilo (*Trifolium repens*), daržinio špinato (*Spinacia oleracea*) lapų arba kitokių augalinių medžiagų (*Cerophyl* arba *α*-celiuliozės). Viso organinio maisto šaltinio davinio pridėjimas į nuosėdas prieš sodrinimą nėra nereikšmingas, kalbant apie vandens kokybę ir biologines charakteristikas (21), be to, jis nėra standartizuotas metodas, bet nauji tyrimai pateikia įrodymų, kad šis metodas yra efektyvus (19) (26). Suaugusių mašalų veisimo narveliuose paprastai maitinti nereikia, bet vislumas ir vaisingumas padidėja, kai sočiajame sacharozės tirpale įmirkytas medvilninis tamponas duodamas kaip išsinėrusių mašalų maisto šaltinis (34).

Inkubavimo sąlygos

32. Praėjus 24 h po abiejų kartų pirmos pirmosios stadijos lervos įdėjimo, pradedama nestipriai aeruoti vandenį virš nuosėdų bandymo induose ir toliau aeruojama per visą bandymo trukmę (būtina užtikrinti, kad ištirpusio deguonies koncentracija nesumažėtų iki mažesnės kaip 60 % soties ore vertės (ASV)). Aeruojama per stiklinę Pastero pipetę, kurios išėjimo anga yra 2–3 cm virš nuosėdų paviršiaus ir per kurią tiekiama keli burbuliukai per sekundę. Bandant lakiąsias chemines medžiagas, reikėtų pagalvoti apie tai, kad nuosėdų ir vandens sistema nebūtų aeruojama, bet tuo pačiu metu ji atitiktų ne mažesnės kaip 60 % ASV (10 pastraipa) tinkamumo kriterijų. Kitos rekomendacijos pateiktos (16).

33. Bandymas su *C. riparius* atliekamas pastovioje 20 °C (± 2 °C) temperatūroje. *C. dilutus* ir *C. yoshimatsui* rekomenduojama 23 °C ir 25 °C (± 2 °C) temperatūra. Naudojama 16 h dienos šviesos trukmė, o apšvieta turėtų būti nuo 500 liuksų iki 1 000 liuksų. Veisimo narveliams galima numatyti vienos valandos aušros ir sutemų tarpsnį.

Ekspozicijos trukmė

34. Sodrinto vandens schema: 1-osios kartos veikimo bandomąja medžiaga laikotarpis prasideda, kai į bandymo indų vandenį virš nuosėdų įpurškiama bandomoji cheminė medžiaga (praėjus vienai dienai po lervų įdėjimo; dėl galimų bandymo schemos pakeitimų žr. 7 pastraipą). 2-osios kartos veikimas bandomąja medžiaga prasideda nedelsiant, nes lervos įdedamos į jau sodrintą nuosėdų ir vandens sistemą. Maksimali *C. riparius* ir *C. yoshimatsui* 1-osios kartos veikimo trukmė yra 27 dienos, o 2-osios – 28 dienos (1-osios kartos lervos vieną dieną induose būna neveikiamos bandomąja medžiaga). Atsižvelgiant į sanklotą, visa bandymo trukmė yra maždaug 44 dienos. Maksimali *C. dilutus* 1-osios kartos veikimo trukmė yra 64 dienos, o 2-osios kartos – 65 dienos. Visa bandymo trukmė yra maždaug 100 dienų.

Sodrintų nuosėdų schema: veikimas prasideda nuo lervų įdėjimo ir abiejų kartų *C. riparius* bei *C. yoshimatsui* maksimali trukmė yra 28 dienos, o *C. dilutus* abiejų kartų maksimali trukmė – 65 dienos.

Stebėjimai

Išsinėrimas

35. Nustatoma abiejų kartų vystymosi trukmė ir suminis visiškai išsinėrusių mašalų patinų ir patelių skaičius. Patinai nesunkiai atpažįstami pagal jų plunksniškus čiuptuvėlius ir plono kūno padėtį.

▼M6

36. Abiejų kartų bandymo indus reikėtų apžiūrėti ne mažiau kaip tris kartus per savaitę, kad būtų galima vizualiai įvertinti kokį nors nenormalų lervų elgesį (pvz., pasišalinimą iš nuosėdų, neįprastą plaukimą) palyginti su kontroliniais bandiniais. Išsinėrimo laikotarpiu, kuris prasideda praėjus maždaug 12 dienų nuo *C. riparius* ir *C. yoshimatsui* lervų įdėjimo (*C. dilutus* – 20 dienų), atsiradę mašalai suskaičiuojami ir mažiausiai kartą, bet geriau – du kartus per dieną (anksti ryte ir vėlyvą popietę) nustatoma jų lytis. Identifikuoti 1-osios kartos mašalai atsargiai išimami iš indų ir pernešami į veisimo narvelius. Identifikuoti 2-osios kartos mašalai nužudomi. Visos kiaušinėlių krūvelės, padėtos 1-osios kartos bandymo induose, turėtų būti surenkamos atskirai ir kartu su ne mažiau kaip 2,5 ml vietinio vandens pernešamos į 12 duobučių mikrotitravimo plokšteles (arba kitus tinkamus indus), kurios uždengiamos dangčiu, kad būtų išvengta stipraus garavimo. Taip pat reikėtų užrašyti negyvų lervų ir vabzdžiais nevirtusių lėliukių skaičius. Veisimo narvelio, bandymo indo ir ištraukiamojo įtaiso pavyzdžiai pateikti 5 priedėlyje.

Reprodukcija

37. Poveikis reprodukcijai vertinamas pagal 1-osios kartos mašalų padėtų kiaušinėlių krūvelių skaičių ir šių kiaušinėlių krūvelių vaisingumą. Kartą per dieną kiaušinėlių krūvelės surenkamos iš kristalizatorių, padėtų į kiekvieną veisimo indą. Reikėtų paimti kiaušinėlių krūveles su ne mažiau kaip 2,5 ml vietinio vandens ir pernešti į 12 duobučių mikrotitravimo plokšteles (viena kiaušinėlių krūvelė kiekvienoje duobutėje) arba į kitokius tinkamus indus, kurie uždengiami dangčiu, kad būtų išvengta stipraus garavimo. Užrašomos ir dokumentuojamos šios kiekvienos kiaušinėlių krūvelės charakteristikos: gavimo diena, dydis (normalus, t. y. 1,0 ± 0,3 cm, ar mažas, paprastai ≤ 0,5 cm) ir sandara (normali – banano formos su spiraline kiaušinėlių virtine ar nenormali, pvz., nespiralinė kiaušinėlių virtinė) ir vaisingumas (vaisinga ar nevaisinga). Kiaušinėlių krūvelės vaisingumas vertinamas šešių dienų laikotarpiu po jos gavimo. Kiaušinėlių krūvelė laikoma vaisinga, jei ne mažiau kaip iš trečdalio kiaušinėlių išsirita lervos. Į veisimo narvelį įdėtų patelių suminis skaičius naudojamas vienai patelei tenkančių kiaušinėlių krūvelių ir vaisingų kiaušinėlių krūvelių skaičiui nustatyti. Prireikus galima įvertinti kiaušinėlių skaičių kiaušinėlių krūvelėje neardomuoju būdu, taikant žiedinį skaičiavimo metodą (išsamiai aprašytas 32 ir 33 nuorodose).

Analiziniai matavimai

Bandomosios cheminės medžiagos koncentracija

38. Reikėtų matuoti bent didžiausios ir mažiausios dozės vandens virš nuosėdų, porų vandens ir nuosėdų bandinių koncentraciją veikimo bandomąja medžiaga pradžioje (vandens sodrinimo atveju reikėtų matuoti vieną valandą po medžiagos įdėjimo) ir bandymo pabaigoje. Tai taikytina abiejų kartų indams. Veisimo narvelių kristalizatorių atveju analizuojamas tik vanduo virš nuosėdų, nes tik su juo liečiasi kiaušinėlių krūvelės (jei taikoma sodrinamų nuosėdų schema, būtų galima numatyti nuosėdų koncentracijos analizinį patvirtinimą). Galima atlikti papildomus nuosėdų, porų vandens ar vandens virš nuosėdų koncentracijos matavimus bandymo eigoje, jei manoma, kad tai yra būtina. Šis bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos nustatymas suteikia informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos elgesį ir (arba) pasiskirstymą vandens ir nuosėdų sistemoje. Jei imami nuosėdų ir porų vandens bandiniai bandymo pradžioje ir jo eigoje (žr. 39 pastraipą), reikia turėtų papildomų bandymo indų analizei atlikti. Jei taikoma sodrinto vandens schema, matuoti koncentraciją nuosėdose galėtų būti nebūtina, jei bandomosios cheminės medžiagos pasiskirstymas tarp vandens ir nuosėdų buvo aiškiai nustatytas atliekant vandens ir nuosėdų tyrimą palyginamomis sąlygomis (pvz., nuosėdų ir vandens santykio, taikymo tipo, nuosėdų organinės

▼M6

anglies kiekio) arba jei buvo įrodyta, kad išmatuota koncentracija vandenyje virš nuosėdų yra nuo 80 % iki 120 % nominaliosios arba išmatuotos pradinės koncentracijos.

39. Kai atliekami tarpiniai matavimai (pvz., 7 ir (arba) 14 dieną) ir jei analizei reikia turėti didesnius bandinius, kurių negalima paimti iš bandymo indų nepaveikiant bandymo sistemos, analizę reikėtų atlikti imant bandinius iš taip pat paruoštų (įskaitant bandymo organizmų buvimą) papildomų bandymo indų su bandomąja medžiaga, kurie nebūtų naudojami biologiniams stebėjimams.

40. Rekomenduojama intersticinio (t. y. porų) vandens atskyrimo procedūra yra 30 min trukmės centrifugavimas, pvz., 10 000 *g* 4 °C temperatūroje. Tačiau, jei įrodoma, kad bandomosios cheminės medžiagos filtrai neadsorbuoja, taip pat galėtų tikti filtravimas. Kartais dėl per mažo bandinio tūrio gali būti neįmanoma analizuoti porų vandens koncentracijų.

Fizikiniai ir cheminiai parametrai

41. Tinkamu būdu reikėtų išmatuoti bandymo indų ir kristalizatorių vandens pH, bandymo vandenyje ištirpusio deguonies ir temperatūros vertes (žr. 10 pastraipą). Bandymo pradžioje ir jo pabaigoje reikėtų išmatuoti kontrolinių bandinių bei vieno bandymo indo ir kristalizatoriaus su didžiausia koncentracija vandens kietumą ir amoniako kiekį.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

42. Šio gyvavimo ciklo bandymo tikslas – nustatyti cheminės medžiagos poveikį reprodukcijai ir dviejų kartų vystymosi spartai bei visiškai išsinėrusių ir gyvų mašalų patinų ir patelių suminiam skaičiui. Patinų ir patelių išsinėrimo santykio duomenis reikėtų sujungti. Jei nėra statistiškai reikšmingų atskirų lyčių vystymosi spartos jautrių skirtumų, galima sujungti statistinei analizei skirtus patinų ir patelių rezultatus.

43. Poveikio koncentracijos vertės, išreikštos kaip koncentracija vandenyje virš nuosėdų (sodrinto vandens) arba nuosėdose (sodrintų nuosėdų), paprastai apskaičiuojamos pagal ekspozicijos pradžioje išmatuotas koncentracijos vertes (žr. 38 pastraipą). Todėl, jei sodrinamas vanduo, abiejų kartų bandymo indų ir kristalizatorių vandens virš nuosėdų koncentracijos vertės, paprastai išmatuotos veikimo bandomąją medžiaga pradžioje, suvidurkinamos kiekvienai bandomosios medžiagos dozei. Jei sodrinamos nuosėdos, abiejų kartų bandymo indų (ir gal būt kristalizatorių) koncentracijos vertės, paprastai išmatuotos veikimo bandomąją medžiaga pradžioje, suvidurkinamos kiekvienai bandomosios medžiagos dozei.

44. Siekiant apskaičiuoti taškinį įvertį, t. y. EC_x, indo ir veisimo narvelio statistiniai duomenys gali būti naudojami kaip tikrieji kartotiniai bandiniai. Skaičiuojant EC_x pasikliovimo lygmenį, reikėtų atsižvelgti į kintamumą tarp indų arba reikėtų įrodyti, kad šis kintamumas yra toks mažas, kad į jį galima nekreipti dėmesio. Kai modelio atitiktis tikrinama mažiausiųjų kvadratų metodu, reikėtų atlikti indo statistinių duomenų transformaciją, kad būtų pagerintas dispersijos vienalytiškumas. Tačiau EC_x vertes reikėtų skaičiuoti po to, kai atsakas yra transformuotas atgal į pradinę vertę (31).

▼M6

45. Kai statistinės analizės tikslas yra NOEC nustatymas tikrinant hipotezę, reikia atsižvelgti į kintamumą tarp indų, ir tai įmanoma taikant ANOVA metodus (pvz., Williams ir Dunnett kriterijų procedūras). Williams kriterijus tiktų, kai daroma teorinė prielaida, kad dozės ir atsako priklausomybė yra monotoniška, o Dunnett kriterijus tiktų, jei monotoniškumo hipotezė nepasitvirtina. Kaip alternatyvą tais atvejais, jei pažeidžiamos įprastinės ANOVA prielaidos (31), būtų galima taikyti patikimesnius kriterijus (27).

Išsinėrimo santykis

46. Išsinėrimo santykiai yra dichotominiai duomenys ir juos galima analizuoti mažėjimo tvarka taikant Cochran-Armitage kriterijų, jei manoma, kad dozės ir atsako priklausomybė yra monotoniška ir duomenys atitinka šią prielaidą. Jei neatitinka, galima taikyti tikslųjį Fisher arba Mantel-Haentzal kriterijų, darant Bonferroni-Holm p verčių pataisą. Jei yra įrodymų, kad tarp kartotinių vienos koncentracijos bandinių kintamumas yra didesnis nei pagal binominį skirstinį (dažnai vadinamas perviršiniu binominiu kintamumu), tada reikėtų taikyti stiprųjį Cochran-Armitage arba tikslųjį Fisher kriterijų, kuris pateiktas (27).

Nustatoma vieno indo išsiritusių gyvų mašalų (patinų ir patelių) skaičiaus suma n_e ir padalijama iš įdėtų lervų skaičiaus n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a},$$

čia:

ER – išsinėrimo santykis;

n_e – vieno indo išsinėrusių gyvųjų mašalų skaičius;

n_a – į vieną indą įdėtų lervų skaičius (paprastai 20).

Kai n_e yra didesnis kaip n_a (t. y., jei netyčia buvo įdėtas didesnis nei numatyta lervų skaičius), n_a reikėtų sulyginti su n_e.

47. Alternatyvus būdas, kuris labiausiai tinka didelio dydžio imtims, kai yra perviršinė binominio pasiskirstymo dispersija, – tai laikyti, kad išsinėrimo santykis yra tolydusis atsakas, ir taikyti tokius *ER* duomenis atitinkančias procedūras. Šiuo atveju didelė imtis apibrėžiama kaip išsinėrusių mašalų skaičius ir neišsinėrusių lervų skaičius, kuris yra didesnis nei penki vienam kartotiniam bandiniui (indui).

48. Norint taikyti ANOVA metodus, iš pradžių reikėtų atlikti *ER* verčių kvadratinės šaknies arksinuso arba Tukey-Freeman transformaciją, kad būtų gautas apytikriai normalusis skirstinys ir būtų išlygintos dispersijos. Naudojant absoliučiuosius dažnumus galima taikyti Cochran-Armitage, Fisher tikslųjį (Bonferroni) arba Mantel-Haentzal kriterijus. Kvadratinės šaknies arksinuso transformacija yra *ER* kvadratinės šaknies atvirkštinio sinuso (sin^{-1}) skaičiavimas.

49. Išsinėrimo santykių EC_x vertės apskaičiuojamos taikant regresinę analizę (pvz., probit, logit arba Weibull modelius (28)). Jei regresinė analizė nepavyksta (pvz., kai yra mažiau kaip du daliniai atsakai), galima taikyti kitus neparametrinius metodus, pvz., slenkamojo vidurkio arba paprastosios interpoliacijos.

Vystymosi sparta

50. Vidutinė vystymosi trukmė yra vidutinis laikotarpis nuo lervų įdėjimo (0 bandymo diena) iki bandymo mašalų kartos išsinėrimo (apskaičiuojant

▼M6

tikrąją vystymosi trukmę, reikėtų atsižvelgti į lervų amžių, kai jos buvo įdedamos). Vystymosi sparta (vienetas: 1/dieną) yra vystymosi trukmės atvirkštinis dydis ir atitinka lervų vienos dienos vystymosi dalį. Vertinant šiuos nuosėdų toksiškumo tyrimus, vystymosi spartai teikiama pirmenybė, nes jos dispersija yra mažesnė, ji yra labiau vienalytė ir arčiau normaliojo pasiskirstymo, palyginti su vystymosi trukme. Taigi vystymosi spartai, kitaip nei vystymosi trukmei, galima taikyti didesnės galios parametrinių kriterijų procedūras. Vystymosi spartos kaip tolydžiojo atsako EC_x vertes galima įvertinti atliekant regresinę analizę (pvz., (29) (30)). Vidutinę vystymosi trukmės NOEC vertę galima įvertinti taikant ANOVA metodus, pvz., Williams arba Dunnett kriterijus. Kadangi patinai išsineria anksčiau nei patelės, t. y. jų vystymosi sparta yra didesnė, pravartu be visų mašalų vystymosi spartos apskaičiuoti kiekvienos lyties vystymosi spartą atskirai.

51. Taikant statistinius kriterijus daroma prielaida, kad x tikrinimo dieną pastebėtų mašalų skaičius išsinėrė per laiko intervalo nuo x dienos iki x – l dienos vidurį (l – tikrinimo intervalo ilgis, paprastai 1 diena). Vidutinė vystymosi sparta indui ($\bar{x}$) apskaičiuojama pagal:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i X_i}{n_e},$$

čia:

$\bar{x}$ – vidutinė indui gauta vystymosi sparta;

i – tikrinimo intervalo indeksas;

m – maksimalus tikrinimo intervalų skaičius;

f_i – per tikrinimo intervalą *i* išsinėrusių mašalų skaičius;

n_e – suminis iki bandymo pabaigos išsinėrusių mašalų skaičius (= Σf_i));

x_i – per intervalą *i* išsinėrusių mašalų vystymosi sparta;

$$x_i = 1/\text{diena}_i - \frac{l_i}{2},$$

čia:

diena_i – tikrinimo diena (dienos nuo lervų įdėjimo);

l_i – tikrinimo intervalo *i* trukmė (dienos, paprastai 1 diena).

Lyčių santykis

52. Lyčių santykiai yra dichotominiai duomenys, todėl juos reikėtų įvertinti taikant Fisher tikslųjį kriterijų arba kitus tinkamus metodus. Natūralus *C. riparius* lyčių santykis yra lygus vienetui, t. y. patinų ir patelių skaičius yra vienodas. Abiejų kartų lyčių santykių duomenis reikėtų apdoroti vienodai. Kadangi maksimalus vienam indui tenkančių mašalų skaičius (t. y. 20) yra per mažas reikšmingai statistinei analizei atlikti, gaunamas visų vienos apdorojimo dozės indų kiekvienos lyties išsinėrusių ir gyvų mašalų suminis skaičius. Šie netransformuoti duomenys tikrinami 2 × 2

▼M6

faktorinės analizės lentelėje (tirpiklio) kontrolinio bandinio arba sujungtų kontrolinių bandinių duomenų atžvilgiu.

Reprodukcija

53. Reprodukcija, kaip vislumas, skaičiuojama kaip vienai patelei tenkančių kiaušinėlių krūvelių skaičius. Tikslesnė išraiška būtų veisimo narvelyje gautų kiaušinėlių krūvelių suminio skaičiaus dalmuo iš į tą narvelį įdėtų gyvų ir nesužalotų patelių suminio skaičiaus. Vislumo NOEC vertę galima nustatyti taikant ANOVA metodus, pvz., Williams arba Dunnett kriterijus.

54. Kiaušinėlių krūvelės vaisingumas naudojamas vienai patelei tenkančių vaisingų kiaušinėlių krūvelių skaičių kiekybiniam skaičiavimui. Veisimo narvelyje gautų vaisingų kiaušinėlių krūvelių suminis skaičius dalijamas iš į tą narvelį įdėtų gyvų ir nesužalotų patelių suminio skaičiaus. Vaisingumo NOEC vertę galima nustatyti taikant ANOVA metodus, pvz., Williams arba Dunnett kriterijus.

Bandymo ataskaita

55. Bandymo ataskaitoje turi būti ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— fizikinė būsena bei fizikinės ir cheminės savybės (tirpumas vandenyje, garų slėgis, log K_{ow}, pasiskirstymo dirvožemyje koeficientas (arba nuosėdose, jei žinomas), stabilumas vandenyje bei nuosėdose ir kt.);

— cheminio identifikavimo duomenys (bendrinis pavadinimas, cheminis pavadinimas, struktūrinė formulė, CAS numeris ir kt.), įskaitant grynumą ir bandomosios cheminės medžiagos kiekybinio nustatymo metodą.

Bandomųjų gyvūnų rūšys:

— naudoti bandymo organizmai: rūšys, mokslinis pavadinimas, organizmo gavimo šaltinis ir veisimo sąlygos;

— informacija apie kiaušinėlių masės ir lervų apdorojimą;

— informacija apie išsinėrusių 1-osios kartos mašalų apdorojimą, naudojant ištraukiamąjį įtaisą ir kt. (žr. 5 priedėlį);

— 1-osios ir 2-osios kartos bandymo organizmų amžius jų įdėjimo į bandymo indus momentu.

Bandymo sąlygos:

— naudotos nuosėdos, t. y. natūralios ar atkurtosios (dirbtinės) nuosėdos;

— natūralios nuosėdos: nuosėdų ėminių ėmimo vieta ir jos aprašymas, įskaitant, jei įmanoma, užteršimą; nuosėdų charakteristikos: pH, organinės anglies kiekis, C/N santykis ir granuliometrinė sudėtis (jei tinka).

— dirbtinės nuosėdos: paruošimas, sudedamosios dalys ir charakteristikos (organinės anglies kiekis, pH, drėgmės kiekis ir kt., išmatuotos bandymo pradžioje);

— bandymo vandens paruošimas (jei naudojamas atkurtasis vanduo) ir charakteristikos (deguonies koncentracija, pH, kietumas ir kt., išmatuotos bandymo pradžioje);

▼M6

— bandymo indų ir kristalizatorių nuosėdų ir vandens virš nuosėdų sluoksnių storis;

— vandens virš nuosėdų ir porų vandens tūris; bandymo indų ir kristalizatorių drėgnųjų nuosėdų su porų vandeniu ir be jo masė;

— bandymo indai (medžiaga ir matmenys);

— kristalizatoriai (medžiaga ir matmenys);

— veisimo narveliai (medžiaga ir matmenys);

— pradinių tirpalų ruošimo metodas ir bandymo indų bei kristalizatorių bandymo koncentracijos;

— bandomosios medžiagos įdėjimo į bandymo indus ir kristalizatorius būdas: bandymo koncentracijos vertės, kartotinių bandinių skaičius ir tirpikliai, jei būtini;

— inkubavimo bandymo induose sąlygos: temperatūra, šviesos ciklas ir apšvieta, aeravimas (burbuliukų skaičius per sekundę);

— inkubavimo veisimo narveliuose ir kristalizatoriuose sąlygos: temperatūra, šviesos ciklas ir apšvieta;

— kiaušinėlių krūvelių inkubavimo mikrotitravimo plokštelėse (arba kitokiuose induose) sąlygos: temperatūra, šviesos ciklas ir apšvieta;

— išsami informacija apie maitinimą, įskaitant maisto tipą, paruošimą, kiekį ir maitinimo režimą.

Rezultatai:

— nominaliosios bandymo koncentracijos vertės, išmatuotos bandymo koncentracijos vertės ir visų bandymo induose bei kristalizatoriuose esančios bandomosios cheminės medžiagos analizių rezultatai;

— vandens bandymo induose kokybė, t. y. pH, temperatūra, ištirpusio deguonies kiekis, kietumas ir amoniako kiekis;

— išgaravusio bandymo vandens papildytas kiekis, jei buvo papildomas;

— 1-osios ir 2-osios kartos išsiner̃usių mašalų patinų ir patelių skaičius, tenkantis vienam indui per dieną;

— visiškai išsiner̃usių ir gyvų 1-osios ir 2-osios kartos mašalų lyčių santykis vienai bandomosios medžiagos dozei;

— 1-osios ir 2-osios kartos lervų, kurios neišsiner̃ė kaip mašalai, skaičius, gautas vienam indui;

— 1-osios ir 2-osios kartos išsiner̃usių mašalų (mašalų patinus ir pateles skaičiuojant kartu) procentinė dalis arba dalis, gauta vienam kartotiniam bandiniui ir bandymo koncentracijai;

— visiškai išsiner̃usių ir gyvų 1-osios ir 2-osios kartos mašalų vidutinė vystymosi sparta (patinų ir patelių atskirai ir kartu), gauta vienam kartotiniam bandiniui ir bandymo koncentracijai;

— vieno veisimo narvelio kristalizatoriuose per dieną padėtų kiaušinėlių krūvelių skaičius;

▼M6

— kiekvienos kiaušinėlių krūvelės charakteristikos (dydis, forma ir vaisingumas);

— vislumas – suminis kiaušinėlių krūvelių skaičius, padalytas iš į veisimo narvelį įdėtų patelių suminio skaičiaus;

— vaisingumas – suminis vaisingų kiaušinėlių krūvelių skaičius, padalytas iš į veisimo narvelį įdėtų patelių suminio skaičiaus;

— toksiškumo vertinamųjų baigčių įverčiai, pvz., EC_x (ir susiję pasikliovimo intervalai), NOEC ir statistiniai metodai, kurie buvo taikomi įverčiams nustatyti;

— rezultatų aptarimas, įskaitant poveikį bandymo rezultatams dėl nukrypimų nuo šio bandymo metodo.

NUORODOS

(1) Šio priedo C.28 skyrius. Toksiškumo bandymas su chironomidais nuosėdose ir vandenyje, naudojant vandenį su įterpta bandomąja medžiaga.

(2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. and M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). Entomologica Scandinavica, 30: 311–322.

(3) Fleming, R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(6) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, December 1997.

(7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.

(10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. and R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.

(11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. and C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, Environ. Toxicol. Chem., 25: 2662-2674.

▼**M6**

(12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. and L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, Ecotoxicology, 16: 221-230.

(13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui,* Jp. J. Sanit. Zool., 48: 345-350.

(14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), Jp. J. Sanit. Zool., 37: 47-57.

(15) Šio priedo C.27 skyrius. Toksiškumo bandymas su chironomidais nuosėdose ir vandenyje, naudojant nuosėdas su įterpta bandomąja medžiaga.

(16) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paris.

(17) Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, Integr. Environ. Assess. Management.

(18) Environment Canada. (1995), Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant, Report EPS 1/RM/30, September 1995.

(19) Oetken, M, Nentwig, G., Löffler, D, Ternes, T. and J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 49: 353-361.

(20) Suedel, B.C. and J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem., 13: 1163-1175.

(21) Naylor, C. and C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, Chemosphere, 31: 3291-3303.

(22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

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

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

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

(26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. and H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. J Soils Sediments, 9: 94-102.

(27) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics, 48: 577-585.

(28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Res., 18: 213-221.

▼**M6**

(29) Bruce, R.D. and D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicitydata, Environ. Toxicol. Chem., 11: 1485-1494.

(30) Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66: 298-312.

(31) OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application,* OECD Series on Testing and Assessment No. 54, 146 pp., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

(32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. and G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, Environ. Toxicol. Chem., 16: 1165-1176.

(33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. and J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) – baseline experiments for future multi-generation studies, J. Environ. Sci. Health Part A, 42: 1-9.

(34) OECD (2010), Validation *report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.

▼M6

1 priedėlis

Apibrėžtys

Šiame bandymo metode taikomos šios apibrėžtys:

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Dirbtinės nuosėdos arba sukurtosios, atkurtosios ar sintetinės nuosėdos – mišinys medžiagų, naudojamų natūralių nuosėdų fiziniams komponentams modeliuoti.

Vanduo virš nuosėdų – vanduo, užpiltas ant nuosėdų bandymo inde.

Intersticinis vanduo arba porų vanduo – vanduo, užimantis erdvę tarp nuosėdų ir dirvožemio dalelių.

Sodrintas vanduo – bandymo vanduo, į kurį įdedama bandomosios cheminės medžiagos.

Bandomoji cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys, bandyti pagal šį bandymo metodą.

▼M6

2 priedėlis

Rekomendacijos dėl *Chironomus riparius* auginimo

1. *Chironomus* lervas galima auginti kristalizatoriuose ar didesnėse talpyklose. Ant talpyklos dugno paskleidžiamas maždaug nuo 5 mm iki 10 mm storio smulkaus kvarco smėlio sluoksnis. Taip pat įrodyta, kad tinkamas substratas yra diatomitas (pvz., Merck, Art 8117) (pakanka plonesnio vos kelių mm storio sluoksnio). Po to įpilama vandens iki kelių centimetrų gylio. Prireikus įpilama papildomai vandens, kad būtų kompensuoti garavimo nuostoliai ir būtų išvengta išdžiūvimo. Prireikus vandenį galima pakeisti. Reikėtų užtikrinti nestiprų aeravimą. Lervų veisimo indus reikėtų laikyti tinkamame narvelyje, kad išsinėrę suaugę mašalai negalėtų išskristi. Narvelis turėtų būti gana erdvus, kad išsinėrusiems suaugusiems mašalams būtų vietos spiestis; antraip kopuliacija gali neįvykti (mažiausi matmenys yra maždaug 30 × 30 × 30 cm).

2. Narvelius reikėtų laikyti kambario temperatūroje arba pastovių aplinkos sąlygų patalpoje 20 ± 2 °C temperatūroje; šviesiojo laikotarpio trukmė 16 val. (apšvieta apie 1 000 liuksų), 8 val. tamsos. Buvo pranešta, kad dėl mažesnės kaip 60 % RH drėgmės gali sumažėti reprodukcija.

Skiedimo vanduo

3. Galima naudoti bet kokį tinkamą natūralų ar atkurtąjį vandenį. Paprastai naudojamas šulinio vanduo, vandentiekio vanduo, iš kurio pašalintas chloras, ir dirbtinės terpės (pvz., Elendt M4 arba M7 terpė, žr. toliau). Prieš naudojant vanduo turi būti aeruojamas. Prireikus panaudotą kultūrų auginimo vandenį galima atnaujinti jį nupilant arba išsiurbiant iš kultūrų auginimo indų taip, kad nebūtų pažeisti lervų vamzdeliai.

Lervų maitinimas

4. *Chironomus* lervas reikėtų maitinti žuvų maisto dribsniais (Tetra Min®, Tetra Phyll® ar kito panašaus prekių ženklo žuvų maistu) maždaug po 250 mg indui per dieną. Maistą galima duoti kaip sausus miltelius arba kaip vandeninę suspensiją: 1,0 g maisto dribsnių įdedama į 20 ml skiedimo vandens ir maišoma, kad būtų gautas vienalytis mišinys. Šio preparato davimo norma būtų apie 5 ml vienam indui per dieną (prieš naudojant supurtoma). Vyresnėms lervoms galima duoti daugiau.

5. Maitinimas koreguojamas atsižvelgiant į vandens kokybę. Jei auginimo terpė susidrumsčia, duodamo maisto kiekį reikėtų sumažinti. Duodamo maisto kiekį reikėtų kruopščiai kontroliuoti. Jei jo duodama per mažai, lervos migruoja į vandens sluoksnį, jei per daug – didėja mikrobinis aktyvumas ir sumažėja deguonies koncentracija. Abiem atvejais gali sumažėti augimo sparta.

6. Į naujai ruošiamus kultūros indus taip pat galima įdėti kai kurių žaliųjų dumblių (pvz., *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) ląstelių.

Išsinėrusių mašalų maitinimas

7. Kai kurie tyrėjai pasiūlė išsinėrusių mašalų maisto šaltiniu naudoti sočiajame sacharozės tirpale įmirkytą medvilninį tamponą.

▼M6

Išsinėrimas

8. Esant 20 ± 2 °C temperatūrai, suaugę mašalai pradeda atsirasti auginimo induose maždaug po 13–15 dienų. Patinai nesunkiai atpažįstami pagal jų plunksniškus čiuptuvėlius ir ploną kūną.

Kiaušinėlių krūvelės

9. Suaugusiems mašalams esant veisimo narvelyje, visus lervų auginimo indus reikėtų tikrinti tris kartus per savaitę, ar juose nėra padėta lipnių kiaušinėlių krūvelių. Jei kiaušinėlių krūvelių yra, jas reikėtų atsargiai paimti. Jas reikėtų pernešti į mažas lėkšteles su auginimo vandens bandiniu. Kiaušinėlių krūvelės naudojamos ruošiant naujus kultūros indus (pvz., 2–4 kiaušinėlių krūvelės / indui) arba atliekant toksiškumo bandymus.

10. Pirmosios stadijos lervos turėtų išsiristi po 2–3 dienų.

Naujų kultūros indų ruošimas

11. Turint sukurtas kultūras, turėtų būti įmanoma kas savaitę ar rečiau paruošti naują kultūros indą lervoms auginti, atsižvelgiant į bandymo reikalavimus, ir pašalinti senus indus, išsinėrus suaugusiems mašalams. Taikant šią sistemą, be didelių pastangų bus reguliariai tiekiami suaugę mašalai.

M4 ir M7 bandymo tirpalų ruošimas

12. Elendt (1990) aprašė M4 terpę. M7 terpė ruošiama kaip M4 terpė, išskyrus 1 lentelėje išvardytas chemines medžiagas, kurių M7 koncentracijos vertės yra keturis kartus mažesnės palyginti su M4. Bandymo tirpalo nereikėtų ruošti pagal Elendt ir Bias (1990), nes pradiniams tirpalams paruošti nurodytos $NaSiO_3 \cdot 5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 ir K_2HPO_4 koncentracijos vertės nesutampa.

M7 terpės ruošimas

13. Kiekvienas pradinis tirpalas (I) ruošiamas atskirai ir iš šių pradinių tirpalų (I) ruošiamas jungtinis pradinis tirpalas (II) (žr. 1 lentelę). M7 terpė ruošiama, 50 ml jungtinio pradinio tirpalo (II) ir 2 lentelėje nurodytus kiekvieno makroelemento pradinio tirpalo kiekius skiedžiant dejonizuotu vandeniu iki 1 litro. Vitaminų pradinis tirpalas ruošiamas į dejonizuotą vandenį įdėjus 3 lentelėje nurodytą trijų vitaminų kiekį, ir 0,1 ml jungtinio vitaminų pradinio tirpalo įpilama į galutinę M7 terpę prieš pat ją naudojant. Vitaminų pradinis tirpalas laikomas užšaldytas mažomis alikvotinėmis dalimis. Terpė aeruojama ir stabilizuojama.

1 lentelė.

M4 ir M7 terpės mikroelementų pradiniai tirpalai

Pradiniai tirpalai (I)	Kiekis (mg), skiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1 litro	Pradinis tirpalas (II) ruošiamas maišant šiuos pradinių tirpalų (I) tūrius (ml) ir skiedžiant dejonizuotu vandeniu iki 1 litro		Galutinės bandymo tirpalų koncentracijos vertės (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 [1]	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ [1]	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl [1]	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M6**

Pradiniai tirpalai (I)	Kiekis (mg), skiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1 litro	Pradinis tirpalas (II) ruošiamas maišant šiuos pradinių tirpalų (I) tūrius (ml) ir skiedžiant dejonizuotu vandeniu iki 1 litro		Galutinės bandymo tirpalų koncentracijos vertės (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Šių medžiagų kiekiai M4 ir M7 skiriasi, kaip nurodyta pirmiau.
(2) Šie tirpalai ruošiami atskirai, supilami kartu ir nedelsiant apdorojami autoklave.

2 lentelė.

M4 ir M7 terpių mitybinių makroelementų pradiniai tirpalai

	Kiekis, skiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1 litro (mg)	Mitybinių makroelementų pradinių tirpalų tūris, įpilamas ruošiant M4 ir M7 terpes (ml/l)	Galutinės bandymo tirpalų M4 ir M7 koncentracijos vertės (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M6**

3 lentelė.

M4 ir M7 terpių vitaminų pradinis tirpalas

Visi trys vitaminų tirpalai sumaišomi, kad būtų gautas vienas vitaminų pradinis tirpalas.

	Kiekis, skiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1 litro (mg)	Vitaminų pradinių tirpalų tūris, įpilamas ruošiant M4 ir M7 terpes (ml/l)	Galutinės bandymo tirpalų M4 ir M7 koncentracijos vertės (mg/l)
Tiamino hidrochloridas	750	0,1	0,075
Cianokobalaminas (B12)	10	0,1	0,0010
Biotinas	7,5	0,1	0,00075

NUORODOS

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, Protoplasma, 154: 25-33.

Elendt, B.P. and W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna,* Water Research, 24: 1157-1167.

▼M6

3 priedėlis

Dirbtinių nuosėdų paruošimas

NUOSĖDŲ SUDĖTIS

Dirbtinių nuosėdų sudėtis turėtų būti tokia:

Sudedamoji dalis	Charakteristika	% sausų nuosėdų masės
Durpės	Kiminų durpės, pH kuo artimesnis 5,5–6,0 vertei, jokių matomų augalų liekanų, smulkiai sumaltos (dalelių dydis ≤ 1 mm) ir išdžiovintos ore	4–5
Kvarcinis smėlis	Grūdelių dydis: > 50 % dalelių turėtų būti 50–200 μm intervale	75–76
Kaolinas	Kaolinito kiekis ≥ 30 %	20
Organinė anglis	Kiekis reguliuojamas įdedant durpių ir smėlio	2 (± 0,5)
Kalcio karbonatas	$CaCO_3$, milteliai, chemiškai grynas	0,05–0,1
Vanduo	Laidis ≤ 10 μS/cm	30–50

RUOŠIMAS

Durpės džiovinamos ore ir malamos tol, kol gaunami smulkūs milteliai. Iš reikiamo durpių miltelių kiekio ruošiama suspensija dejonizuotame vandenyje, maišant didelio našumo homogenizavimo įtaisu. Šios suspensijos pH vertė, lygi 5,5 ± 0,5 nustatoma $CaCO_3$. Švelniai maišoma suspensija kondicionuojama ne trumpiau kaip dvi dienas 20 ± 2 °C temperatūroje, kad nusistovėtų pH ir būtų sukurta stabili mikroorganizmų populiacija. pH matuojamas dar kartą ir turėtų būti 6,0 ± 0,5. Durpių suspensija maišoma su kitomis sudedamosiomis dalimis (smėliu ir kaolinu) ir dejonizuotu vandeniu, kad būtų gautos homogenizuotos nuosėdos, kurių vandens kiekis sudarytų 30–50 procentų sausų nuosėdų masės. pH matuojamas dar kartą ir prireikus reguliuojamas $CaCO_3$ nuo 6,5 iki 7,5. Imami nuosėdų ėminiai sausos medžiagos masei ir organinės anglies kiekiui nustatyti. Prieš chironomidų toksiškumo bandymą dirbtines nuosėdas rekomenduojama septynias dienas kondicionuoti tomis pačiomis sąlygomis, kurios vyrauja vėliau atliekant bandymą.

LAIKYMAS

Sausas dirbtinių nuosėdų sudėtines dalis galima laikyti sausoje, vėsioje vietoje kambario temperatūroje. Paruoštų dirbtinių (šlapių) nuosėdų nereikėtų laikyti prieš jas naudojant bandymui. Jas reikėtų panaudoti iš karto po 7 dienų kondicionavimo laikotarpio, kuris yra jų ruošimo procedūros pabaiga.

NUORODOS

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. and B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (Oligochaeta) in artificial media, Ecotox. Environ. Safety, 39: 10-20.

▼**M6**

4 priedėlis

Tinkamo skiedimo vandens cheminės charakteristikos

SUDEDAMOJI DALIS	KONCENTRACIJA
Kietosios dalelės	< 20 mg/l
Suminė organinė anglis	< 2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	< 1 µg/l
Kietumas kaip $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Liekamasis chloras	< 10 µg/l
Suminis organinių fosforo pesticidų kiekis	< 50 ng/l
Suminis chloro organinių pesticidų ir polichlorintųjų bifenilų kiekis	< 50 ng/l
Suminis organinio chloro kiekis	< 25 ng/l

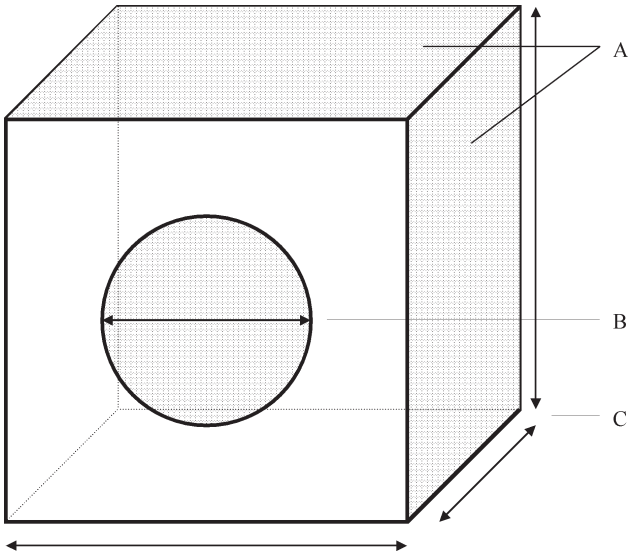
(*) Tačiau reikėtų pabrėžti, kad, įtarus sąveiką tarp kietumo jonų ir bandomosios cheminės medžiagos, reikėtų naudoti mažesnio kietumo vandenį (todėl šiuo atveju nereikėtų naudoti Elendt Medium M4 terpės).

▼**M6**

5 priedėlis

Bandymo atlikimo rekomendacijos

Veisimo narvelio pavyzdys:



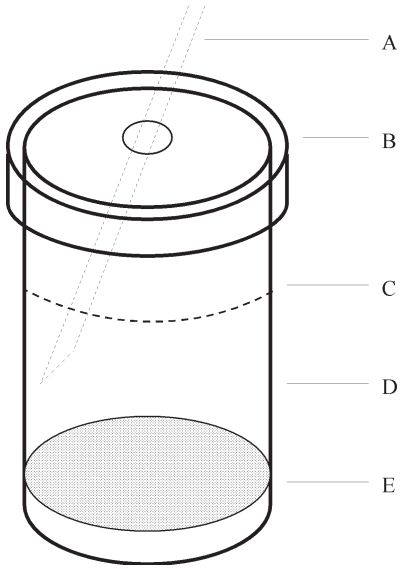
A: metalinis tinklelis narvelio viršuje ir mažiausiai iš vieno šono (akučių dydis maždaug 1 mm);

B: anga suaugusiems mašalams įleisti į veisimo narvelį ir padėtoms kiaušinėlių krūvelėms išimti iš kristalizatorių (šiame paveiksle nepavaizduoti);

C: veisimo narvelio matmenys: ilgis ne mažesnis kaip 30 cm, aukštis – 30 cm, plotis – 30 cm.

▼**M6**

Bandymo indo pavyzdys:



A: Pastero pipetė orui tiekti į vandenį virš nuosėdų;

B: stiklinis dangtis, skirtas skraidantiems išsinėrusiems mašalams sulaikyti;

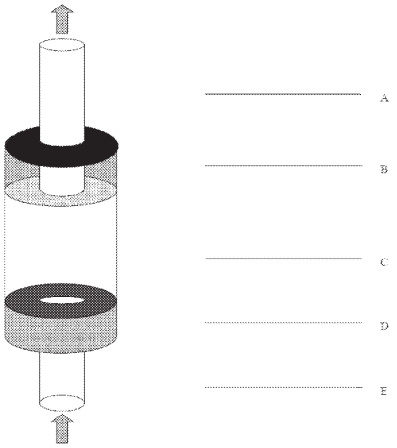
C: vandens sluoksnio paviršius;

D: bandymo indas (ne mažesnio kaip 600 ml tūrio cheminė stiklinė);

E: nuosėdų sluoksnis.

▼**M6**

Ištraukiamojo įtaiso, skirto suaugusiems mašalams gaudyti, pavyzdys (rodyklės žymi oro srauto kryptį):



A: stiklinis vamzdelis (vidinis skersmuo maždaug 5 mm), prijungtas prie savisiurbio siurblio;

B: vulkanizuotos gumos kamštis su anga stikliniam vamzdeliui (A). Iš vidaus stiklinio vamzdelio (A) anga uždengta marle ir metaliniu tinkleliu (akučių dydis maždaug 1 mm), kad į ištraukiamąjį įtaisą siurbiami mašalai nebūtų sužaloti;

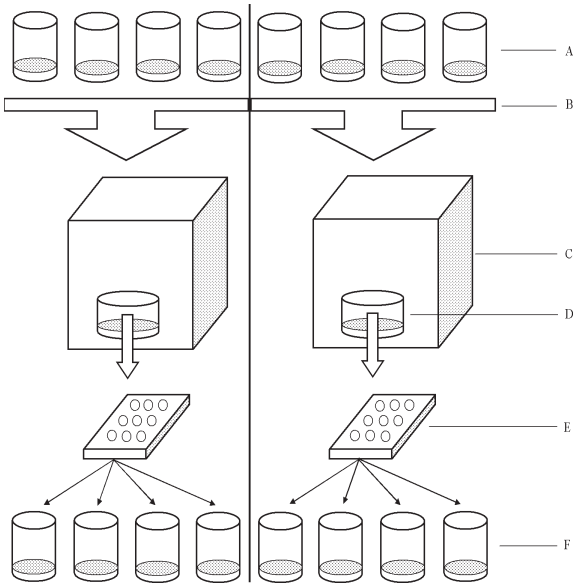
C: skaidrus indas (plastikinis arba stiklinis, ilgis maždaug 15 cm) sugautiems mašalams laikyti;

D: vulkanizuotos gumos kamštis su anga stikliniam vamzdeliui (E). Kamštis D ištraukiamas iš indo C, kad mašalus būtų galima išleisti į veisimo narvelį;

E: stiklinis vamzdelis (vidinis skersmuo maždaug 8 mm) suaugusiems mašalams surinkti iš indo.

▼**M6**

Gyvavimo ciklo bandymo scheminis vaizdas:



A: 1-oji karta – bandymo indai su nuosėdų ir vandens sistema, aštuoni kartotiniai bandiniai, 20 pirmosios stadijos lervų vienam indui;

B: po keturis bandymo indus kiekvienam veisimo narveliui A ir B;

C: veisimo narveliai (A ir B), skirti spiestis, poruotis ir dėti kiaušinėlius;

D: kristalizatoriai kiaušinėlių krūvelėms dėti;

E: mikrotitravimo plokštelės, po vieną duobutę kiekvienai kiaušinėlių krūvelei;

F: 2-oji karta – bandymo indai su nuosėdų ir vandens sistema, aštuoni kartotiniai bandiniai, 20 pirmosios stadijos lervų vienam indui.

▼M6

C.41. ŽUVŲ LYTINIO VYSTYMOSI BANDYMAS

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 234 (2011). Jis pagrįstas 1998 m. sprendimu sukurti naujus arba atnaujinti esamus endokrininę sistemą galinčių ardyti cheminių medžiagų atrankos ir bandymo metodus. Žuvų lytinio vystymosi bandymas (FSDT) buvo identifikuotas kaip perspektyvus bandymo metodas, apimantis jautrią žuvų gyvenimo stadiją, kurioje reaguojama į estrogenines ir androgenines chemines medžiagas. Nuo 2006 m. iki 2010 m. buvo atliekamas bandymo metodo tinkamumo patvirtinimo tarplaboratorinis tyrimas, kurio metu buvo patvirtintas Japoninės medakos (*Oryzias latipes*), zebrinės danijos (*Danio rerio*) ir trispyglės dyglės (*Gasterosteus aculeatus*) tinkamumas, o juodosios drūtagalvės rainės (*Pimephales promelas*) tinkamumas buvo patvirtintas iš dalies (41) (42) (43). Į šį protokolą įtraukta japoninė medaka, trispyglė dyglė ir zebrinė danija. Protokolas iš esmės yra patobulintas EBPO TG 210 *Žuvų ankstyvųjų gyvenimo stadijų toksiškumo bandymas* (1) kuriame bandomąja medžiaga veikiama tol, kol žuvys atskiriamos pagal lytį, t. y. maždaug 60 dienų po japoninės medakos, trispyglės dyglės ir zebrinės danijos išsiritimo (dph) (vėliau patvirtintų kitų rūšių ekspozicijos laikotarpis gali būti trumpesnis ar ilgesnis), įtraukiant su endokrinine sistema susijusias vertinamąsias baigtis. Atliekant FSDT, įvertinami poveikiai ir galimi lytiniam vystymuisi neigiami padariniai, kuriuos ankstyvosiomis gyvenimo stadijomis sukelia cheminės medžiagos, galinčios ardyti endokrininę sistemą (pvz., estrogenai, androgenai ir steroidinių hormonų sintezės inhibitoriai). Turint dviejų esminių endokrininių vertinamųjų baigčių, vitelogenino (VTG) koncentracijos ir fenotipinių lyčių santykio derinį, bandymo keliu galima parodyti bandomosios cheminės medžiagos veikimo būdą. Dėl su populiacija susijusio fenotipinių lyčių santykio kitimo FSDT gali būti taikomas pavojui ir rizikai vertinti. Tačiau, jei bandymas naudojamas pavojui ir rizikai vertinti, trispyglės dyglės nereikėtų naudoti, nes dabar turimi tinkamumo patvirtinimo duomenys parodė, kad bandomųjų cheminių medžiagų sukelti šios rūšies fenotipinių lyčių santykio pokyčiai buvo neįprasti.

2. Protokolas pagrįstas žuvų veikimu bandomųjų cheminių medžiagų tirpalais lytiniu požiūriu nestabiliu laikotarpiu, kai žuvys, kaip manoma, yra labiausiai jautrios endokrininę sistemą galinčioms ardyti cheminėms medžiagoms, trukdančioms lytiškai vystytis. Kaip su endokrinine sistema susijusių vystymosi nukrypimų rodikliai matuojamos dvi esminės vertinamosios baigtys – VTG koncentracijos vertės ir lyčių santykiai (lyčių proporcijos), nustatyti atliekant gonadų histologiją. Gonadų histopatologija (ovocitų ir spermatogeninių ląstelių įvertinimas ir stadijos nustatymas) neprivaloma. Be to, nustatoma genetinė lytis, jei įmanoma (pvz., japoninės medakos ir trispyglės dyglės). Genetinės lyties žymenų buvimas yra didelis pranašumas, nes padidina lyčių santykio statistinio kriterijaus galią ir galima aptikti kiekvieno individo fenotipinės lyties pasikeitimą. Kitos apikalinės vertinamosios baigtys, kurias būtų galima išmatuoti, yra išsiritimo laipsnis, išgyvenamumas ir kūno ilgis bei masė. Bandymo metodą būtų galima pritaikyti kitoms nei pirmiau išvardytos rūšims, jei būtų atliktas jų tinkamumo patvirtinimas, atitinkantis japoninės medakos, trispyglės dyglės ir zebrinės danijos patvirtinimą, jei kontrolinės žuvys būtų atskirtos lytiškai bandymo pabaigoje, jei VTG lygiai būtų pakankamai dideli, kad būtų galima aptikti su chemine medžiaga susijusius reikšmingus pokyčius ir jei bandymo sistemos jautris būtų nustatytas pagal endokrininės sistemos aktyviąsias etalonines chemines medžiagas ((anti)-estrogenus, (anti)-androgenus, aromatazės inhibitorius ir kt.). Be to, tinkamumo patvirtinimo ataskaitą (-as), kurioje (-iose) pateikti kitų rūšių FSDT duomenys, turėtų peržiūrėti EBPO ir tinkamumo patvirtinimo rezultatas būtų laikomas priimtinu.

▼M6

Pradiniai aspektai ir apribojimai

3. VTG paprastai gamina kiaušinius dedančių moteriškos lyties stuburinių gyvūnų kepenys, kaip atsaką į cirkuliuojantį vidinį estrogeną (2). Jis yra kiaušinio trynio baltymų pirmtakas ir, pagamintas kepenyse, keliauja krauju į kiaušidę, kurioje jį įsisavina ir modifikuoja besivystantys ovocitai. Nesubrendusios žuvys ir žuvų patinai VTG sintezuoja mažai, nors ir aptinkamais kiekiais, nes estrogeno cirkuliacija yra nepakankama. Tačiau kepenys gali sintetinti ir išskirti VTG, kaip atsaką į išorinį stimuliavimą estrogenais (3) (4) (5).

4. Matuojant VTG galima aptikti chemines medžiagas, kurios veikia kaip estrogenai, antiestrogenai ir androgenai, ir chemines medžiagas, kurios trukdo sintetinti steroidus, pvz., aromatazės inhibitorius. Aptikti estrogenines chemines medžiagas įmanoma matuojant VGT atsiradimą žuvų patinuose, ir šis matavimas buvo plačiai dokumentuotas mokslinėje apžvalginėje literatūroje. VTG atsiradimas taip pat buvo įrodytas žuvis paveikus aromatizuojamais androgenais (6) (7). Sumažėjus estrogenų cirkuliavimo patelėse lygiui, pvz., jei inhibuojama aromatazė, kuri vidinį androgeną paverčia natūraliu estrogenu 17β-estradioliu, mažėja VTG koncentracija, naudojama aromatazės inhibavimo savybių turinčioms cheminėms medžiagoms arba, plačiau, steroidų sintezės inhibitoriams aptikti (33). Yra nustatyta ir plačiai dokumentuota VTG atsako po estrogenų ar aromatazės inhibavimo biologinė svarba (8) (9). Tačiau įmanoma, kad VTG gamybai patelėse įtaką taip pat daro bendrasis toksiškumas ir neendokrininio toksinio veikimo būdai.

5. Buvo sėkmingai sukurti ir standartizuoti keli matavimo metodai, skirti įprastinėmis sąlygomis kiekybiškai nustatyti VTG kraujyje, kepenyse, viso kūno arba galvos ir uodegos homogenato ėminiuose, surinktuose iš atskirų žuvų. Taip yra zebrinės danijos, trispyglės dyglės ir japoninės medakos atveju, taip pat iš dalies patvirtintos juodosios drūtagalvės rainės rūšys, kurių VTG galima nustatyti rūšių specifinės imunofermentinės analizės (ELISA) metodu, taikant imunochemiją (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Atliekant bandymus su japonine medaka ir zebrine danija, gauta gera koreliacija tarp VTG, išmatuoto kraujo plazmoje, kepenyse ir homogenato ėminiuose, nors homogenatams paprastai gaunamos šiek tiek mažesnės vertės palyginti su plazma (17) (18) (19). 5 priedėlyje pateiktos VGT analizės ėminių ėmimo procedūros.

6. Fenotipinių lyčių santykio (lyčių dalių) kitimas yra lyties pasikeitimą rodanti vertinamoji baigtis. Iš esmės, įtaką brėstančių žuvų lyčių santykiui gali daryti estrogenai, antiestrogenai androgenai, antiandrogenai ir steroidų sintezę inhibuojančios cheminės medžiagos (20). Buvo įrodyta, kad zebrinės danijos lyties pasikeitimas yra iš dalies grįžtamasis (21) po veikimo estrogeno tipo chemine medžiaga, bet lyties pasiketimas po veikimo androgeno tipo chemine medžiaga yra negrįžtamas (30). Lytis, kuri atskiroms žuvims nustatoma atliekant gonadų histologinį tyrimą, apibrėžiama kaip moteriškoji, vyriškoji, hermafroditinė (vienoje gonadoje ovocitai ir spermatozoidus gaminančios ląstelės) arba nediferencijuota. Rekomendacijos pateiktos 7 priedėlyje ir EBPO gairėse, skirtose su endokrinine sistema susijusios žuvų gonadų histopatologijos diagnozei nustatyti (22).

7. Genetinė lytis tiriama naudojant genetinius žymenis, jei jų turi tam tikra žuvų rūšis. Galima aptikti japoninės medakos moteriškąjį XX arba vyriškąjį XY genus atliekant polimerazės grandininę reakciją (PCR), arba galima analizuoti su Y susijusio DM domeno geną (DMY) (DMY neigiamas ar teigiamas), kaip aprašyta (23) (24). Lygiavertis trispyglės dyglės genetinės lyties nustatymo PCR metodas aprašytas 10 priedėlyje. Jei genetinę lytį galima atskirai susieti su fenotipine lytimi, kriterijaus galia padidėja, todėl

▼M6

reikėtų nustatyti rūšių genetinę lytį, jei jos turi dokumentuotus genetinės lyties žymenis.

8. Dviejų esminių endokrininių vertinamųjų baigčių – vitelogenino (VTG) koncentracijos ir fenotipinių lyčių santykio – derinys gali parodyti bandomosios cheminės medžiagos veikimo būdą (MOA) (1 lentelė). Lyčių santykis yra su populiacija susijęs biologinis žymuo (25) (26) ir FSDT rezultatai gali būti naudojami kai kurių tinkamai apibūdintų veikimo būdų pavojams ir rizikai vertinti, kai jų tinkamumą patvirtina reguliavimo institucija. Šiuo metu šie veikimo būdai yra estrogenai, androgenai ir steroidų sintezės inhibitoriai.

1 lentelė.

Endokrininių vertinamųjų baigčių atsakas į skirtingo cheminių medžiagų veikimo būdus:

↑– didėjantis, ↓– mažėjantis, – – netirta

MOA	VTG ♂	VTG ♀	Lyčių santykis	Nuorodos
Silpnas estrogeno agonistas	↑	↑	↑♀ arba ↑nedif.	(27) (40)
Stiprus estrogeno agonistas	↑	↑	↑♀ arba ↑nedif., Ne. ♂	(28) (40)
Estrogeno antagonistas	—	—	↓♀, ↑nedif.	(29)
Androgeno agonistas	↓ arba –	↓ arba –	↑ ♂, Ne ♀	(28) (30)
Androgeno antagonistas	—	—	↑♀ ↑Hermafroditas	(31)
Aromatazės inhibitorius	↓	↓	↓♀	(33)

9. Į FSDT neįtrauktas reprodukcinis žuvų gyvenimo tarpsnis, todėl cheminės medžiagos, kurios, kaip įtariama, veikia reprodukciją, kai jų koncentracija yra mažesnė nei lytinį vystymąsi veikiančios koncentracijos vertės, turėtų būti tiriamos atliekant reprodukciją apimantį bandymą.

10. Šio bandymo metodo apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

11. FSDT *in vivo* tikslas – nustatyti chemines medžiagas, turinčias androgeninių ir estrogeninių savybių, taip pat antiandrogeninių, antiestrogeninių ir steroidų sintezės inhibitorių savybių. FSDT tinkamumo patvirtinimo tarpsniai (1 ir 2) aprėpė estrogenines, androgenines chemines medžiagas ir steroidų sintezės inhibitorius. Estrogenų ir androgenų antagonistų poveikį, nustatytą atliekant FSDT, galima matyti 1 lentelėje, bet šie veikimo būdai šiuo metu yra mažiau dokumentuoti.

BANDYMO PRINCIPAS

12. Atliekant bandymą, žuvys nuo tik ką apvaisinto ikro iki lytinės diferenciacijos pabaigos veikiamos ne mažiau kaip trijų skirtingų bandomosios cheminės medžiagos koncentracijų vandeniniuose tirpaluose. Bandymas turėtų būti atliekamas pratekėjimo sąlygomis, išskyrus atvejus, kai tai neįmanoma dėl pratekėjimo sistemos nebuvimo arba bandomosios cheminės medžiagos tipo (pvz., ribotas tirpumas). Bandymas pradedamas tik ką apvaisintus ikrus (prieš blastodisko pasidalijimą) įdedant į bandymo kameras. Kiekvienos rūšies kamerų įkrova aprašyta 27 pastraipoje. Jei tai patvirtinto tinkamumo bandomųjų gyvūnų rūšys (japoninė medaka, trispyglė dyglė ir zebrinė danija), bandymas baigiamas 60 dienų po išsiritimo. Baigus

▼M6

bandymą, visos žuvys humaniškai numarinamos. Paimamas kiekvienos žuvies VTG analizei skirtas biologinis ėminys (kraujo plazmos, kepenų arba galvos ir uodegos homogenato), o likusi dalis fiksuojama, kad, atliekant histologinį gonadų įvertinimą, būtų galima nustatyti fenotipinę lytį; arba būtų galima atlikti histopatologiją (pvz., gonadų stadijos nustatymą, hermafrodizmo požymių rimtumą). Atitinkamus žymenis turinčių rūšių biologinis ėminys (analinio arba nugarinio peleko) paimamas genetinei lyčiai nustatyti (9 ir 10 priedėliai).

13. . Tinkamų bandymo sąlygų, kurios turi būti sudarytos patvirtintoms bandomųjų gyvūnų rūšims – japoninei medakai, trispyglei dyglei ir zebrinei danijai – apžvalga pateikta 2 priedėlyje.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

14. Reikėtų turėti ūmaus toksiškumo arba kito trumpalaikio toksiškumo tyrimo [pvz., C.14 bandymo metodo (34) ir EBPO TG 210 (1)], atlikto su šiam bandymui pasirinktomis rūšimis, rezultatus. Tai reiškia, kad reikia žinoti bandomosios cheminės medžiagos tirpumą vandenyje ir garų slėgį, be to, turėti patikimą cheminės medžiagos nustatymo bandymo kamerose analizės metodą, kurio tikslumas bei aptikimo riba yra žinomi ir pateikiami ataskaitoje.

15. Kitą naudingą informaciją sudaro struktūrinė formulė, cheminės medžiagos grynumas, tabilumas vandenyje ir veikiant šviesai, pKa, P_{ow} ir lengvo biologinio skaidumo bandymo rezultatai (C.4 bandymo metodas) (35).

Bandymo priimtinumo kriterijai

16. Kad bandymo rezultatai būtų priimtini, turi būti laikomasi šių sąlygų:

— ištirpusio deguonies koncentracija visą bandymą turėtų būti ne mažesnė kaip 60 procentų soties vertės (ASV);

— bandymo kamerų temperatūra bet kuriuo veikimo bandomąja medžiaga laikotarpio momentu neturėtų skirtis daugiau ± 1,5 °C ir būtų palaikoma bandomųjų gyvūnų rūšims nurodytos temperatūros intervale (2 priedėlis);

— reikėtų turėti patvirtintą bandymui naudojamos cheminės medžiagos analizės metodą, kurio aptikimo riba būtų gerokai mažesnė nei mažiausia nominalioji koncentracija ir reikėtų surinkti duomenis, kurie įrodytų, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentracija tirpale buvo užtikrinta ± 20 % vidutinių išmatuotų verčių tikslumu;

— suminis apvaisintų ikrų išgyvenamumas kontroliniuose ir, jei reikia, tirpiklio kontroliniuose induose turėtų būti lygus arba didesnis nei 2 priedėlyje nurodytos ribos;

— su augimu ir lyčių santykiu bandymo pabaigoje susiję priimtinumo kriterijai turėtų būti pagrįsti kontrolinių grupių duomenimis (sujungtų tirpiklio ir vandens kontrolinių bandinių arba vien tik tirpiklio bandinių, jei jie labai skiriasi):

▼M6

		Japoninė medaka	Zebrinė danija	Trispyglė dyglė
Augimas	Žuvies šlapio kūno, sausai nušluostyto filtravimo popieriumi, masė	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Ilgis (standartinis ilgis)	> 20 mm	> 14 mm	> 20 mm
Lyčių santykis (% patinų ar patelių)		30–70 %	30–70 %	30–70 %

— kai naudojamas tirpiklis, jis neturėtų daryti statistiškai reikšmingos įtakos išgyvenamumui ir nesukelti jokių endokrininės sistemos ardymo poveikių arba kito neigiamo poveikio ankstyvosiomis gyvenimo stadijomis, kurį rodytų tirpiklio kontroliniai bandiniai;

Jei stebimas nuokrypis nuo bandymo priimtinumo kriterijų, į padarinius reikėtų atsižvelgti įvertinant bandymo duomenų patikimumą ir šie svarstymai turėtų būti įtraukti į ataskaitą.

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Bandymo kameros

17. Galima naudoti bet kokias stiklines, nerūdijančiojo plieno ar kitos chemiškai inertiškos medžiagos kameras. Kameros turėtų būti gana didelių matmenų, kad atitiktų toliau nurodytus įkrovos kriterijus. Bandymo kameras pageidautina išdėstyti bandymo plote atsitiktinai. Palyginti su visiško atsitiktinio išdėstymo schema, geresnė būtų atsitiktinai išdėstytų blokų schema, kai kiekviename bloke yra kiekvienos koncentracijos bandinys. Bandymo kameros turėtų būti apsaugotos nuo nepageidaujamų trikdžių.

Rūšių parinkimas

18. Rekomenduojamos žuvų rūšys nurodytos 2 priedėlyje. Naujų rūšių įtraukimo procedūros pateiktos 2 pastraipoje.

Tėvų kartos žuvų laikymas

19. Informacijos apie tėvų kartos žuvų laikymą tinkamomis sąlygomis galima rasti EBPO TG 210(1). Tėvų kartos žuvis reikėtų maitinti tinkamu maistu vieną ar du kartus per dieną.

Embrionų ir lervų apdorojimas

20. Iš pradžių embrionai ir lervos gali būti veikiami į pagrindinę kamerą įdėtose mažesnėse stiklinėse ar nerūdijančiojo plieno kamerose, kurių šoninės ar galinės sienelės pakeistos tinklu, kad tirpalas galėtų tekėti per kamerą. Tekėjimą per tas mažas kameras be turbulencijos galima užtikrinti pakabinant jas ant svirties, įrengtos taip, kad ji indus keltų ir nuleistų, bet organizmai visą laiką būtų panardinti.

21. Jei ikrų talpyklos, grotelės ar tinkleliai buvo naudojami ikrams pagrindiniame inde laikyti, išsiritus lervoms, šitos apribojimo priemonės turėtų būti pašalintos, tačiau reikia palikti tinklelius, kurie neleistų žuvims ištrūkti. Jei lervas reikia pernešti, jų neturėtų veikti oras, o žuvims iš ikrų talpyklų išleisti neturėtų būti naudojami tinklai. Šio pernešimo laikas įvairioms rūšims skirtingas ir nebūtina jas visuomet pernešti.

▼M6

Vanduo

22. Bandymams tinka bet koks vanduo, kuriame kontrolinės grupės žuvų išgyvenamumas būtų bent ne blogesnis nei 3 priedėlyje aprašytame vandenyje. Vandens kokybė visą bandymo laiką turėtų būti vienoda. Siekiant užtikrinti, kad skiedimo vanduo nedarytų per didelės įtakos bandymo rezultatui (pvz., reaguodamas su bandomąja medžiaga) ar nedarytų neigiamo poveikio neršiančių žuvų elgesiui, kartkarčiais reikėtų imti vandens ėminius ir juos analizuoti. Suminės organinės anglies, laidžio, pH ir suspenduotų kietųjų dalelių analizė turėtų būti atliekama, pvz., kas tris mėnesius, jei žinoma, kad skiedimo vandens kokybė yra gana pastovi. Sunkiųjų metalų jonų (pvz., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), pagrindinių anijonų ir katijonų (pvz., Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}) ir pesticidų analizė turėtų būti atliekama, jei abejojama vandens kokybe. Informacijos apie vandens ėminių ėmimą ir cheminę analizę galima rasti 34 pastraipoje.

Bandymo tirpalai

23. Jei praktiškai įgyvendinama, reikėtų naudoti pratekamąją sistemą. Bandymuose su pratekamuoju vandeniu būtina sistema, kuri visą laiką dozuotų ir skiestų bandomosios cheminės medžiagos pradinį tirpalą (pvz., dozuojamasis siurblys, proporcingasis skiestuvas, sotintuvo sistema), kad į bandymo kameras būtų galima tiekti kelių bandymo koncentracijos verčių tirpalus. Pradinių tirpalų ir skiedimo vandens srautai kartkartėm turi būti tikrinami ir per visą bandymą neturėtų kisti daugiau kaip 10 %. Srautas, atitinkantis bent penkis bandymo kameros tūrius per 24 h (1) pasirodė esąs tinkamas. Reikėtų imtis priemonių, kad nebūtų naudojami plastikiniai vamzdeliai ar kitos medžiagos, nes kai kurios iš jų gali turėti biologiškai veiklių cheminių medžiagų arba gali adsorbuoti bandomąją cheminę medžiagą.

24. Pradinį tirpalą reikėtų ruošti nenaudojant tirpiklių, tiesiog sumaišant bandomąją cheminę medžiagą su skiedimo vandeniu naudojant mechanines priemones (pvz., purtant arba naudojant ultragarsą). Jei bandomoji cheminė medžiaga sunkiai tirpsta vandenyje, reikėtų taikyti procedūras, aprašytas EBPO gairėse apie sunkiai tiriamų cheminių medžiagų ir mišinių vandeninės terpės toksiškumo bandymus (36). Reikėtų vengti naudoti tirpiklius, bet kartais jie gali būti būtini, kad būtų galima gauti tinkamos koncentracijos pradinį tirpalą. Tinkamų tirpiklių pavyzdžiai pateikti (36).

25. Pusiau statinių bandymo sąlygų reikėtų vengti, išskyrus atvejus, kai jų naudojimas pagrįstas įtikinamomis priežastimis, susijusiomis su bandomąja chemine medžiaga (pvz., stabilumas, galimybė gauti, didelė kaina ar pavojus). Pusiau statinio bandymo metodo atveju galima taikyti dvi skirtingas atnaujinimo procedūras. Nauji bandymo tirpalai ruošiami švariose kamerose ir į jas atsargiai pernešami išgyvenę ikrai ir lervos arba bandymo organizmai paliekami bandymo kamerose, bet dalis (ne mažiau kaip du trečdaliai) vandens kasdien keičiama.

PROCEDŪRA

Veikimo bandomąja medžiaga sąlygos

Ikrų surinkimas ir trukmė

26. Siekiant išvengti genetinio poslinkio, ikrai renkami iš ne mažiau kaip trijų tėvų kartos porų ar grupių, sumaišytų ir atsitiktinai pasirinktų bandymui pradėti. Trispyglės dyglės dirbtinis apvaisinimas aprašytas 11 priedėlyje. Bandymą reikėtų pradėti kiek įmanoma greičiau apvaisinus ikrus, o embrionus pageidautina dėti į bandymo tirpalus prieš blastodisko dalijimosi pradžią arba kuo greičiau prasidėjus šiai stadijai, bet ne vėliau kaip 12 h po

▼M6

apvaisinimo. Bandymą reikėtų tęsti iki kontrolinės grupės lytinės diferenciacijos pabaigos (60 dienų po japoninės medakos, trispyglės dyglės ir zebrinės danijos išsiritimo).

Įkrova

27. Apvaisintų ikrų skaičius bandymo pradžioje turėtų būti ne mažesnis kaip 120 ikrų vienai koncentracijai, padalytų ne mažiau kaip 4 kartotinių bandinių induose (kontroliniams bandiniams priimtinas kvadratinei šakniai proporcingas priskyrimas). Ikrus reikėtų atsitiktinai paskirstyti tarp apdorojimo koncentracijos verčių (pagal statistines randomizavimo lenteles). Įkrovos dydis (žr. apibrėžties 1 priedėlyje) turėtų būti pakankamai mažas, kad be tiesioginio kamerų aeravimo jose ištirpusio deguonies koncentracija būtų ne mažesnė kaip 60 % soties ore vertės. Naudojant pratekamąją sistemą, rekomenduojamas 24 h vidutinis įkrovos dydis yra ne didesnis kaip 0,5 g/l, o bet kuriuo momentu – ne didesnis kaip 5 g/l tirpalo. Ne vėliau kaip 28 dieną po apvaisinimo kartotinių bandinių indų žuvų skaičių reikėtų perskirstyti, kad kiekviename inde būtų kuo vienodesnis žuvų skaičius. Jei pastebimas su veikimu bandomąja medžiaga susijęs gaištamumas, reikėtų atitinkamai mažinti kartotinių bandinių indų skaičių, kad koncentracijos vertėms tenkančių žuvų tankis būtų kuo vienodesnis.

Šviesa ir temperatūra

28. Dienos šviesos trukmė ir vandens temperatūra turėtų būti pritaikyta bandomųjų gyvūnų rūšims (dėl FSDT bandymo sąlygų žr. 2 priedėlį).

Maitinimas

29. Maistas ir maitinimas yra svarbiausi veiksniai ir svarbu, kad kiekvienai stadijai tinkamas maistas būtų tiekiamas reikiamais laiko tarpais ir tokiu kiekiu, kurio pakanka normaliam augimui užtikrinti. Maitinti reikėtų iki soties, bet perteklius turėtų būti kuo mažesnis. Siekiant užtikrinti pakankamą augimo spartą, žuvis reikėtų maitinti mažiausiai du kartus per dieną (savaitgaliais priimtinas maitinimas vieną kartą per dieną), intervalas tarp maitinimų turi būti bent trys valandos. Prireikus maisto perteklių ir išmatas reikėtų pašalinti, kad nesikauptų atliekos. Įgijus patirties, maistas ir maitinimo režimai nuolat tobulinami, kad būtų pagerintas išgyvenamumas ir optimizuotas augimas. Todėl reikėtų imtis priemonių, kad pasiūlytą režimą patvirtintų pripažinti ekspertai. Maitinimą reikėtų nutraukti likus 24 h iki bandymo pabaigos. Atitinkamų maisto produktų pavyzdžiai išvardyti 2 priedėlyje (taip pat žr. EBPO *Fish Testing Framework* (39).

Bandymo koncentracijos vertės

30. Bandomųjų cheminių medžiagų koncentracijos vertės turėtų būti išdėstytos taip, kaip aprašyta 4 priedėlyje. Reikėtų naudoti ne mažiau kaip tris bandymo koncentracijos vertes ir ne mažiau kaip keturis jų kartotinius bandinius. Renkantis bandymo koncentracijos verčių intervalą, reikėtų išnagrinėti turimų ūmaus toksiškumo tyrimų LC_{50} sąsajos su veikimo laikotarpiu kreivę. Jei duomenys bus naudojami rizikai įvertinti, reikėtų imti penkias bandymo koncentracijos vertes.

31. Nereikia naudoti cheminės medžiagos koncentracijos, kuri būtų didesnė kaip 10 % suaugusių žuvų ūmaus toksiškumo LC_{50} arba 10 mg/l, jei ši mažesnė. Maksimali bandymo koncentracija turėtų būti 10 % lervų arba mailiaus stadijos LC_{50}.

▼M6

Kontroliniai bandiniai

32. Be bandymo koncentracijos bandinių reikėtų bandyti skiedimo vandens kontrolinius bandinius (≥ 4 kontroliniai bandiniai) ir, jei tinka, tirpiklio kontrolinius bandinius (≥ 4 kontroliniai bandiniai). Atliekant bandymą, reikėtų naudoti tik tuos tirpiklius, kuriuos ištyrus įrodyta, kad jie nedaro jokios statistiškai reikšmingos įtakos bandymo vertinamosioms baigtims.

33. Jei naudojamas tirpiklis, jo galutinė koncentracija neturėtų būti didesnė kaip 0,1 ml/l (36) ir ji turėtų būti vienoda visose bandymo kamerose, išskyrus skiedimo vandens kontrolinių bandinių kameras. Tačiau reikėtų imtis priemonių, kad toks tirpiklis nebūtų naudojamas arba jo koncentracija būtų kuo mažesnė.

Analizinių nustatymų ir matavimų dažnumas

34. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos cheminė analizė turėtų būti atliekama prieš bandymo pradžią, kad būtų patikrinta atitiktis priimtinumo kriterijams. Visi kartotiniai bandiniai turėtų būti analizuojami atskirai bandymo pradžioje ir pabaigoje. Vienos bandymo koncentracijos kartotinis vienas bandinys turėtų būti analizuojamas mažiausiai kartą per savaitę, bandymo metu sistemingai keičiant kartotinius bandinius (1, 2, 3, 4, 1, 2…). Jei ėminiai laikomi tam, kad jų analizė būtų atlikta vėliau, iš pradžių reikėtų patvirtinti ėminių laikymo metodo tinkamumą. Ėminius reikėtų filtruoti (pvz., 0,45 μm akučių filtrą) arba centrifuguoti, kad būtų atliekamas tikrojo cheminės medžiagos tirpalo nustatymas.

35. Bandymo laikotarpiu reikėtų matuoti visų bandymo kamerų ištirpusio deguonies koncentraciją, pH, suminį kietumą, laidį, druskingumą (jei tinka) ir temperatūrą. Ištirpusio deguonies koncentraciją, druskingumą (jei tinka) ir temperatūrą reikėtų matuoti ne rečiau kaip kartą per savaitę, o pH, laidį ir kietumą – bandymo pradžioje ir pabaigoje. Būtų gerai, kad bent vienoje bandymo kameroje būtų nepertraukiamai kontroliuojama temperatūra.

36. Rezultatai turėtų būti pagrįsti išmatuotomis koncentracijos vertėmis. Tačiau, jei visą bandymą bandomosios cheminės medžiagos koncentracija tirpale buvo tinkamai palaikoma ± 20 % nominaliosios koncentracijos tikslumu, bandymo rezultatus galima pagrįsti nominaliosiomis arba išmatuotomis vertėmis.

Stebėjimai ir matavimai

Embrioninio vystymosi stadija

37. Ekspoziciją reikėtų pradėti kuo greičiau po apvaisinimo ir prieš blastodisko dalijimosi pradžią, bet ne vėliau kaip 12 h po apvaisinimo, kad veikimas bandomąja medžiaga būtų užtikrintas ankstyvuoju embriono vystymosi laikotarpiu.

Išsiritimas ir išgyvenamumas

38. Išsiritimo ir išgyvenamumo stebėjimai turi būti daromi bent kartą per dieną, o gauti skaičiai užrašomi. Negyvus embrionus, lervas ir mailių reikėtų iš karto, kai tik bus pastebėti, pašalinti, nes jie greitai suyra ir gali būti sudraskyti kitų žuvų. Negyvus individus reikėtų šalinti labai atsargiai, kad nebūtų užgauti ar fiziškai sužaloti šalia esantys ikrai ir (arba) lervos, kadangi jie yra labai gležni ir jautrūs. Žūties kriterijai kinta pagal gyvenimo stadiją:

— ikrų: gerokas skaidrumo sumažėjimas ir spalvos pokytis ypač ankstyvosiomis stadijomis dėl baltymo koaguliacijos ir (arba) nusėdimo, todėl atsiranda baltas matinis atspalvis;

▼M6

— lervų ir mailiaus: nejudrumas ir (arba) kvėpavimo judesių, ir (arba) širdies plakimo nebuvimas, ir (arba) balta matinė centrinės nervų sistemos spalva ir (arba) reakcijos į mechaninius dirgiklius nebuvimas.

Nenormali išvaizda

39. Turėtų būti užrašytas kūno formos anomalijų turinčių lervų ir žuvų skaičius ir aprašyta išsigimimo išvaizda bei prigimtis. Reikėtų pastebėti, kad nenormalūs embrionai ir lervos pasitaiko natūraliai ir kai kurių rūšių gali būti keli kontrolinio (-ių) bandinio (-ių) procentai. Nenormalūs gyvūnai turėtų būti pašalinti iš bandymo indų tik jiems nugaišus. Tačiau pagal 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyvą 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos, jei išsigimimo pasekmė – skausmas, kančios ir išsekimas arba ilgalaikė žala, o mirtį galima patikimai prognozuoti, gyvūnai turėtų būti anestezuojami ir numarinami pagal 44 pastraipą ir įtraukiami į analizės duomenis kaip nugaišę.

Nenormalus elgesys

40. Anomalijos, pvz., hiperventiliacija, nekoordinuotas plaukimas, netipiškas nejudrumas ir netipiškas elgesys maitinant turėtų būti užrašytas, kai tik pasirodo.

Masė

41. Pasibaigus bandymui visas išgyvenusias žuvis reikėtų numarinti (anestezuoti, jei reikėtų imti kraujo ėminius) ir išmatuoti atskirų šlapių žuvų (sausai nušluostytų filtravimo popieriumi) masę.

Ilgis

42. Pasibaigus bandymui reikėtų išmatuoti atskirų žuvų ilgį (standartinį ilgį).

43. Po šių stebėjimų ataskaitoje bus galima pateikti visus arba dalį šių duomenų:

— suminis gaištamumas;

— sveikų žuvų bandymo pabaigoje skaičius;

— išsiritimo pradžios ir pabaigos laikas;

— išgyvenusių gyvūnų ilgis ir masė;

— deformuotų lervų skaičiai;

— žuvų, kurios elgiasi neįprastai, skaičius.

Žuvų imčių ėmimas

44. Žuvų imtys imamos pasibaigus bandymui. Paimtas žuvis reikėtų numarinti, pvz., MS-222 (100–500 mg/l, buferuoto 200 mg/l $NaHCO_3$ tirpalu) arba FA-100 (4-alil-2-metoksifenoliu, eugenoliu), ir atskirai išmatuoti bei pasverti, nurodant šlapio kūno (sausai nušluostyto filtravimo popieriumi), arba anestezuoti, jei reikėtų imti kraujo ėminius (žr. 49 pastraipą).

Imčių ėmimas VTG analizei ir lyčiai nustatyti atliekant histologinį įvertinimą

45. Visas žuvis reikėtų paimti ir paruošti lyties bei VTG analizei. Reikėtų atlikti visų žuvų histologinę analizę lyčiai nustatyti. Atliekant VTG matavimus,

▼M6

priimtinas ne mažiau kaip 16 žuvų imties dalies iš kiekvieno kartotinio bandinio indo ėmimas. VTG analizei reikėtų paimti daugiau žuvų, jei pasirodytų, kad gauti imties dalies rezultatai yra neaiškūs.

46. VTG analizei ir lyčiai nustatyti skirtų ėminių ėmimo procedūra priklauso nuo VTG analizės metodo:

VTG analizės metodas imant galvos ir uodegos homogenatą

47. Žuvis numarinama. Kiekvienos žuvies galva ir uodega atskiriamos nuo kūno, pjaunant skalpeliu iš karto už krūtininio peleko ir prieš pat nugarinį peleką (žr. 1 paveikslą). Kiekvienos žuvies galva ir uodega sudedamos kartu, pasveriamos, atskirai sunumeruojamos, užšaldomos skystajame azote ir laikomos – 70 °C arba žemesnėje temperatūroje VTG analizei. Likusi žuvies kūno dalis numeruojama ir fiksuojama atitinkame fiksatoriuje histologiniam įvertinimui atlikti (22). Taikant šį metodą, įvertinamas kiekvieno gyvūno VTG ir histopatologija, todėl galimas VTG lygio kitimas gali būti susietas su žuvies (japoninės medakos ir trispyglės dyglės) fenotipine arba genetine lytimi. Papildoma informacija pateikta homogenizavimo (5 priedėlis) ir VTG kiekybinio nustatymo (6 priedėlis) rekomendacijose.

VTG analizės metodas imant kepenų homogenatą

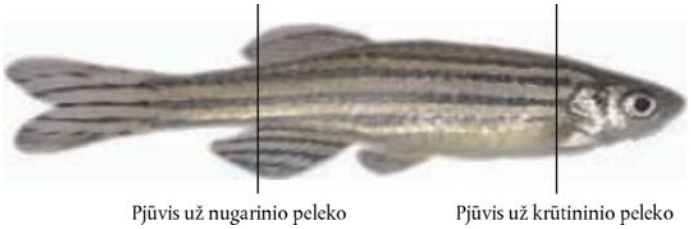
48. Žuvis numarinama. Kepenys išpjaunamos ir laikomos –70 °C arba žemesnėje temperatūroje. Rekomenduojamos kepenų išpjovimo ir pradinio apdorojimo procedūros pateiktos EBPO TG 229 (37) arba šio priedo C.37 priedėlyje (38). Kepenys atskirai homogenizuojamos, kaip aprašyta EBPO TG 229 arba šio priedo C.37 priedėlyje. Surinktame skystyje virš nuosėdų matuojamas VTG, taikant homologinį ELISA metodą (zebrinės danijos VTG kiekybinio nustatymo pavyzdys pateiktas 6 priedėlyje, japoninės medakos – EBPO TG 229 (37)). Pagal šį metodą taip pat galima gauti atskirų žuvų VTG ir gonadų histologijos duomenis.

VTG analizės metodas imant kraujo plazmą

49. Iš anestezuotos žuvies kraujas paimamas, atliekant širdies punkciją, iš uodegos venos arba nupjaunant uodegą, ir centrifuguojamas 4 °C temperatūroje plazmai paimti. Plazma laikoma – 70 °C arba žemesnėje temperatūroje iki bus panaudota. Visa žuvis numarinama ir fiksuojama histologijai. Plazmos ėminiai ir žuvys atskirai numeruojamos, kad būtų galima susieti VTG lygį ir žuvies lytį.

1 paveikslas.

Kaip perpjauti žuvį, kad būtų galima matuoti VTG galvos ir uodegos homogenate ir atlikti vidurinės dalies histologinį įvertinimą



Pjūvis už nugarinio peleko Pjūvis už krūtininio peleko

▼M6

Genetinės lyties nustatymas

50. Genetinei lyčiai nustatyti paimamas atitinkamus žymenis turinčių rūšių žuvų biologinis ėminys. Imamas japoninės medakos analinio arba nugarinio peleko ėminys. Išsamus aprašymas, įskaitant audinių ėminių ėmimą ir lyties nustatymą PCR metodu, pateiktas 9 priedėlyje. Trispyglės dyglės audinių ėminių ėmimo ir lyties nustatymo PCR metodu aprašymas pateiktas 10 priedėlyje.

VTG matavimas

51. VTG matavimas turėtų būti pagrįstas patvirtintu kiekybinės analizės metodu. Reikėtų turėti informacijos apie tam tikroje laboratorijoje taikomo metodo laboratorinių ir tarplaboratorinių nustatymų kintamumą. Laboratorinio ir tarplaboratorinio kintamumo (labiausiai tikėtinas) šaltinis yra žuvų populiacijos skirtingos vystymosi stadijos. Atsižvelgiant į VTG matavimo kintamumą, vien tik šia vertinamąja baigtimi pagrįstas NOEC vertes reikėtų aiškinti labai atsargiai. Yra skirtingų metodų, kuriais būtų galima įvertinti šiame tyrime nagrinėjamų žuvų rūšių VTG gamybą. Palyginti jautrus ir specifinis matavimo metodas – tai proteinų koncentracijos nustatymas, taikant imunofermentinę analizę (ELISA). Reikėtų naudoti homologinius antikūnius (išaugintus tos pačios rūšies VTG) ir svarbiausius homologinius etalonus.

Lyties nustatymas

52. Atsižvelgiant į VTG ėminių ėmimo procedūrą, visa žuvis arba jos likusi vidurinioji dalis dedama į iš anksto paženklintą apdorojimo kasetę ir fiksuojama atitinkamame fiksatoriuje, kad būtų galima atlikti histologinį lyties nustatymą (taip pat galima įvertinti gonadų stadiją). Fiksavimo ir įliejimo rekomendacijos pateiktos 7 priedėlyje, tai pat EBPO gairėse, skirtose su endokrinine sistema susijusios žuvų gonadų histopatologijos diagnozei (22). Apdorota žuvis įliejama į parafino blokus. Atskiras žuvis reikėtų dėti išilgai į parafino bloką. Gaunami ne mažiau kaip šeši (3–5 μm storio) kiekvienos žuvies išilginiai pjūviai priekinėje plokštumoje, įskaitant abiejų gonadų audinį. Atstumas tarp šių pjūvių turėtų būti lygus maždaug 50 μm patinams ir 250 μm patelėms. Tačiau dėl to, kad kiekviename bloke dažnai gali būti patinai ir patelės (jei į vieną bloką įlietas ne vienas gyvūnas), tarpas tarp šių blokų pjūvių turėtų būti maždaug 50 μm tol, kol negaunami mažiausiai šeši kiekvieno patino gonadų pjūviai. Paskui tarpą tarp pjūvių patelėms galima padidinti iki maždaug 250 μm. Pjūviai dažomi hematoksilinu bei eozinu ir tiriami optiniu mikroskopu, kaip stebėjimo tikslą turint lytį (patinas, patelė, hermafroditas arba nediferencijuota lytis). Hermafrodizmas apibrėžiamas kaip daugiau nei vieno ovocito buvimas sėklidėje, išanalizavus 6 pjūvius, arba su spermatogeninėmis ląstelėmis kiaušidėse (taip/ne). Histopatatologija ir kiaušidžių bei sėklidžių stadijos nustatymas neprivalomi, tačiau, jei atliekamas tyrimas, reikėtų atlikti statistinę rezultatų analizę ir juos pateikti ataskaitoje. Pažymėtina, kad kai kurios žuvų rūšys (pvz., japoninė medaka ir kartais zebrinė danija) natūraliai neturi visiškai išsivysčiusios gonadų poros ir gali būti tik viena gonada. Visus šiuos stebėjimus reikėtų užrašyti.

53. Atskirų japoninės medakos žuvų genetinė lytis nustatoma pagal tai, ar yra vyriškosios lyties genas DMY ant Y chromosomos. Medakos genotipinę lytį galima identifikuoti nustatant DMY geno seką DNR, ekstrahuotos, pvz., iš analinio ar nugarinio peleko gabaliuko. Neatsižvelgiant į fenotipą, DMY buvimas rodo XY individą (patiną), o DMY nebuvimas rodo XX individą (patelę) (23). Audinių ruošimo ir PCR metodo rekomendacijos pateiktos 9

▼M6

priedėlyje. Atskirų trispyglės dyglės žuvų genetinė lytis taip pat nustatoma 10 priedėlyje aprašytu PCR metodu.

54. Ataskaitoje reikėtų pateikti informaciją apie hermafroditų (apibrėžtis pateikta 1 priedėlyje) buvimą.

Antriniai lytiniai požymiai

55. Tokių rūšių kaip japoninė medaka antrinius lytinius požymius valdo endokrininė sistema, todėl, jei įmanoma, žuvų fizinę išvaizdą reikėtų stebėti veikimo bandomąja medžiaga pabaigoje. Spenelių susidarymas japoninės medakos patelių analinio peleko užpakalinėje dalyje yra jautrus androgenams. Šio priedo C.37 skyriuje (38) pateiktos atitinkamos patinų ir androgenų paveiktų patelių antrinių lytinių požymių nuotraukos.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

56. Svarbu, kad vertinamosios baigtys būtų nustatomos taikant patvirtintą tinkamiausią statistinę analizę. Statistinis vienetas yra kartotinis bandinys, bet į statistinę analizę reikėtų įtraukti kartotinių bandinių kintamumą. 8 priedėlyje pateikta sprendimo priėmimo eigos schema, siekiant padėti pasirinkti bandymo duomenimis pagrįstą tinkamiausią statistinį kriterijų. Visų įtrauktų vertinamųjų baigčių statistinis reikšmingumo lygis yra 0,05.

Lyčių santykis ir genetinė lytis

57. Jei dozės ir atsako priklausomybė yra monotoniška, taikant Jonckheere-Terpstra kriterijų (tendencijos kriterijų) reikėtų išanalizuoti lyčių santykį, siekiant nustatyti, ar veikimas bandomąja medžiaga jam padarė reikšmingą poveikį (NOEC/LOEC metodas). Jei nustatoma, kad priklausomybė nėra monotoniška, reikėtų taikyti priklausomybės paporiui kriterijų. Taikomas Dunnett'o kriterijus, jei galima gauti normalųjį pasiskirstymą ir homogenišką sklaidą. Taikomas Tamhane-Dunnetto kriterijus, jei sklaida heterogeniška. Kitais atvejais taikomas tikslusis Mann-Whitney kriterijus ir Bonferroni-Holm pataisa. Schema, kurioje aprašyta lyčių santykio statistika, pateikta 8 priedėlyje. Patinų, patelių, hermafroditų ir nediferencijuotų gyvūnų lyčių santykius reikėtų pateikti lentelėse, kaip priklausomybės nuo koncentracijos verčių santykius ± SD. Reikėtų pažymėti statistinio reikšmingumo lygį. Pavyzdžiai pateikti FSDT 2 tarpsnio tinkamumo patvirtinimo ataskaitoje (42). Genetinė lytis turėtų būti pateikta ataskaitoje kaip patinų, patelių, hermafroditų ir nediferencijuotų gyvūnų fenotipinės lyties reversijos procentinė dalis.

VTG koncentracijos vertės

58. VTG koncentracijos vertės turėtų būti išanalizuotos siekiant nustatyti, ar veikimas bandomąja medžiaga joms padarė reikšmingą poveikį (NOEC/-LOEC metodas). Geriau taikyti Dunnett kriterijų nei t kriterijų darant Bonferroni pataisą. Jei taikoma Bonferroni pataisa, tinkamesnė yra Bonferroni-Holm pataisa. Tikslinga būtų taikyti VTG logaritminę transformaciją, kad būtų gautas normalusis pasiskirstymas ir homogeniška sklaida. Toliau, jei koncentracijos ir atsako priklausomybė yra monotoniška, pirmenybė, palyginti su visais pirmiau išvardytais kriterijais, teikiama Jonckheere Terpstra kriterijui. Jei taikomi t kriterijai arba Dunnetto kriterijus, nereikia naudoti ANOVA reikšmingumo Fisherio kriterijaus, kad analizę būtų galima tęsti. Duomenys pateikti 8 priedėlio schemoje. Rezultatus, kaip patinų, patelių, hermafroditų ir nediferencijuotų gyvūnų koncentracijos vidurkius

▼M6

± SD, reikėtų pateikti lentelėse. Reikėtų pažymėti fenotipinių patelių ir fenotipinių patinų statistinį reikšmingumą. Pavyzdžiai pateikti FSDT 2 tarpsnio tinkamumo patvirtinimo ataskaitoje (42).

Bandomosios cheminės medžiagos faktinės koncentracijos vertės

59. Bandomosios cheminės medžiagos faktinę koncentraciją kamerose reikėtų nustatyti 34 pastraipoje nurodytu dažnumu. Rezultatus reikėtų pateikti lentelėse kaip vidutinę koncentraciją ± SD pagal kartotinius bandinius, taip pat pagal koncentraciją kartu su informacija apie ėminių skaičių, pažymint riktus vidutinės apdorojimo koncentracijos ± 20 % atžvilgiu. Pavyzdžiai pateikti FSDT 2 tarpsnio tinkamumo patvirtinimo ataskaitoje (42).

Rezultatų aiškinimas

60. Rezultatus reikėtų aiškinti atsargiai, jei išmatuotos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertės yra arti taikomo analizės metodo aptikimo ribos.

Bandymo ataskaita

61. Bandymo ataskaitoje turėtų būti ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga

— atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės; cheminės medžiagos identifikavimo duomenys, įskaitant bandomosios cheminės medžiagos grynumo duomenis ir jos kiekybinio nustatymo metodą.

Bandymo sąlygos

— taikytos bandymo procedūros (pvz., pratekamoji, pusiau statinė ar atnaujinimo); bandymo schema, įskaitant bandomosios medžiagos koncentracijos vertes, pradinių tirpalų paruošimo būdą (priede), atnaujinimo dažnumą (soliubilizavimo priemonę, jei naudojama, ir jos koncentraciją);

— nominaliosios bandymo koncentracijos vertės, bandymo kamerose išmatuotų verčių vidurkiai ir jų standartinis nuokrypis, šių verčių gavimo metodas (taikytą analizės metodą reikėtų pateikti priede; įrodymai, kad matuojama bandomosios cheminės medžiagos koncentracija tikrame tirpale;

— kamerų vandens kokybė: pH, kietumas, temperatūra ir ištirpusio deguonies koncentracija;

— išsami informacija apie maitinimą (pvz., maisto rūšį (-is), šaltinis, duodamas kiekis ir davimo dažnumas, teršalų analizės duomenys (pvz., PCB, PAH ir organinių chloro pesticidų kiekis), jei tinka.

Rezultatai

— įrodymai, kad kontroliniai bandiniai atitinka tinkamumo kriterijus: duomenis apie išsiritimo laipsnį reikėtų pateikti lentelėse kaip procentinę dalį pagal kartotinius bandinius ir koncentracijos vertes. Kontrolinių bandinių priimtinumo kriterijų neatitinkantys riktai turėtų būti pažymėti. Išgyvenamumo duomenis reikėtų pateikti kaip procentinę dalį pagal kartotinius bandinius ir koncentracijos vertes. Kontrolinių bandinių tinkamumo kriterijų neatitinkantys riktai turėtų būti pažymėti;

— aiškiai nurodyti atskirų stebimų vertinamųjų baigčių rezultatai: embrionų išgyvenamumo ir išsiritimo sėkmė; išoriniai nenormalios išvaizdos požymiai; ilgis ir masė; VTG matavimai (ng/g homogenato, ng/ml plazmos

▼M6

arba ng/mg kepenų); gonadų histologija, lyčių santykis, genetinių lyčių duomenys; visų žuvų neįprastų reakcijų atvejų dažnumas ir bandomosios cheminės medžiagos sukelti matomi poveikiai.

62. Rezultatus reikėtų pateikti kaip vidutines vertes ± standartinis nuokrypis (SD) arba standartinė paklaida (SE). Statistinius duomenis reikėtų pateikti bent pagal NOEC ir LOEC, nurodant pasikliovimo intervalus. Reikėtų laikytis statistinio apdorojimo schemos (8 priedėlis).

NUORODOS

(1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test,* Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

(2) Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, and J.P. Sumpter, 1996, „Inhibition of testicular growth in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals“, Environmental Toxicology and Chemistry 15, pp. 194-202.

(3) Sumpter, J.P. and S. Jobling, 1995, „Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment“, Environmental Health Perspectives 103, pp. 173-178.

(4) Tyler, C.R., R.van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix, and H. Trip (1999), „An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin“, Environmental Toxicology and Chemistry 18, pp. 337-347.

(5) Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen, and P. Bjerregaard (2001a), „Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio)“, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 130, pp. 119-131.

(6) Andersen, L., P. Bjerregaard, and B. Korsgaard (2003), „Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters“, Fish Physiology and Biochemistry 28, pp. 319-321.

(7) Orn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren, and G.I. Petersen (2003), „Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (Danio rerio) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone“, Aquatic Toxicology 65, pp. 397-411.

(8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla, and C.R. Tyler (2002), „Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances“, Environmental Toxicology and Chemistry 21, pp. 319-326.

(9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear, and Z.J. Wang (2007), „Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (Oryzias latipes) eggs, larvae and breeding adults“, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, pp. 533-541.

(10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc, and C.V.Sullivan (1999), „Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds“, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 123, pp. 113-125.

(11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr, and J.M. Porcher (2002), „Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio)“, Environmental Toxicology and Chemistry 21, pp. 1699-1708.

(12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara, and E. Tamiya (2002), „Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (Oryzias latipes) vitellogenin“, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 132, pp. 161-169.

(13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James, and B.E. Bengtsson (2004), „The juvenile three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus L.) as a model organism for endocrine disruption – II – kidney

▼M6

hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction“, Aquatic Toxicology 70, pp. 311-326.

(14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita, and T. Iguchi (2004), „Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka“, Journal of Health Science 50, pp. 301-308.

(15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson, and A. Goksoyr (2006), „Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin. Aquatic Toxicology“, 78, pp. 202-206.

(16) Jensen, K.M. and G.T. Ankley (2006), „Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (Pimephales promelas)“, Ecotoxicology and Environmental Safety 64, pp. 101-105.

(17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S, Norrgren, L., and Bjerregaard, P (2001b), „Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)“, Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597, pp. 48-51.

(18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher, and A. Goksoyr (2004), „Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening“, Analytical and Bioanalytical Chemistry 378, pp. 621-633.

(19) Orn, S., S. Yamani, and L. Norrgren (2006), „Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone“, Archives of Environmental Contamination and Toxicology 51, pp. 237-243.

(20) Scholz, S. and N. Kluver (2009), Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, Sexual Development 3, pp. 136-151.

(21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers, and H. Segner (2005), „An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, Danio rerio“, Environmental Toxicology and Chemistry 24, pp. 1088-1098.

(22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paris.

(23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata, and Y. Nagahama (2004), „Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, Oryzias latipes“, Developmental Dynamics 231, pp. 518-526.

(24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi, and M. Sakaizumi (2004), „Field survey of sex-reversals in the medaka, Oryzias latipes: genotypic sexing of wild populations“, Zoological Science 21, pp. 613-619.

(25) Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, and R.W. Flick (2007), „Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen“, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, pp. 8897-8901.

(26) Palace,V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron, and K.A. Kidd (2009), „Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake“, Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 66, pp. 1920-1935.

(27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno, and C.R. Tyler (2006), „Development of chronic tests for endocrine active chemicals – Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (Pimephales promelas)“, Aquatic Toxicology 77, pp. 279-290.

▼M6

(28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren, and P. Bjerregaard (2006), „Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)“, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 144, pp. 57-66.

(29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard, and P. Bjerregaard (2004), „Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (Danio rerio)“, Fish Physiology and Biochemistry 30, pp. 257-266.

(30) Morthorst, J.E., H. Holbech, and P. Bjerregaard (2010), „Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations“, Aquatic Toxicology 98, pp. 336-343.

(31) Kiparissis,Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch, and C.D. Metcalf (2003), „Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (Oryzias latipes)“, Aquatic Toxicology 63, pp. 391-403.

(32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley, and C.R. Tyler (2004), „Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development“, Aquatic Toxicology 70, pp. 11-21.

(33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen, and P. Bjerregaard (2007), „Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (Danio rerio)“, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, pp. 165-170.

(34) Šio priedo C.14 skyrius. Žuvų mailiaus augimo bandymas.

(35) Šio priedo C.4 skyrius. Lengvo biologinio skaidumo nustatymas.

(36) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.

(37) OECD (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay,* Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

(38) Šio priedo C.37 skyrius. 21 dienos trukmės žuvų tyrimas. Trumpalaikis estrogeninio bei androgeninio veikimo ir aromatazės slopinimo atrankos tyrimas.

(39) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Paris

(40) Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H (2007), „Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, Danio rerio“ Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A, 70, 9-10 pp 768-779.

(41) OECD (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/-MONO(2011)22, OECD, Paris.

(42) OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/-MONO(2011)23, OECD, Paris.

(43) OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/-MONO(2011)24, OECD, Paris.

(44) 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos. OL L 276, 2010 10 20, p. 33.

▼M6

1 priedėlis

Santrumpos ir apibrėžtys

Apikalinė vertinamoji baigtis – sukelianti poveikį populiacijos lygiu

ASV – soties ore vertė

Biologinis žymuo – sukeliantis poveikį individo lygiu

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys

Dph – dienos po išsiritimo

DMY – Y specifinis DM domeno genas, kurio reikia medaka rūšies žuvų patinams vystytis

ELISA – fermentų absorbcijos imunocheminis tyrimas (imunofermentinė analizė)

Žuvies masė – žuvies šlapio kūno masė (sausai nušluostyto filtravimo popieriumi)

FSDT – žuvų lytinio vystymosi bandymas

HPG ašis – pagumburio-hipofizės-gonadų ašis

Hermafroditinė žuvis – žuvis su daugiau kaip vienu ovocitu sėklidėje, išanalizavus 6 pjūvius, arba su spermatogeninėmis ląstelėmis kiaušidėse (taip/ne)

Įkrovos dydis – šlapios žuvies masė vandens tūrio vienetui

MOA – veikimo būdas

RT-PCR – atvirkštinės transkriptazės polimerazės grandininė reakcija

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

Nediferencijuota žuvis – žuvis, kurios gonados neturi įžiūrimų lytinių ląstelių.

VTG – vitelogeninas

▼M6

2 priedėlis

FSDT bandymo sąlygos (gėlavandenės rūšys)

1. Rekomenduojamos rūšys	Japoninė medaka (*Oryzias latipes*)	Zebrinė danija (*Danio rerio*)	Trispyglė dyglė (*Gasterostreus aculeatus*)
2. Bandymo tipas	Pratekėjimo ar pusiau statinis	Pratekėjimo ar pusiau statinis	Pratekėjimo ar pusiau statinis
3. Vandens temperatūra	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Apšvietimo kokybė	Fluorescencinės lempos (plataus spektro)	Fluorescencinės lempos (plataus spektro)	Fluorescencinės lempos (plataus spektro)
5. Apšvieta	10–20 μE/m^2/s, 540–1 080 liuksų arba 50–100 ft-c (laboratorijos aplinkos lygiai)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 080 liuksų arba 50–100 ft-c (laboratorijos aplinkos lygiai)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 080 liuksų arba 50–100 ft-c (laboratorijos aplinkos lygiai)
6. Apšvietimo laikotarpiai	12–16 h šviesa, 8–12 h tamsa	12–16 h šviesa, 8–12 h tamsa	16 h šviesa, 8 h tamsa
7. Minimalus kameros tūris	Atskiros kameros vandens tūris turėtų būti ne mažesnis kaip 7 l	Atskiros kameros vandens tūris turėtų būti ne mažesnis kaip 7 l	Atskiros kameros vandens tūris turėtų būti ne mažesnis kaip 7 l
8. Bandymo tirpalų tūrio pakeitimas	Ne mažiau kaip 5 kartus per dieną	Ne mažiau kaip 5 kartus per dieną	Ne mažiau kaip 5 kartus per dieną
9. Bandymo organizmų amžius ekspozicijos pradžioje	Tik ką apvaisinti ikrai (ankstyvoji blastulės stadija)	Tik ką apvaisinti ikrai (ankstyvoji blastulės stadija)	Tik ką apvaisinti ikrai
10. Vienos apdorojimo koncentracijos ikrų skaičius	Ne mažesnis kaip 120	Ne mažesnis kaip 120	Ne mažesnis kaip 120
11. Bandomosios medžiagos koncentracijos verčių skaičius	Ne mažesnis kaip 3 (ir atitinkami kontroliniai bandiniai)	Ne mažesnis kaip 3 (ir atitinkami kontroliniai bandiniai)	Ne mažesnis kaip 3 (ir atitinkami kontroliniai bandiniai)
12. Vienos apdorojimo koncentracijos kartotinių bandinių skaičius	Ne mažesnis kaip 4 (išskyrus priskyrimą kontroliniams bandiniams proporcingai kvadratinei šakniai)	Ne mažesnis kaip 4 (išskyrus priskyrimą kontroliniams bandiniams proporcingai kvadratinei šakniai)	Ne mažesnis kaip 4 (išskyrus priskyrimą kontroliniams bandiniams proporcingai kvadratinei šakniai)
13. Maitinimo režimas	Gyvos *Artemia*, šaldytos suaugusios sūriavandenės krevetės, dribsniai ir kt. Rekomenduojama maitinti du kartus per dieną	Specialus mailiaus maistas, gyvos *Artemia*, šaldytos suaugusios sūriavandenės krevetės, dribsniai ir kt. Rekomenduojama maitinti du kartus per dieną	Gyvos *Artemia*, šaldytos suaugusios sūriavandenės krevetės, dribsniai ir kt. Rekomenduojama maitinti du kartus per dieną
14. Aeravimas	Jokio, jei DO koncentracija nesumažėja iki mažiau kaip 60 % soties	Jokio, jei DO koncentracija nesumažėja iki mažiau kaip 60 % soties	Jokio, jei DO koncentracija nesumažėja iki mažiau kaip 70 % soties

▼M6

15. Skiedimo vanduo	Švarus paviršinis, šulinių arba atkurtasis vanduo	Švarus paviršinis, šulinių arba atkurtasis vanduo	Švarus paviršinis, šulinių arba atkurtasis vanduo
16. Veikimo bandomąja chemine medžiaga trukmė	60 dienų po išsiritimo	60 dienų po išsiritimo	60 dienų po išsiritimo
17. Biologinės vertinamosios baigtys	Išsiritimo sėkmė, išgyvenamumas, makroskopinė morfologija, VTG, gonadų histologija, genetinė lytis, lyčių santykis	Išsiritimo sėkmė, išgyvenanumas, makroskopinė morfologija, VTG, gonadų histologija, lyčių santykis	Išsiritimo sėkmė, išgyvenamumas, makroskopinė morfologija, VTG, gonadų histologija, lyčių santykis
18. Bandymo priimtinumo kriterijai naudojant jungtinius kartotinius kontrolinius bandinius	Išsiritimo sėkmė > 80 %	Išsiritimo sėkmė > 80 %	Išsiritimo sėkmė > 80 %
	Išgyvenamumas po išsiritimo ≥ 70 %	Išgyvenamumas po išsiritimo ≥ 70 %	Išgyvenamumas po išsiritimo ≥ 70 %
	Augimas (žuvies šlapio kūno, sausai nušluostyto filtravimo popieriumi, masė) > 150 mg	Augimas (žuvies šlapio kūno, sausai nušluostyto filtravimo popieriumi, masė) > 75 mg	Augimas (žuvies šlapio kūno, sausai nušluostyto filtravimo popieriumi, masė) > 120 mg
	Ilgis (standartinis ilgis) >20 mm	Ilgis (standartinis ilgis) >14 mm	Ilgis (standartinis ilgis) > 20 mm
	Lyčių santykis (% patinų arba patelių) 30 %–70 %	Lyčių santykis (% patinų arba patelių) 30 %–70 %	Lyčių santykis (% patinų arba patelių) 30 %–70 %

▼**M6**

3 priedėlis

Tinkamo skiedimo vandens cheminės charakteristikos

SUDEDAMOJI DALIS	KONCENTRACIJA
Kietosios dalelės	< 20 mg/l
Suminė organinė anglis	< 2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	< 1 µg/l
Liekamasis chloras	< 10 µg/l
Suminis organinių fosforo pesticidų kiekis	< 50 ng/l
Suminis chloro organinių pesticidų ir polichlorintųjų bifenilų kiekis	< 50 ng/l
Suminis organinio chloro kiekis	< 25 ng/l

▼M6

4 priedėlis

Rekomendacijos dėl bandymo koncentracijos verčių, paimtos iš C.14 bandymo metodo

Stulpelis (koncentracijos verčių tarp 100 ir 10 arba 10 ir 1 skaičius) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Stulpelyje galima pasirinkti trijų (ar daugiau) viena po kitos einančių koncentracijos verčių seką. Stulpelio (x) koncentracijų vidurio taškai pateikti stulpelyje (2x + 1). Išvardytos vertės gali būti išreikštos procentine tūrio ar masės koncentracija (mg/l ar µg/l). Vertės gali būti padaugintos ar padalytos iš 10, pakelto bet kuriuo laipsniu, jei reikia. 1 stulpelį galima būtų naudoti, jei buvo didelė toksiškumo lygio neapibrėžtis.

▼M6

5 priedėlis

Zebrinės danijos, juodosios drūtagalvės rainės, trispyglės dyglės ir japoninės medakos mailiaus galvos ir uodegos homogenizavimo rekomendacijos

Šio skyriaus tikslas – aprašyti procedūras, kurios taikomos prieš VTG koncentracijos kiekybinį nustatymą. Galima taikyti kitas procedūras, kurios užtikrina palyginamą VTG kiekybinį nustatymą. Vietoj VTG koncentracijos nustatymo galvos ir uodegos homogenate ją galima nustatyti kraujo plazmoje arba kepenyse.

Procedūra

1. Žuvis anestezuojama ir numarinama pagal bandymo aprašymą.

2. Žuvies galva ir uodega nupjaunamos pagal bandymo aprašymą. **Svarbu**: visus skrodimo įrankius ir pjaustymo lentą po kiekvienos atskiros žuvies apdorojimo reikėtų tinkamai plauti ir valyti (pvz., 96 % etanoliu), kad patelės arba paveikti patinai neužterštų VTG nepaveiktų patinų.

3. Kiekvienos žuvies kartu sudėtos galvos ir uodegos masė nustatoma mg tikslumu.

4. Pasvertos dalys dedamos į atitinkamus (pvz., 1,5 ml Ependorfo) mėgintuvėlius ir užšaldomos – 80 °C temperatūroje iki homogenizavimo pradžios arba iš karto homogenizuojamos ant ledo dviem plastikinėmis piestelėmis. (Galima taikyti kitus metodus, jei jie atliekami ant ledo ir gaunama vienalytė masė). **Svarbu**: *mėgintuvėlius reikėtų tinkamai sunumeruoti, kad žuvies galvą ir uodegą būtų galima susieti su atitinkama liemens dalimi, naudojama gonadų histologijai.*

5. Gavus vienalytę masę, įpilama ledu atšaldyto **homogenizavimo buferinio skysčio** (*), kurio kiekis 4–10 kartų didesnis už audinio masę (užrašomas praskiedimas). Toliau maišoma piestelėmis, kad būtų gautas vienalytis mišinys. **Svarbi pastaba**: *kiekvienai žuviai naudojamos naujos piestelės.*

6. Ėminiai laikomi ant ledo iki bus centrifuguojami 30 min **4 °C** temperatūroje, esant 50 000 g.

7. Skysčio virš nuosėdų nuo 20 iki 50 µl (užrašomas tūris) porcijos pipete įpilamos į **mažiausiai du** mėgintuvėlius, pipetės galą panardinant žemiau riebalų sluoksnio paviršiuje ir atsargiai įsiurbiant skystį virš nuosėdų be riebalų arba nuosėdų frakcijų.

8. Mėgintuvėliai laikomi – 80 °C iki naudojimo.

(*) *Homogenizavimo buferinis skystis:*

50 mmol tris-HCl, pH 7,4; 1 % proteazės inhibitoriaus mišinio (Sigma): 12 ml tris-HCl, pH 7,4, + 120 µl proteazės inhibitoriaus mišinio (arba lygiaverčių proteazės inhibitorių mišinių).

TRIS: TRIS (tris(hidroksimetil)aminometanas) YPAČ GRYNAS (ICN)

Proteazės inhibitoriaus mišinys: iš Sigma (žinduolių audiniams). Produkto numeris **P 8340.**

***Pastaba*:** homogenizavimo buferinis skystis turėtų būti naudojamas tą pačią dieną, kurią pagamintas. Naudojant dedamas ant ledo

▼M6

6 priedėlis

Zebrinės danijos (Danio rerio) galvos ir uodegos homogenato vitelogenino kiekybinio nustatymo rekomendacijos (modifikuotas Holbech ir kt., 2001 metodas). galima taikyti kitas procedūras, kai naudojami homologiniai antikūnai, ir kitus etalonus

1. Mikrotitravimo plokštelės (sertifikuotos Maxisorp F96, Nunc, Roskilde Denmark), iš anksto padengtos 5 µg/ml zebrinės danijos lipovitelino anti-IgG atšildomos ir 3 kartus plaunamos plovimo buferiniu skysčiu (*).

2. Išgrynintas zebrinės danijos vitelogenino etalonas ([1]) skiedžiamas skiedimo buferiniu skysčiu (**), kad būtų gauta 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 ir 20 ng/ml tirpalų serija, o ėminiai skiedžiami skiedimo buferiu mažiausiai 200 kartų (matricos efektui išvengti) ir užlašinami ant plokštelių. Imami du tyrimo kontroliniai mėginiai. Į kiekvieną duobutę įlašinama 150 µl. Įlašinama po du etalonų mėginius ir tris bandinių mėginius. Inkubuojama per naktį 4 °C temperatūroje ant purtyklės.

3. Plokštelės plaunamos 5 kartus plovimo buferiniu skysčiu (*).

4. Su dekstrano (pvz., AMDEX A/S, Denmark) grandine sujungtos HRP (krienų peroksidazės) ir antikūnų konjugatas skiedžiamas plovimo buferiniu skysčiu; faktinis skiedimas skiriasi priklausomai nuo partijos ir amžiaus. Į kiekvieną duobutę įlašinama 150 µl ir plokštelės 1 h inkubuojamos ant purtyklės kambario temperatūroje.

5. Plokštelės 5 kartus plaunamos plovimo buferiniu skysčiu (*), o plokštelių apačia kruopščiai nuvaloma etanoliu.

6. Į kiekvieną duobutę įlašinama 150 µl TMB (3,3′,5,5′-tetrametilbenzidino) plus (***). Plokštelė ant purtyklės apsaugoma nuo šviesos alavo folija ir stebimas spalvos atsiradimas.

7. Gavus kalibravimo kreivę, fermento aktyvumas slopinamas į kiekvieną duobutę įlašinant 150 µl 0,2 mol/l H_2SO_4.

8. Optinis tankis matuojamas esant 450 nm (pvz., *Molecular Devices Thermomax* plokštelių spektrofotometru). Duomenys analizuojami naudojant susijusią programinę įrangą (pvz., Softmax).

(*) Plovimo buferinis skystis:

PBS pradinis tirpalas (****)	500,0	ml
BSA (jaučio serumo albuminas)	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

Nustatoma pH vertė lygi 7,3 ir skiedžiama ypač grynu (Millipore) H_2O iki 5 l. Laikoma 4 °C.

(**) Skiedimo buferinis skystis:

PBS pradinis tirpalas (****)	100,0	ml
BSA	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

Nustatoma pH vertė lygi 7,3 ir skiedžiama ypač grynu (Millipore) H_2O iki 1 l. Laikoma 4 °C.

(***) TMB plus yra naudoti paruoštas substratas, kurį gamina KemEnTec (Danija). Jis jautrus šviesai. Laikomas 4° C.

([1]) Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), grynintas pagal: Denslow, N.D., Chow, M.C., Kroll, K.J., Green, L. (1999). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. Ecotoxicology 8: 385-398.

▼**M6**

(****) PBS pradinis tirpalas

NaCl	160,0	g
KH_2PO_4	4,0	g
Na_2HPO_4 $2H_2O$	26,6	g
KCl	4,0	g

pH vertė pakoreguojama, kad būtų 6,8 ir skiedžiama ypač grynu (Millipore) H_2O iki 2 l. Laikoma kambario temperatūroje.

▼M6

7 priedėlis

Lyties ir gonadų stadijos nustatymui skirtų audinių pjūvių ruošimo rekomendacijos

Šio skyriaus tikslas – aprašyti procedūras, atliekamas prieš histologinių pjūvių įvertinimą. Galima taikyti kitas procedūras, kurias taikant gaunami panašūs lyties ir gonadų stadijos nustatymo rezultatai.

Be kelių išimčių, japoninei medakai (JMD) ir zebrinei danijai (ZF) taikomos procedūros yra panašios.

Numarinimas, skrodimas ir audinių fiksavimas

Tikslai:

1. Humaniškai numarinti žuvį.

2. Gauti reikiamus kūno masės ir matmenų duomenis.

3. Įvertinti antrinius lytinius požymius.

4. Išskrosti audinius VTG analizei atlikti.

5. Fiksuoti gonadas.

Procedūros:

1. Žuvis reikėtų numarinti prieš pat skrodimą. Todėl, jei nėra daug skrodėjų, vienu metu nereikėtų numarinti daug žuvų.

2. Graibšteliu žuvis paimama iš bandymo kameros ir transportavimo inde pernešama į skrodimo vietą.

3. Žuvis dedama į numarinimo tirpalą. Žuvis išimama iš tirpalo, kai ji nustoja kvėpuoti ir nereaguoja į išorinius dirgiklius.

4. Šlapia žuvis pasveriama.

5. VTG analizės audinius galima ruošti, žuvį padėjus ant skrodimo mikroskopo stalo kamščiamedžio plokštės.

   a. Zebrinės danijos galva nupjaunama iškart už krūtininio peleko, o uodega – iškart už nugarinio peleko.

   b. Japoninės medakos pilvo ertmė atidaroma per atsargiai padarytą įpjovą, kuri eina išilgai pilvo vidurio linijos nuo krūtinės juostos iki pat priekinio išeinamosios angos taško. Kepenys atsargiai išimamos mažu pincetu ir žirklutėmis.

6. VTG analizei skirti bandiniai dedami į Ependorfo mėgintuvėlius ir nedelsiant užšaldomi skystame azote.

7. Skerdena su gonadomis dedama į iš anksto paženklintą plastikinę audinių kasetę, kuri perkeliama į Davidsono ar Bouin fiksatorių. Fiksatoriaus tūris turėtų būti ne mažiau kaip 10 kartų didesnis nei apytikriai apskaičiuotas audinių tūris. Indas su fiksatoriumi švelniai purtomas penkias sekundes, kad iš kasetės būtų pašalinti oro burbuliukai.

8. a. Visi audiniai paliekami Davidsono fiksatoriuje per naktį ir kitą dieną pernešami į atskirus indus su 10 % formalino neutraliame buferiniame tirpale. Indai su kasetėmis švelniai purtomi 5 sekundes, kad būtų užtikrintas reikiamas formalino įsiskverbimas į kasetes.

▼M6

b. Audiniai paliekami Bouin fiksatoriuje 24 h, po to perkeliami į 70 % etanolį.

Audinio apdorojimas

Tikslai:

1. Dehidratuoti audinį, kad į jį galėtų tinkamai įsiskverbti parafinas.

2. Impregnuoti audinį parafinu, kad būtų užtikrintas audinio vientisumas ir gautas tvirtas paviršius mikrotomijai atlikti.

Procedūros:

3. Paženklintos audinių kasetės išimamos iš formalino ar etanolio talpyklų ir pernešamos į apdorojimo krepšį (-ius). Apdorojimo krepšys dedamas į audinių apdorojimo įtaisą.

4. Pasirenkamas apdorojimo režimas.

5. Audinių apdorojimo įtaisui baigus apdorojimo ciklą, krepšį (-ius) galima pernešti į įliejimo įrenginį.

Įliejimas

Tikslas:

Tinkamai orientuoti mėginį sustingusiame parafine, kad būtų galima atlikti mikrotomiją.

Procedūros:

1. Kasečių krepšys (-iai) išimamas (-i) iš apdorojimo įtaiso ir panardinamas (-i) į parafinu pripildytą įliejimo įrenginio terminio skyriaus priekinę kamerą arba kasetės dedamos į atskirą parafino šildymo įtaisą.

2. Pirma įliejimui skirta kasetė išimama iš terminio skyriaus priekinės kameros arba iš parafino šildymo įtaiso. Kasetės dangtis nuimamas ir išmetamas, o kasetės etiketė tikrinama pagal užrašus apie kiekvieną gyvūną, kad prieš įliejant neliktų galimų nesutapimų.

3. Pasirenkama reikiamų matmenų įliejimo forma.

4. Forma statoma po dozavimo įrenginio snapeliu ir pripildoma išlydyto parafino.

5. Bandinys išimamas iš kasetės ir dedamas į išlydyto parafino pripildytą formą. Tai kartojama su 4–8 kiekvienos parafino liejimo formos mėginiais. Atskiros žuvies padėtis pažymima žuvį nr. 1 dedant 180 laipsnių kampu 2–4/8 žuvų atžvilgiu.

6. Įpilama papildomai parafino mėginiui uždengti.

7. Forma su kasetės pagrindu dedama ant šaldymo įrenginio plokštės.

8. Parafinui sukietėjus, blokas (t. y sukietėjęs parafinas su audiniais ir kasetės pagrindu) išimamas iš formos.

Mikrotomija

Tikslas:

Išpjauti ir uždėti dažymui skirtus histologinius pjūvius.

Procedūros:

1. Pradinis mikrotomijos tarpsnis, vadinamas „apdaila“, atliekamas taip:

   a. Parafino blokas dedamas į mikrotomo griebtuvą.

   b. Griebtuvas stumiamas į priekį, sukant mikrotomo ratą, ir storos dalys pjaustomos nuo bloko parafino paviršiaus tol, kol peilis pasiekia įlietus audinius.

▼M6

c. Mikrotomo pjūvio storis nustatomas nuo 3 iki 5 mikronų. Griebtuvas stumiamas į priekį ir iš bloko pjaunama daug pjūvių, kad būtų pašalinti visi artefaktai, susidarę audinio pjūvio paviršiuje grubaus pjaustymo metu.

d. Bloką galima išimti iš griebtuvo ir padėti priekiniu paviršiumi žemyn ant ledo, kad audinys įmirktų.

2. Kitas mikrotomijos tarpsnis – galutinis pjovimas ir audinių pjūvių padėjimas ant objektinių stiklelių. Šios procedūros atliekamos taip:

a. Jei blokas buvo padėtas ant ledo, jis paimamas nuo ledo ir įstatomas atgal į mikrotomo griebtuvą.

b. Mikrotomo pjūvio storis nustatomas nuo 3 iki 5 mikronų ir griebtuvas stumiamas į priekį, sukant mikrotomo ratą. Pjūviai pjaunami iš bloko tol, kol gaunama „juosta“, turinti bent vieną priimtiną gonadų turintį pjūvį. (Prireikus pjaunamas blokas gali būti išimtas iš griebtuvo, padėtas ant ledo, kad audinys įmirktų, ir vėl įstatytas į griebtuvą).

c. Pjūviai padedami ant vandens paviršiaus vandens vonioje. Stengiamasi gauti nors vieną pjūvį, ant kurio nebūtų raukšlių ir po juo pagautų oro burbuliukų.

d. Po geriausiu pjūviu panardinamas mikroskopo objektinis stiklelis ir ant jo pjūvis iškeliamas iš vandens. Šis procesas vadinamas pjūvio uždėjimu ant objektinio stiklelio.

e. Žuvų grupei paruošiami trys pjūviai. Antrasis ir trečiasis pjūviai paimami 50 mikronų tarpais nuo pirmojo pjūvio. Jei žuvys su savo gonadomis nėra įlietos tame pačiame pjovimo lygyje, turi būti daroma daugiau pjūvių, siekiant užtikrinti, kad kiekvienai žuviai būtų gauti ne mažiau kaip šeši pjūviai su gonadomis.

f. Objektinių stiklelių žymekliu ant stiklelio užrašomas pjūvio bloko numeris.

g. Objektinis stiklelis dedamas į dažymo laikiklį.

h. Blokas išimamas iš griebtuvo ir padedamas saugoti priekiniu paviršiumi žemyn.

Dažymas, dengiamojo stiklelio uždėjimas ir objektinio stiklelio ženklinimas

Tikslai:

— Nudažyti histopatologiniam tyrimui skirtus pjūvius.

— Visam laikui užsandarinti uždėtus ir nudažytus pjūvius.

— Visam laikui pažymėti nudažytus pjūvius taip, kad būtų užtikrintas visiškas jų atsekamumas.

Procedūros:

1. Dažymas

a. Prieš dažant objektiniai stikleliai pernakt džiovinami.

b. Pjūviai dažomi hematoksilinu ir eozinu.

2. Dengiamojo stiklelio uždėjimas

a. Dengiamąjį stiklelį galima uždėti rankiniu būdu arba automatiškai.

b. Stiklelis įmerkiamas į ksileną ar TissueClear ir ksileno ar TissueClear perteklius švelniai nukratomas nuo stiklelio.

▼**M6**

c. Arti objektinio stiklelio nematinio galo ar ant dengiamojo stiklelio užlašinama maždaug 0,1 ml uždėjimo terpės.

d. Dengiamasis stiklelis pakreipiamas mažu slydimo kampu ir uždedamas ant objektinio stiklelio.

3. Ženklinimas

e. Kiekvieno objektinio stiklelio etiketėje turėtų būti ši informacija.

i. Laboratorijos pavadinimas

ii. Rūšis

iii. Bandinio nr. / Objektinio stiklelio nr.

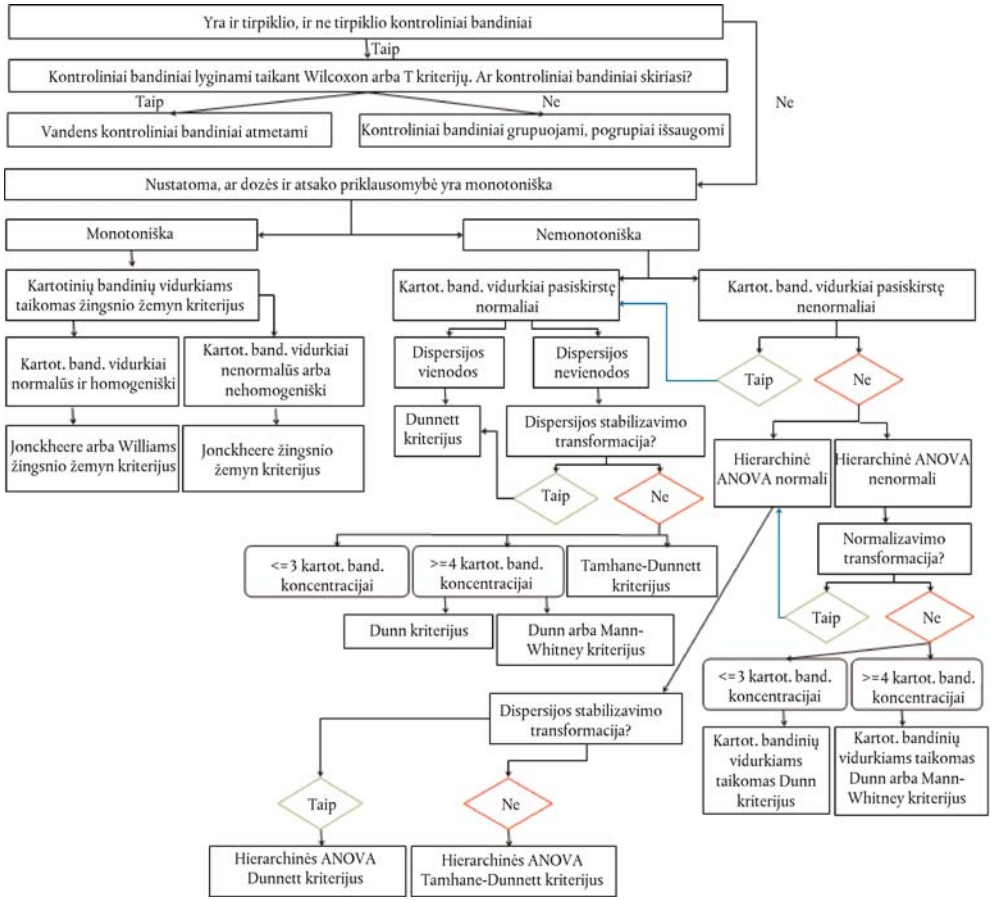
iv. Cheminė medžiaga / bandomoji grupė

v. Data

▼M6

8 priedėlis

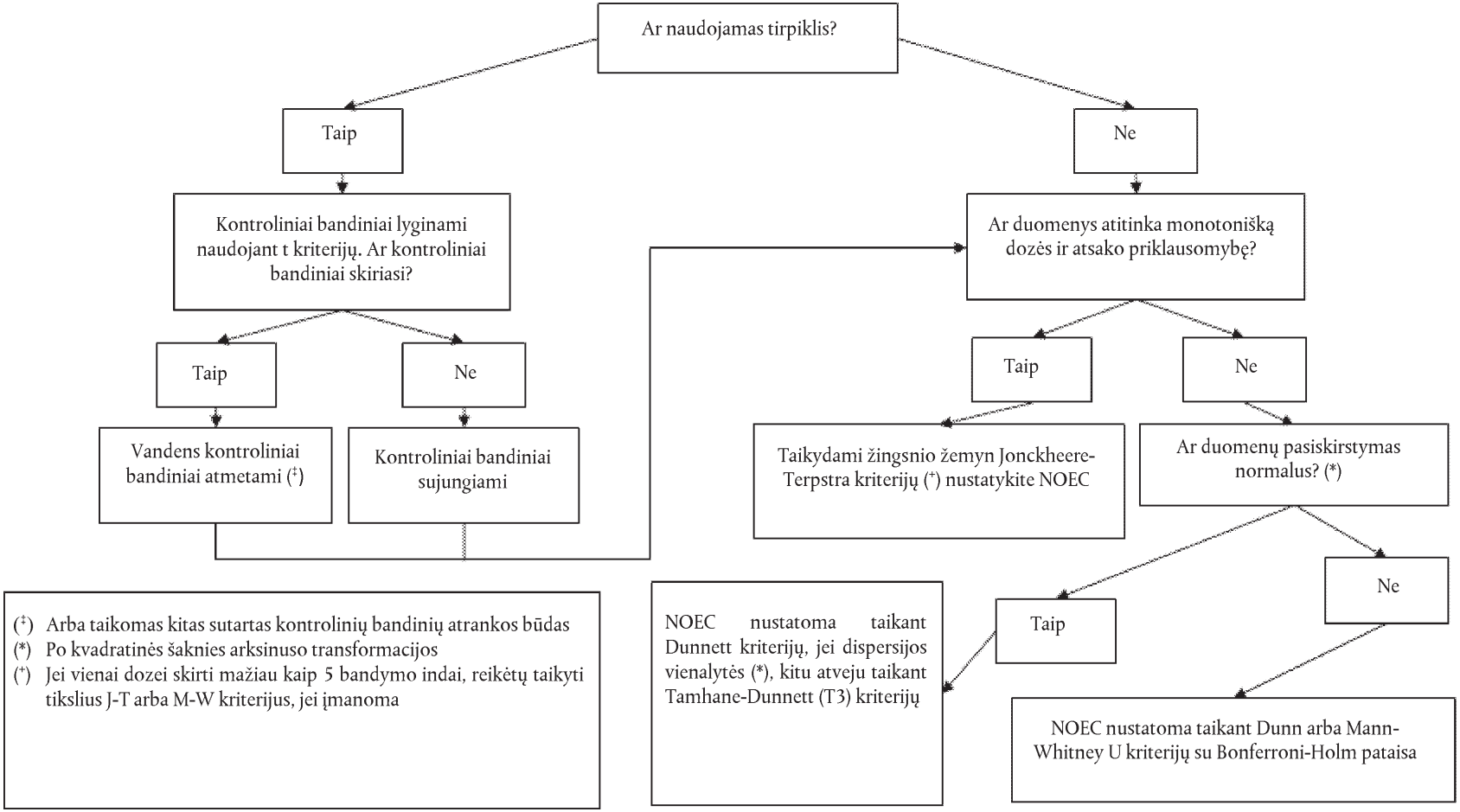
Vitelogenino analizės statistinio tyrimo schema



02008R0440 — LT — 18.05.2017 — 007.001 — 1935

▼M6

Lyčių santykio analizės statistinio tyrimo schema



▼M6

9 priedėlis

Genetinės lyties nustatymui PCR metodu skirtų audinių ėminių ėmimo rekomendacijos

Audinių ėminių ėmimas, paruošimas ir laikymas prieš nustatant medakų genetinę lytį PCR metodu (parengė „Bayer CropScience AG“ vandens organizmų laboratorija)

1. Kiekvienos atskiros žuvies analinis ir nugarinis pelekai nupjaunami žirklutėmis ir dedami į mėgintuvėlį su 100 µl 1 ekstrahavimo buferinio skysčio (informacija apie buferinio skysčio ruošimą pateikta toliau). Žirklutės nuvalomos po kiekvienos atskiros žuvies jas įmerkiant į stiklinę su distiliuotu H_2O ir nusausinamos popierine servetėle.

2. Paskui pelekų audiniai homogenizuojami mikromėgintuvėlių teflonine piestele ląstelių lizei atlikti. Kiekvienam mėgintuvėliui naudojama kita piestelė, kad nepatektų teršalų. Piestelės laikomos per naktį 0,5 mol/l NaOH, plaunamos 5 min distilliuotu H_2O ir iki kito karto laikomos etanolyje arba steriliai po apdorojimo autoklave.

3. Pelekų audinį taip pat galima laikyti nenaudojant 1 ekstrahavimo buferinio skysčio, bet audinį dedant ant sausojo ledo ir tada į -80 °C šaldytuvą, kad būtų išvengta DNR irimo. Vis dėlto ekstrahavimas veikia geriau, jei DNR būtų ekstrahuota tuo pačiu metu (apie apdorojimą žr. pirmiau; ėminius po laikymo – 80 °C reikėtų atšildyti ant sausojo ledo prieš įpilant buferio į mėgintuvėlius).

4. Po homogenizavimo visi mėgintuvėliai dedami į vandens vonią ir virinami 15 min 100 °C temperatūroje.

5. Paskui į kiekvieną mėgintuvėlį pipete įlašinama 100 µl 2 ekstrahavimo buferinio skysčio (informacija apie buferinio skysčio ruošimą pateikiama toliau). Ėminiai 15 min laikomi kambario temperatūroje, tuo pačiu metu juos švelniai purtant ranka.

6. Toliau visi mėgintuvėliai dar kartą dedami į vandens vonią ir virinami 15 min 100 °C temperatūroje.

7. Iki paskesnės analizės mėgintuvėliai laikomi užšaldyti – 20 °C.

Buferinio skysčio ruošimas

1 PCR buferinis skystis:

500 mg *N*-lauroilsarkozino (pvz., *Merck KGaA, Darmstadt, GE*)

2 ml 5 mol/l NaCl

įpilama 100 ml distiliuoto H_2O

→ apdorojama autoklave

2 PCR buferinis skystis:

20 g Chelex dervos (pvz., *Biorad, Munich, GE*)

Brinkinama 100 ml distiliuoto H_2O

→ apdorojama autoklave

Medakų genetinės lyties nustatymas (PCR metodu) (parengė Bayer CropScience AG vandens organizmų laboratorija ir Universität Würzburg Biozentrum)

Paruošti ir užšaldyti mėgintuvėliai (aprašyti pirmiau pateiktame skyriuje) atšildomi ant ledo. Tada jie centrifuguojami Ependorfo centrifuga (30 s, maksimaliu greičiu, kambario temperatūroje). Taikant PCR, naudojamas nuo nuosėdų atskirtas skaidrus skystis. Būtina užtikrinti, kad Chelex (susikaupusio nuosėdose) pėdsakų nepatektų į PCR, nes tai sutrukdytų Taq polimerazės aktyvumą. Skystis virš nuosėdų gali būti naudojamas iškart arba užšaldomas (-20 °C) ir prieš vėliau atliekamą analizę gali būti atšildomas kelis ciklus be neigiamo poveikio DNR.

▼**M6**

1. *„Reakcijos mišinio“ ruošimas (25 µl ėminiui):*

	Tūris	Galutinė koncentracija
Matricos DNR	0,5 µl-2 µl	
10 × PCR buferinio skysčio su $MgCl^2$	2,5 µl	1 ×
Nukleotidai (kiekvieno dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 mmol)	200 µmol
Tiesioginis pradmuo (10 µmol) (žr. toliau 3–5)	0,5 µl	200 nmol
Atvirkštinis pradmuo (10 µmol) (žr. toliau 3–5)	0,5 µl	200 nmol
DMSO	1,25 µl	5 %
Vanduo (PCR markės)	iki 25 µl	
Taq E polimerazė	0,3 µl	1,5 U
10 × PCR buferinio skysčio su $MgCl_2$: 670 mmol Tris/HCl (pH 8,8, 25 °C), 160 mmol $(NH_4)_2SO_4$, 25 mmol $MgCl_2$, 0,1 % Tween 20		

Kiekvienai PCR (žr. toliau 3–5) būtinas specialus pradmuo, kaip naujas „reakcijos mišinio“ ir matricos DNR kiekvienam ėminiui atitinkamo kiekio derinys (žr. pirmiau). Atitinkami tūriai įlašinami pipete į naujus mėgintuvėlius. Po to visi mėgintuvėliai uždaromi, maišomi (maždaug 10 s) ir centrifuguojami (10 s kambario temperatūroje). Dabar galima paleisti atitinkamas PCR programas. Papildomai kiekvienoje PCR programoje naudojamas teigiamas kontrolinis bandinys (pavyzdinis žinomo aktyvumo ir aiškių rezultatų DNR bandinys) ir neigiamas kontrolinis bandinys (1 µl distiliuoto H_2O).

2. *Agarozės gelio (1 %) paruošimas, veikiant PCR programoms:*

— 3 g agarozės ištirpinama 300 ml 1 × TAE buferio (1 % agarozės gelis);

— šis tirpalas virinamas mikrobangų krosnelėje (maždaug 2–3 min);

— karštas tirpalas supilamas į specialią ant ledo padėtą liejimo formą;

— maždaug po 20 min agarozės gelis paruoštas naudoti;

— Agarozės gelis laikomas 1 × TAE buferyje iki PCR programų pabaigos.

3. *Aktinų PCR programa:*

Šios PCR reakcijos tikslas – įrodyti, kad bandinio DNA nepažeista.

— Specialus pradmuo:

„Mact1(upper/forward)“ → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

„Mact2(lower/reverse)“ → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Programa:

5 min, 95 °C

Ciklas (35 kartus):

Denatūravimas → 45 s, 95 °C

Renatūravimas → 45 s, 56 °C

Ilginimas → 1 min, 68 °C

15 min, 68 °C

▼M6

4. *X ir Y genų PCR programa:*

Šioje PSR programoje naudojami bandiniai su nepažeista DNR, kad būtų aptikti X ir Y genai. Patinų DNR turėtų turėti dvigubą juostą, o patelių DNR – viengubą juostą (po dažymo ir gelelektroforezės). Taikant šią programą, reikėtų įtraukti vieną teigiamą patinų kontrolinį bandinį (XY bandinys) ir vieną patelių (XX bandinį).

— Specialus pradmuo:

„PG 17.5“ (upper/forward) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

„PG 17.6“ (lower/reverse) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Programa:

5 min, 95 °C

Ciklas (40 kartų):

Denatūravimas	→ 45 s, 95 °C
Renatūravimas	→ 45 s, 55 °C
Ilginimas	→ 1 min 30 s, 68 °C

15 min, 68 °C

5. *Y geno PCR programa, kaip X ir Y genų „kontrolinė“ PCR programa:*

Šia programa tikrinami „X ir Y genų PCR programos“ rezultatai. „Patinų“ turėtų rodyti vieną juostą, o „patelių bandiniai“ – jokios juostos (po dažymo ir gelelektroforezės).

— Specialus pradmuo:

„DMTYa (upper/forward)“ → GGC CGG GTC CCC GGG TG

„DMTYd (lower/reverse)“ → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Programa:

5 min, 95 °C

Ciklas (40 kartų):

Denatūravimas	→ 45 s, 95 °C
Renatūravimas	→ 45 s, 56 °C
Ilginimas	→ 1 min, 68 °C

15 min, 68 °C

6. *PCR bandinių dažymas:*

Dažiklio tirpalas:

50 % glicerolio

100 mmol EDTA

1 % SDS

0,25 % bromfenolio mėlynojo

0,25 % ksilencianolio

Į kiekvieną atskirą mėgintuvėlį pipete įlašinama 1 µl dažiklio tirpalo

7. *Gelelektroforezės pradžia:*

— paruoštas 1 % agarozės gelis supilamas į gelelektroforezės kamerą, pripildytą 1 × TAE buferio;

— 10–15 µl kiekvieno dažyto PCR bandinio pipete įlašinama į agarozės gelio plyšį;

— į atskirą plyšį pipete įlašinama 5–15 µl 1kb žymens (Invitrogen);

— pradedama elektroforezė, esant 200 V;

— baigiama po 30–45 min.

▼**M6**

8. *Juostų nustatymas:*

— agarozės gelis plaunamas distiliuotu H_2O;

— agarozės gelis 15–30 min pernešamas į etidžio bromidą;

— daroma agarozės gelio nuotrauka UV šviesoje;

— galiausiai bandiniai analizuojami teigiamo kontrolinio bandinio juostos (juostų) ir žymens atžvilgiu.

▼M6

10 priedėlis

Genetinės lyties nustatymui PCR metodu skirtų trispyglės dyglės audinių ėminių ėmimo rekomendacijos

Audinių ėminių ėmimas ir DNR ekstrahavimas

DNR galima ekstrahuoti naudojant daugelį prekyboje esančių reagentų ir rankinio bei automatinio valdymo ekstrahavimo sistemas. Toliau aprašytas Cefas Weymouth laboratorijoje taikomas protokolas, o prireikus įtraukiami kiti alternatyvūs metodai.

1. Žirklutėmis iš dorsolateralinės srities (nupjovus galvą ir uodegą VTG analizei), išpjaunamas mažas (10–20 mg) kiekvienos atskiros žuvies gabaliukas. Audinys įdedamas į mėgintuvėlį ir iš karto dedamas į skystąjį azotą (kad būtų laikomas – 80 °C) arba užpilamas 70 % etanoliu (transportuoti ir vėliau laikyti 4 °C temperatūroje). Žirklutės nuvalomos po kiekvienos atskiros žuvies 70 % etanoliu, paskui distiliuotu H^2O ir nusausinamos popierine servetėle.

2. Etanolis (jei yra) nusiurbiamas, o audinys skaidomas per naktį proteinaze K 400 µl ATL buferinio skysčio (Qiagen). Alikvotinė hidrolizato (200 µl) dalis pernešama į 96 duobučių S bloką (Qiagen) ir DNR ekstrahuojama taikant 96 duobučių formatą ir naudojant *Qiagen Universal BioRobot* sistemą bei QIamp Investigator BioRobot rinkinį. DNR išplaunama 50 µl DNazės ir RNazės neturinčio vandens. Jei DNR ekstrahuojama iš kietųjų audinių (pvz., dyglio ar krūtininio peleko), ėminį gali tekti homogenizuoti lizės buferiniame skystyje, naudojant FastPrep® audinių skaidymo įrenginį arba lygiavertę audinių skaidymo sistemą.

   Arba

   (a) audinys skaidomas per naktį proteinaze K 400 µl G2 lizės buferinio skysčio (Qiagen) ir DNR ekstrahuojama iš 200 µl hidrolizato, naudojant *EZ-1 DNA easy tissue* rinkinį ir *EZ-1 biorobot* įrenginį arba *DNA easy tissue mini kit* rinkinį. DNR išplaunamas į 50 µl tūrį.

   (b) Audiniai apdorojami naudojant DNAzol reagentą. Trumpai tariant, audinio ėminiai 10 min skaidomi 1ml DNAzol reagento 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlyje ir hidrolizatas 5 min centrifuguojamas 13 000 aps/min greičiu, kad būtų pašalintos visos kietosios dalelės. Paskui tirpalas supilamas į kitą 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį su 500 µl 100 % molekulinės biologijos markės etanolio ir 10 min centrifuguojamas 13 000 aps/min, kad būtų nusodinta DNR. Etanolis pašalinamas ir pakeičiamas 400 µl 70 % molekulinės biologijos grynumo etanolio, tirpalas 5 min centrifuguojamas 13 000 aps/min greičiu ir DNR nuosėdos ištirpinamos 50 µl 50 µl DNazės ir RNazės neturinčio vandens. Be to, kai naudojami kietieji audiniai (krūtininis pelekas), prieš DNR ekstrahavimą ėminį gali tekti homogenizuoti lizės buferiniame skystyje, naudojant FastPrep® audinių skaidymo įrenginį arba lygiavertę audinių skaidymo sistemą.

3. DNR laikoma – 20 °C iki jos prireiks.

Svarbi pastaba: atliekant procedūras, būtina mūvėti pirštines.

Polimerazės grandininės reakcijos (PCR) analizė

Amplifikacija buvo atliekama naudojant 2,5 µl DNR ekstrakto 50 µl reakcijos tūryje ir Idh (izocitrato dehidrogenazės) lokuso pradmenis (kaip aprašyta Peichel ir kt., 2004, Current Biology 1:1416-1424):

Tiesioginis pradmuo	5′ GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3′
Atvirkštinis pradmuo	5′ TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3′

▼M6

Yra daug tinkamų PCR reagentų tiekėjų. Toliau aprašytas metodas šiuo metu taikomas Cefas Weymouth laboratorijoje.

1. *Reakcijos mišinio ruošimas (50 µl bandiniui):*

Pradinis mišinys ruošiamas taip. Jį galima ruošti iš anksto ir laikyti užšaldytą – 20 °C iki prireiks. Pradinio mišinio ruošiama pakankamai, kad užtektų neigiamiems kontroliniams bandiniams (tik molekulinės biologijos grynumo vanduo).

	Tūris (pradinė koncentracija)/ bandiniui	Galutinė koncentracija
5 × GoTaq® reakcijos buferiai	10 µl	1 ×
$MgCl_2$	5 µl (25 mmol)	2,5 mmol
Nukleotidai (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (kiekvieno 25 mmol)	250 µmol kiekvieno
Tiesioginis pradmuo	0,5µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µmol
Atvirkštinis pradmuo	0,5µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µmol
Molekulinės biologijos grynumo vanduo	30,75 µl	
GoTaq polimerazė	0,25 µl	1,25 U

— Įlašinama 47,5 µl į paženklintą 0,5ml plonasienį PCR mėgintuvėlį.

— Į atitinkamai paženklintą mėgintuvėlį įpilama 2,5 µl grynintos DNR. Kartojama su visais bandiniais ir neigiamu kontroliniu bandiniu.

— Ant viršaus užlašinami 2 lašai mineralinės alyvos. Arba naudojamas termoblokas su šildomu dangčiu.

— Dangčiai uždengiami.

— Bandiniai buvo denatūruojami 5 min Peltier PTC-225 termobloke 94 ± 2 °C, paskui atliekami 39 ciklai 94 ± 2 °C, 1 min, 55 ± 2 °C, 1 min, 72 ± 2 °C 1 min ir galutinis ilginimas 72 ± 2 °C, 10 min.

2. *Agarozės gelio (2 %) paruošimas:*

Paprastai PCR produktai atskiriami naudojant 20 % agarozės gelį, turintį etidžio bromido.

Taip pat galima naudoti kapiliarinės elektroforezės sistemas.

— Pasveriama 2 g agarozės į 100 ml 1 ×x TAE buferinį skystį;

— Kaitinama mikrobangų krosnelėje (maždaug 2–3 min), kad agarozė ištirptų.

— Įlašinami 2 lašai etidžio bromido, kad galutinė koncentracija būtų 0,5 µg/ml

— Karštas tirpalas supilamas į gelio stingimo įrangą.

— Gelis paliekamas sukietėti

3. *Gelektroforezė:*

— Agarozės gelis supilamas į elektroforezės įranga ir įpilama 1 × TAE buferio

— 20 µl kiekvieno bandinio įlašinama į atskirą duobutę, o į atsarginę duobutę įpilama molekulinės masės žymens (*100bp DNA ladder, Promega*).

— Elektroforezė atliekama 30–45 min, esant 120 V.

▼**M6**

4. *Amplifikavimo produktų vaizdo gavimas*

Jei, kaip aprašyta pirmiau, į agarozės gelį buvo įpilta etidžio bromido, DNR produktai stebimi po UV šviesos šaltiniu. Arba agarozės gelis dažomas ant jo užpilant praskiesto etidžio bromido tirpalo (0,5 μg/ml vandens), kad po 30 min būtų galima stebėti vaizdą.

▼M6

11 priedėlis

Trispyglės dyglės dirbtinio apvaisinimo procedūros rekomendacijos

Šio skyriaus tikslas – aprašyti žuvų lytinio vystymosi bandymui skirtų trispyglės dyglės apvaisintų ikrų gavimo procedūras.

Procedūros

Patinų spermos gavimas

1. Numarinamas reikiamos populiacijos tinkamos spalvos patinas.

2. Sėklidės išpjaunamos iš abiejų žuvies pusių. *Paprastai sėklidės yra ryškios spalvos pailgos formos struktūros, nesunkiai pastebimos kūno šoninėje vidurio linijoje*. Taikomas vienas i šių metodų:

3. Žirklutėmis pradedama pjauti nuo kloakos ir padaroma viena 1–1,5 cm įpjova maždaug 45 laipsniu kampu.

4. Skalpeliu daroma maža įpjova žuvies šone šiek tiek už pilvo ertmės ir vos prieš šonines plokšteles.

5. Sėklidės išimamos mažu pincetu ir dedamos į Petri lėkštelę.

6. Ant kiekvienos sėklidės užpilama 100 µl naujai pagaminto **Hanko galutinio tirpalo** (*).

7. Sėklidės skustuvu arba skalpeliu supjaustomos į mažus gabaliukus. Taip išsiskiria sperma ir Hanko tirpalas įgauna balkšvą spalvą.

8. Skystis su sperma supilamas į mėgintuvėlį taip, kad į pipetę nepakliūtų jokių sėklidės gabaliukų.

9. Į mėgintuvėlį įpilama 800 µl Hanko galutinio tirpalo ir gerai sumaišoma.

10. Prireikus patinus galima konservuoti, fiksuojant 100 % etanolyje arba kitame reikiamame fiksatoriuje. Tai ypač svarbu, jei tyrimu nustatoma palikuonių tėvų kilmė.

Svarbi pastaba: *nors daugumą reikiamų pradinių tirpalų galima ruošti iš anksto**, 5 pradinį tirpalą** ir vėliau **galutinį tirpalą** reikėtų gaminti **iš naujo, tą dieną, kai** jis bus naudojamas.*

1 pradinis tirpalas	
NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Distiliuotas vanduo (DV)	100 ml
2 pradinis tirpalas	
Na_2HPO_4 (bevandenis)	0,358 g
KH_2PO_4	0,60 g
DV	100 ml
3 pradinis tirpalas	
$CaCl_2$	0,72 g
DV	50 ml

(*) Hanko buferinis druskų tirpalas (HBSS):
HBSS būtinas spermai konservuoti ruošiantis apvaisinimui.

▼M6

4 pradinis tirpalas

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,23 g
DV	50 ml

5 pradinis tirpalas (naujai paruoštas)

$NaHCO_3$	0,35 g
DV	10 ml

Pastaba: turint kai kurių iš pirmiau nurodytų druskų, bet su skirtingu vandens kiekiu (t. y. $2H_2O$ vietoj bevandenės druskos), jas vis dar galima naudoti, tačiau iš pradžių reikia pakoreguoti masę pagal molekulinę masę).

Hanko galutinis tirpalas gaunamas sumaišius tirpalus tokia tvarka:

1 pradinis tirpalas	1,0 ml;
2 pradinis tirpalas	0,1 ml;
3 pradinis tirpalas	0,1 ml;
DV	8,6 ml;
4 pradinis tirpalas	0,1 ml;
5 pradinis tirpalas	0,1 ml.

Prieš naudojant gerai sumaišoma.

Apvaisinimas

1. Nustatomos reikiamos populiacijos didelės ikringos patelės; jos pasiruošusios ikrų išspaudimui tik tada, kai matosi iš kloakos išlindę ikrai. Pasiruošusios patelės turi būdingą „pakeltos galvos“ laikyseną.

2. Pirštu arba nykščiu švelniai braukiama išilgai žuvies šono uodegos link, siekiant paskatinti ikrų masės išstūmimą į naują Petri lėkštelę. Pakartojama su kita puse ir žuvis grąžinama į savo indą.

3. Ikrus galima paskleisti (taip, kas būtų gautas vienas sluoksnis) mažu teptuku. Svarbu sperma apvaisinti kuo daugiau ikrų, ir tai galima padaryti kuo labiau padidinant ikrų paviršiaus plotą. Svarbi pastaba: ikrai laikomi drėgni, aplink juos padedant drėgną audinį (svarbu, kad ikrai tiesiogiai nesiliestų su vandeniu, nes ikrų apvalkalas gali per anksti sukietėti ir neleisti apvaisinti). Vienos patelės išleidžiamų ikrų skaičius labai skiriasi, bet vidutiniškai iš vienos ikringos patelės nesunkiai gaunama maždaug 150 ikrų.

4. 25 µl spermos Hanko mišinyje tolygiai paskleidžiama teptuku visu ikrų paviršiumi. Prasidėjus apvaisinimui, ikrai greitai (per minutę) sukietėja ir pakeičia spalvą. Jei įvertintas ikrų skaičius didesnis kaip 150, procedūra kartojama. Taip pat, jei ikrai nesukietėja per minutę, įdedama daugiau spermos. Svarbi pastaba: apvaisinimo laipsnis, įdėjus didesnį spermos kiekį, nebūtinai turi pagerėti.

5. Ikrus ir spermos tirpalą reikėtų palikti „sąveikai“ bent 15 min, o apvaisintus ikrus reikėtų įdėti į akvariumą, kuriame jie bus veikiami bandomąja medžiaga, praėjus 1,5 h po apvaisinimo.

6. Procedūra kartojama su kita patele tol, kol surenkamas reikiamas ikrų skaičius.

7. Keli ikrai iš paskutinės partijos paliekami atsargai ir fiksuojami 10 % acto rūgštyje.

▼M6

Ikrų skaičiavimas ir paskirstymas į bandymo akvariumus

1. Ikrus reikėtų vienodai paskirstyti tarp visų bandomosios medžiagos koncentracijos verčių, kad būtų išvengta genetinio poslinkio. Kiekviena apvaisintų ikrų partija turėtų būti padalyta į vienodo dydžio grupes (tiek, kiek yra bandomosios medžiagos koncentracijos verčių) buku įrankiu (t. y. plačiu entomologiniu pincetu arba naudojant bakteriologinę kilpą). Jei numatyta, kad vienai bandomosios medžiagos koncentracijai imami 4 kartotiniai bandiniai ir kiekviename bandinyje yra 20 ikrų, tuomet viename bandomajame akvariume reikia paskirstyti po 80 ikrų. Svarbi pastaba: patariama įdėti papildomai 20 % (t. y. 96 ikrus vienai bandomosios medžiagos koncentracijai), jei nesate tikri, kad gaunamas 100 % apvaisinimas.

2. Trispyglės dyglės ikrai tėvo saugomo lizdo išorėje gali greitai užsikrėsti grybeline infekcija. Dėl šios priežasties labai svarbu per pirmąsias 5 bandymo dienas visus ikrus apdoroti metileno mėliu. Ruošiamas 1 mg/ml pradinis metileno mėlio tirpalas ir įpilamas į ekspozicijos akvariumus, kad maksimali galutinė koncentracija būtų 2,125 mg/l. Svarbi pastaba: trispyglės dyglės po išsiritimo neturėtų būti veikiamos metileno mėliu, todėl nuo 6 dienos sistemoje jo neturėtų būti.

3. Ikrai apžiūrimi kasdien ir užrašoma, kiek yra žuvusių arba neapvaisintų ikrų. Svarbi pastaba: iki išsiritimo ikrai niekuomet, netgi labai trumpą laiką, neturėtų būti ne vandenyje.

▼M6

C.42. BIOLOGINIS SKAIDUMAS JŪROS VANDENYJE

BENDRASIS ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 306 (1992). Kai buvo sukurti pirmieji bandymo metodai, nebuvo žinoma, kokiu laipsniu lengvo biologinio skaidumo atrankos bandymų rezultatai, sėjimo kultūra naudojant gėlą vandenį ir nuotėkas arba aktyvintąjį dumblą, galėtų būti taikomi jūros aplinkai. Šiuo klausimu buvo paskelbta įvairių rezultatų (pvz., (1)).

2. Daug pramoninių nuotėkų, turinčių įvairių cheminių medžiagų, patenka į jūrą, kai jos išleidžiamos tiesiogiai arba per upių žiotis ir upes, kuriose buvimo trukmė yra maža palyginti su laikotarpiu, būtinu daugelio esančių cheminių medžiagų visiškam biologiniam suskaidymui. Didėjant suvokimui, kad jūros aplinką būtina saugoti nuo vis didesnės cheminių medžiagų apkrovos ir kad būtina įvertinti galimą cheminių medžiagų koncentraciją jūroje, buvo sukurti biologinio skaidumo jūros vandenyje bandymo metodai.

3. Šiame dokumente aprašytiems bandymo metodams naudojamas natūralus jūros vanduo kaip vandeninė fazė ir kaip mikroorganizmų šaltinis. Siekiant atitikti lengvo biologinio skaidumo gėlame vandenyje metodus, buvo tiriamas ultrafiltruoto bei centrifuguoto jūros vandens ir jūros dugno nuosėdų kaip sėjimo kultūros naudojimas. Šie tyrimai buvo nesėkmingi. Todėl bandymo terpė yra natūralus jūros vanduo, kuris iš anksto apdorojamas, kad būtų pašalintos stambios dalelės.

4. Jei norima įvertinti visišką biologinį skaidumą taikant kratomos kolbos metodą, dėl ištirpusios organinės anglies (DOC) analizės metodo mažo jautrio turi būti naudojama palyginti didelė bandomosios medžiagos koncentracija. Dėl to į jūros vandenį būtina įdėti mineralinių mitybinių medžiagų (N ir P), nes kitaip dėl jų mažos koncentracijos ribojamas DOC šalinimas. Be to, taikant uždarosios kolbos metodą, dėl įdėtos bandomosios medžiagos koncentracijos būtina įdėti mitybinių medžiagų.

5. Todėl metodai nėra lengvo biologinio skaidumo bandymai, nes be jūros vandenyje jau esančių mikro-organizmų papildomai nededama jokios sėjimo kultūros. Šie bandymai nemodeliuoja jūros aplinkos, nes dedama mitybinių medžiagų ir bandomosios medžiagos koncentracija yra labai didelė palyginti su koncentracija jūroje. Dėl šių priežasčių siūlomi metodai įtraukti į naują poskyrį „Biologinis skaidumas jūros vandenyje“.

TAIKYMAS

6. Bandymų, kurie būtų taikomi, nes dėl tiriamos cheminės medžiagos naudojimo pobūdžio ji patenka į jūrą, rezultatai pateikia pradinį biologinio skaidumo jūros vandenyje vaizdą. Jei rezultatas teigiamas (> 70 % DOC pašalinimas; > 60 % ThOD – teorinis deguonies suvartojimas), galima daryti išvadą, kad jūros aplinka turi biologinio skaidymo potencialą. Tačiau neigiamas rezultatas nereiškia, kad tokio potencialo nėra, bet rodo, kad būtina atlikti papildomą tyrimą, pvz., naudojant kuo mažesnę bandomosios medžiagos koncentraciją.

▼M6

7. Bet kuriuo atveju, jei reikia nustatyti geriau apibrėžtą biologinio skaidymo jūros vandenyje spartos arba laipsnio vertę tam tikroje konkrečioje vietoje, reikėtų taikyti sudėtingesnius ir tobulesnius, taigi ir brangesnius metodus. Pavyzdžiui, būtų galima taikyti modeliavimo bandymą, naudojant bandomosios medžiagos koncentraciją, kuri būti artimesnė tikėtinos aplinkos koncentracijai. Taip pat galėtų būti naudojamas iš tiriamos vietos paimtas nepadidintos koncentracijos ir iš anksto neapdorotas jūros vanduo ir po pradinio biologinio skaidymo būtų galima atlikti specifinę cheminę analizę. Tiriant visišką biologinį skaidumą, reikėtų ^{14}C žymėtųjų cheminių medžiagų, kad būtų galima išmatuoti tirpios organinės medžiagos ^{14}C išnykimo ir $^{14}CO_2$ susidarymo spartą, esant realiai aplinkos koncentracijai.

METODŲ PASIRINKIMAS

8. Taikomas metodas pasirenkamas atsižvelgiant į kelis veiksnius; toliau pateikiama lentelė, kuri turėtų padėti pasirinkti. Nors kratomos kolbos metodu negali būti bandomos cheminės medžiagos, kurių ekvivalentinis tirpumas vandenyje yra mažesnis kaip 5 mg C/l, mažai tirpios cheminės medžiagos bent jau teoriškai gali būti bandomos uždarosios kolbos metodu.

Lentelė.

Kratomos kolbos ir uždarosios kolbos metodų privalumai bei trūkumai

METODAS	PRIVALUMAI	TRŪKUMAI
KRATOMA KOLBA	— paprasta aparatūra, išskyrus C analizatorių — 60 d trukmė nėra problema — nėra trukdžių dėl nitrifikavimo — gali būti pritaikytas lakiosioms cheminėms medžiagoms	— reikia turėti C analizatorių — naudojant 5–40 mg DOC/1, galėtų vykti inhibavimas — sunku nustatyti mažos koncentracijos DOC jūros vandenyje (chloridų poveikis) — kartais jūros vandenyje yra didelis DOC
UŽDAROJI KOLBA	— paprasta aparatūra — paprastas pabaigos nustatymas — naudojama mažos koncentracijos bandomoji medžiaga (2 mg/l), todėl mažesnė inhibavimo tikimybė — lengvai pritaikomas lakiosioms cheminėms medžiagoms	— gali būti sunku užtikrinti kolbų sandarumą orui — dėl ant sienelių augančių bakterijų gali būti gautos klaidingos vertės — gali būti didelės tuščiojo ėminio O_2 suvartojimo vertės, ypač po 28 dienų; tai galima būtų išspręsti sendinant jūros vandenį — O_2 suvartojimo dėl nitrifikavimo galimi trukdžiai

KRATOMOS KOLBOS METODAS

ĮVADAS

1. Šis metodas yra modifikuoto EBPO atrankos bandymo, aprašyto šio priedo C.4B skyriuje (2), jūros vandeniui skirtas variantas. Jis buvo galutinai parengtas kaip Danijos vandens kokybės instituto Europos Komisijai (EB) atlikto tarplaboratorinio tyrimo rezultatas (3).

2. Kaip ir jūros vandeniui skirto uždarosios kolbos metodo rezultatai, šio bandymo rezultatai neturi būti laikomi lengvo biologinio skaidumo rodikliais, bet turi būti naudojami konkrečiai, kai reikia gauti informaciją apie cheminių medžiagų biologinį skaidumą jūros aplinkose.

▼M6

METODO PRINCIPAS

3. Tam tikras bandomosios medžiagos kiekis ištirpinamas bandymo terpėje, kad būtų gauta 5–40 mg ištirpusios organinės anglies (DOC)/l koncentracija. Jei organinės anglies analizės jautrio ribos yra geresnės, gali būti naudinga naudoti mažesnę bandomosios medžiagos koncentraciją, ypač medžiagoms inhibitoriams. Bandomosios medžiagos tirpalas bandymo terpėje inkubuojamas tamsoje arba išsklaidytoje šviesoje ir maišomas aerobinėmis sąlygomis pastovioje temperatūroje (reguliuojamoje ± 2 °C) tikslumu), kuri paprastai yra 15–20 °C intervale. Jei tyrimo tikslas yra aplinkos situacijų modeliavimas, bandymus galima atlikti už šio normalios temperatūros intervalo ribų. Rekomenduojama maksimali bandymo trukmė yra apie 60 dienų. Skaidymas stebimas DOC matavimais (visiškas suskaidymas) ir kai kuriais atvejais atliekama specifinė analizė (pradinis skaidymas).

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

4. Siekiant sužinoti, ar bandymas gali būti taikomas tam tikrai cheminei medžiagai, turi būti žinomos kai kurios jos savybės. Turi būti nustatytas medžiagos organinės anglies kiekis, jos lakumas turi būti toks, kad nebūtų reikšmingų nuostolių bandymo eigoje, ir jos tirpumas vandenyje turėtų būti didesnis nei 25–40 mg C/l ekvivalentas. Taip pat bandomoji cheminė medžiaga neturėtų reikšmingai adsorbuotis ant stiklinių paviršių. Reikia turėti duomenų apie bandomosios cheminės medžiagos grynumą arba apie pagrindinių komponentų santykines dalis, kad gautus rezultatus būtų galima aiškinti, ypač, kai rezultatas yra arti „atitikties“ lygio.

5. Informacija apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą bakterijoms, pvz., išmatuotą atliekant trumpalaikius kvėpavimo greičio bandymus (4), gali būti naudinga renkantis tinkamas bandymo koncentracijos vertes, taip pat gali būti svarbi, kad būtų tinkamai paaiškintos mažos biologinio skaidumo vertės. Tačiau tokios informacijos ne visada pakanka, kad būtų paaiškinti biologinio skaidumo bandymų rezultatai, taigi labiau tinka 18 pastraipoje aprašyta procedūra.

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

6. Jūros vandens ėminio mikrobiniam aktyvumui tikrinti turi būti naudojamos tinkamos etaloninės cheminės medžiagos. Natrio benzenkarboksilatas, natrio acetatas ir anilinas gali būti šiam tikslui tinkamų cheminių medžiagų pavyzdžiai. Etaloninių cheminių medžiagų skaidymo trukmė turi būti palyginti trumpa, priešingu atveju rekomenduojama bandymą kartoti su kitu jūros vandens ėminiu.

7. Atliekant EK tarplaboratorinį tyrimą, kai jūros vandens ėminiai buvo imami iš skirtingų vietų ir skirtingais metų laikais (3), natrio benzenkarboksilatui gautas eksponentinis tarpsnis (t_L) ir laikas, per kurį pasiekiamas 50 procentų skaidymas (t_{50}), atmetus eksponentinis tarpsnį, buvo atitinkamai nuo 1 iki 4 dienų ir nuo 1 iki 7 dienų. Anilino t_L – nuo 0 iki 10 dienų, o t_{50} – nuo 1 iki 10 dienų.

METODO ATKURIAMUMAS IR JAUTRIS

8. Metodo atkuriamumas buvo nustatytas atliekant tarplaboratorinį tyrimą (3). Mažiausioji bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai metodas gali būti taikomas, atliekant DOC analizę, dažniausiai priklauso nuo organinės anglies analizės aptikimo ribos (šiuo metu apie 0,5 mg C/l) ir naudojamame jūros vandenyje ištirpusios organinės anglies koncentracijos (paprastai 3–5 mg/l atvirosios jūros vandens). DOC foninė koncentracija neturėtų būti didesnė kaip maždaug 20 % suminės DOC koncentracijos, įdėjus bandomąją medžiagą. Jei tai neįmanoma, DOC foninė koncentracija kartais gali būti sumažinta prieš bandymą sendinant jūros vandenį. Jei metodas taikomas atliekant tik specifinę cheminę analizę (kai matuojamas tik pradinis skaidymas), tyrėjas, pateikdamas papildomos informacijos, turi dokumentais patvirtinti, ar galima tikėtis visiško suskaidymo. Šią papildomą

▼M6

informaciją gali sudaryti kitų lengvojo arba būdingojo biologinio skaidumo bandymų rezultatai.

METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

9. Įprastinė laboratorijos aparatūra ir:

a. Purtyklė, į kurią telpa 0,5–2 litrų kūginės kolbos, su automatiniu temperatūros reguliavimu arba naudojama patalpoje, kurios 15–20 °C pastovi temperatūra reguliuojama ± 2 °C tikslumu;

b. Siaurakaklės 0,5–2 litro kūginės kolbos;

c. Membraninio filtravimo aparatūra arba centrifuga;

d. Membraniniai filtrai, 0,2–0,45μm;

e. Anglies analizatorius;

f. Specifinės analizės įranga (neprivaloma).

Jūros vanduo

10. Jūros vandens ėminys paimamas į gerai išvalytą talpyklą ir vežamas į laboratoriją, pageidautina, per vieną ar dvi dienas nuo paėmimo. Vežant ėminį, jo temperatūra neturi pakilti gerokai aukščiau bandymo temperatūros. Ėminio ėmimo vieta tiksliai identifikuojama ir apibūdinama, atsižvelgiant į jos užterštumo ir mitybinių medžiagų būseną. Į šį apibūdinimą, ypač priekrantės vandenų, įtraukiamas heterotrofinių mikroorganizmų kolonijų skaičius ir ištirpusio nitrato, amonio ir fosfato koncentracijos nustatymas.

11. Apie patį jūros vandens ėminį pateikiama tokia informacija:

— ėmimo data;

— ėmimo gylis;

— ėminio išvaizda, drumstumas ir kt.;

— temperatūra ėmimo metu;

— druskingumas;

— DOC;

— vėlinimo tarp ėminio paėmimo ir jo bandymo trukmė.

12. Jei nustatoma, kad jūros vandens ėminio DOC kiekis yra labai didelis (8 pastraipa), prieš naudojant jūros vandenį rekomenduojama jį sendinti maždaug savaitę. Sendinama laikant aerobinėmis sąlygomis bandymo

▼M6

temperatūroje ir tamsoje arba išsklaidytoje šviesoje. Jei būtina, aerobinės sąlygos užtikrinamos nestipriai aeruojant. Sendinant mažėja lengvai skaidomų organinių medžiagų kiekis. Atliekant tarplaboratorinį tyrimą (3), nebuvo nustatyta skirtumo tarp sendintų ir naujai paimtų jūros vandens ėminių skaidumo potencialo. Prieš naudojant, atliekamas jūros vandens pradinis apdorojimas, kad būtų pašalintos stambios dalelės, pvz., filtruojama per nailono filtrą arba akytąjį popierinį filtrą (ne per membraninį arba stiklo pluošto filtrus), arba sedimentacijos ir dekantavimo būdu. Taikyta procedūra turi būti nurodyta ataskaitoje. Pradinis apdorojimas, jei naudojamas, atliekamas po sendinimo.

Mineralinių mitybinių medžiagų pradiniai tirpalai

13. Iš analiziškai grynų reagentų ruošiami šie pradiniai tirpalai:

(a) Kalio divandenilio ortofosfato, KH_2PO_4 8,50 g

Dikalio vandenilio ortofosfato, K_2HPO4 21,75 g

Dinatrio vandenilio ortofosfato dihidrato, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 33,30 g

Amonio chlorido, NH_4Cl 0,50 g

Ištirpinama ir skiedžiama iki 1 litro distiliuotu vandeniu

(b) Kalcio chlorido, $CaCl_2$ 27,50 g

Ištirpinama ir skiedžiama iki 1 litro distiliuotu vandeniu

(c) Magnio sulfato heptahidrato, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 22,50 g

Ištirpinama ir skiedžiama iki 1 litro distiliuotu vandeniu

(d) Geležies (III) chlorido heksahidrato, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,25 g

Ištirpinama ir skiedžiama iki 1 litro distiliuotu vandeniu

Nuosėdų susidarymo (d) tirpale galima išvengti įlašinant vieną lašą koncentruotos HCl arba įdedant 0,4 g etilendiamintetracto rūgšties (EDTA, dinatrio druskos) litrui. Jei pradiniame tirpale susidaro nuosėdos, jis keičiamas naujai paruoštu tirpalu.

Bandymo terpės ruošimas

14. Vienam litrui apdoroto jūros vandens įpilama po 1 ml kiekvieno iš pirmiau nurodytų pradinių tirpalų.

Sėjinys

15. Be mikroorganizmų, kurie jau yra jūros vandenyje, specialaus sėjinio nededama. Jūros vandens bandymo terpėje (taip pat pageidautina pradiniuose jūros vandens ėminiuose) nustatomas (nebūtinai) kolonijas sudarančių heterotrofų skaičius, pvz., lėkštelės kolonijų skaičius, naudojant jūros dumblių agarą. Tai ypač pageidautina naudojant priekrantės arba užterštų vietų ėminius. Tikrinamas jūros vandens heterotrofų mikrobinis aktyvumas, atliekant bandymą su etalonine medžiaga.

▼M6

Kolbų ruošimas

16. Reikia užtikrinti, kad visi stikliniai indai būtų kruopščiai išplauti, bet ne būtinai steriliai (pvz., vandenilio chlorido rūgšties alkoholiniu tirpalu), prieš naudojant jie turi būti praskalauti ir išdžiovinti, kad būtų išvengta užteršimo pirmiau atliktų bandymų likučiais. Kolbos, prieš jas naudojant pirmą kartą, taip pat turi būti plaunamos.

17. Bandomosioms cheminėms medžiagoms įvertinti vienu metu naudojamos dvi kolbos, dar viena kolba naudojama etaloninei medžiagai. Atliekamas kartotinis tuščiasis bandymas be bandomosios ir be etaloninės medžiagos, naudojamos analizės tuštiesiems ėminiams nustatyti. Bandomosios medžiagos ištirpinamos bandymo terpėje, galima patogiu būdu įpilti naudojant koncentruotą pradinį tirpalą, kad būtų gautos paprastai 5–40 mg DOC/l reikiamos pradinės koncentracijos. Etaloninė medžiaga tikrinama paprastai nuo pradinės koncentracijos, atitinkančios 20 mg DOC/l. Jei naudojami bandomosios ir (arba) etaloninės cheminės medžiagos pradiniai tirpalai, užtikrinama, kad jūros vandens terpės druskingumas daug nepakistų.

18. Jei galima tikėtis toksinio poveikio arba jo negalima atmesti, į bandymo schemą galbūt reikėtų įtraukti kartotinį inhibavimo bandymą. Bandomoji ir etaloninė cheminės medžiagos pilamos į tą patį indą, etaloninės medžiagos koncentracijai paprastai esant lygiai kontrolinio bandymo koncentracijai (t. y. 20 mg DOC/l), kad būtų galima palyginti.

19. Reikiami bandymo tirpalų kiekiai išpilstomi į kūgines kolbas (patogus kiekis yra maždaug pusė kolbos tūrio) ir kiekviena kolba uždengiama nesandariu dangčiu (pvz., aliuminio folija), kad galėtų vykti dujų mainai tarp kolbos ir aplinkos oro. (Vatos kamščiai netinka, jei naudojama DOC analizė). Indai statomi ant purtyklės ir visą bandymą nepertraukiamai kratomi nedideliu greičiu (pvz., 100 aps/min). (15–20 °C temperatūra reguliuojama ± 2 °C tikslumu), o indai apsaugomi nuo šviesos, kad neaugtų dumbliai. Užtikrinama, kad aplinkos ore nebūtų toksinių medžiagų.

Fizikinių ir cheminių reiškinių kontrolės bandymas

20. Jei įtariamas abiotinis skaidymas arba nuostolių mechanizmai, pvz., hidrolizė (tik specifinės analizės problema), garavimas arba adsorbcija, patariama atlikti fizikinių ir cheminių reiškinių kontrolės bandymą. Jį galima atlikti į indus su bandomąja chemine medžiaga įdedant gyvsidabrio (II) chlorido ($HgCl_2$) ([1]) (50–100 mg/l), kad būtų apribotas mikrobinis aktyvumas. Reikšmingas DOC arba specifinės cheminės medžiagos koncentracijos sumažėjimas atliekant fizikinių ir cheminių reiškinių kontrolės bandymą rodo, kad yra abiotinio pašalinimo mechanizmai. (Jei naudojamas gyvsidabrio chloridas, reikėtų atkreipti dėmesį į trukdžius arba katalizatoriaus nuodijimą atliekant DOC analizę).

Kolbų skaičius

21. Atliekant tipinį bandymą, naudojamos šios kolbos:

1 ir 2 kolbos – su bandomąja chemine medžiaga (bandomąja suspensija);

3 ir 4 kolbos – tik su jūros vandeniu (tuščiasis ėminys);

5 kolba – su etalonine chemine medžiaga (procedūros kontrolinis ėminys);

6 kolba – su bandomąja ir etalonine chemine medžiaga (toksiškumo kontrolinis ėminys) – nebūtinas;

7 kolba – su bandomąja chemine medžiaga ir sterilizavimo priemone (abiotinis sterilus kontrolinis ėminys) – nebūtinas.

([1]) Gyvsidabrio (II) chloridas ($HgCl_2$) yra labai toksiška cheminė medžiaga, kuri turi būti naudojama taikant tinkamas atsargumo priemones. Šios cheminės medžiagos turinčios vandeninės atliekos turėtų būti tinkamai šalinamos; jos neturėtų būti išleidžiamos į kanalizacijos sistemą.

▼M6

DOC analizė

22. Bandymo eigoje tam tikrais intervalais imami DOC analizės ėminiai (1 priedėlis). Ėminiai visuomet imami bandymo pradžioje (0 dieną) ir 60 dieną. Iš viso būtina turėti ne mažiau kaip penkis ėminius skaidymo laikiniam kitimui aprašyti. Neįmanoma nurodyti tam tikro ėminių ėmimo laiko grafiko, nes biologinio skaidymo greitis yra skirtingas. Atliekamas kartotinis kiekvieno ėminio DOC nustatymas.

Ėminių ėmimas

23. Reikiamas ėminių tūris priklauso nuo analizės metodo (specifinė analizė), nuo naudojamo anglies analizatoriaus ir nuo procedūros (membraninis filtravimas ar centrifugavimas), pasirinktos ėminiui apdoroti prieš anglies nustatymą (25 ir 26 pastraipos). Prieš imant ėminį, būtina įsitikinti, ar bandymo terpė yra gerai sumaišyta ir ar visa ant kolbos sienelių prilipusi medžiaga yra ištirpinta arba suspenduota.

24. Paėmus ėminį, jis iš karto filtruojamas per membraninį filtrą arba centrifuguojamas. Prireikus filtruotus arba centrifuguotus ėminius galima laikyti 2–4 °C temperatūroje iki 48 h arba ilgesnį laikotarpį, jei temperatūra žemesnė kaip – 18 °C (jei žinoma, kad cheminė medžiaga nebus paveikta, prieš laikymą ji parūgštinama iki pH 2).

25. Membraniniai filtrai (0,2–0,45 μm) tinka, jei užtikrinama, kad iš jų neišsiskiria anglis ir jie neadsorbuoja cheminės medžiagos filtravimo etape, pvz., polikarbonato membraniniai filtrai. Kai kurie membraniniai filtrai yra impregnuoti paviršinio aktyvumo medžiagomis hidrofiliškumui pagerinti ir iš jų gali išsiskirti gan didelis ištirpusios anglies kiekis. Tokie filtrai ruošiami juos virinant dejonizuotame vandenyje paeiliui tris kartus, kiekvieną kartą po vieną valandą. Po virinimo filtrai laikomi dejonizuotame vandenyje. Pirmieji 20 ml filtrato išpilami lauk.

26. Užuot naudojus membraninį filtravimą, ėminius galima centrifuguoti. Centrifuguojama 40 000 $m.s^{-2}$ (~ 4 000 g) greičiu 15 min, pageidautina, aušinamąja centrifuga.

Pastaba: manoma, kad esant labai mažai koncentracijai, centrifugavimu neįmanoma atskirti suminės organinės anglies (TOC) ir DOC (TOC/DOC), nes pašalinamos ne visos bakterijos, arba anglis, kaip bakterijų plazmos dalis, vėl ištirpsta. Esant didesnei bandymo koncentracijai (> 10 mg C litrui), centrifugavimo paklaida atrodo palyginti maža.

Ėminių ėmimo dažnumas

27. Jei analizė atliekama iš karto, kai paimamas ėminys, kito ėminių ėmimo laikas įvertinamas pagal analizinio nustatymo rezultatą.

28. Jei ėminiai laikomi (24 pastraipa) analizei atlikti vėliau, imama daugiau nei penki minimaliai reikalaujami ėminiai. Iš pradžių analizuojami paskutiniai ėminiai ir analizei nuosekliai „atgaliniu būdu“ pasirenkant reikiamus ėminius, galima gauti tinkamos formos biologinio skaidymo kreivę analizuojant palyginti mažą ėminių skaičių. Jei iki bandymo pabaigos skaidymas neįvyko, kitų ėminių analizuoti nereikia ir šioje situacijoje analizės „atgaliniu būdu“ strategija gali sutaupyti daug analizei skirtų lėšų.

▼M6

29. Jei biologinio skaidymo kreivės pastovioji būsena (stabilizavimasis) stebima anksčiau nei 60-ąją dieną, bandymas nutraukiamas. Jei skaidymas akivaizdžiai prasidėjo prieš 60 dieną, bet pastoviosios būsenos nepasiekė, bandymas tęsiamas toliau.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

30. Analizės rezultatai įrašomi į pridedamą specifikaciją (2 priedėlis) ir bandomosios bei etaloninės cheminės medžiagos biologinio skaidymo vertės apskaičiuojamos pagal lygtį:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100,$$

čia:

D_t – DOC skaidymas arba specifinės cheminės medžiagos pašalinimas t laiku, procentais,

C_0 – DOC arba specifinės cheminės medžiagos pradinė koncentracija bandymo terpėje,

C_t – DOC arba specifinės cheminės medžiagos koncentracija bandymo terpėje t laiku,

$C_{bl(0)}$ – DOC arba specifinės cheminės medžiagos pradinė koncentracija tuščiajame ėminyje,

$C_{bl(t)}$ – DOC arba specifinės cheminės medžiagos koncentracija tuščiajame ėminyje t laiku.

31. Skaidymas nurodomas kaip pašalintos DOC (visiškas suskaidymas) arba pašalintos specifinės cheminės medžiagos (pradinis skaidymas) procentinė dalis t laiku. DOC koncentracija skaičiuojama 0,1 mg litrui tikslumu, o D_t verčių vidurkiai apvalinami iki sveiko procento.

32. Skaidymo eiga pateikiama grafiškai kaip kreivė, pavaizduota „Rezultatų tinkamumas ir aiškinimas“ skyriaus paveiksle. Jei duomenų pakanka, iš kreivės apskaičiuojamas eksponentinis tarpsnis (t_L) ir 50 procentų pašalinimo nuo eksponentinis tarpsnio pabaigos trukmė (t_{50}).

Bandymo ataskaita

33. Bandymo ataskaitoje turi būti ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— fizikinė būsena ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės;

— identifikavimo duomenys.

Bandymų sąlygos:

— ėminių ėmimo vietos vieta ir aprašymas; užterštumo ir mitybinių medžiagų būsena (kolonijų skaičius, nitratas, amonis, fosfatas, jei tinka);

— ėminio charakteristikos (ėmimo data, gylis, išvaizda, temperatūra, druskingumas, DOC (neprivaloma), laiko tarpas tarp paėmimo ir bandymo;

▼M6

— taikytas jūros vandens sendinimo metodas (jei buvo);

— taikytas jūros vandens pradinio apdorojimo metodas (filtravimas ar sedimentacija);

— taikytas DOC nustatymo metodas;

— taikytas specifinės analizės (neprivaloma) metodas;

— heterotrofų skaičiaus jūros vandenyje nustatymo metodas (lėkštelės kolonijų skaičiaus metodas arba alternatyvi procedūra) (neprivalomas);

— kiti metodai (neprivalomi), taikyti jūros vandeniui apibūdinti (ATP matavimas ir kt.).

Rezultatai:

— analizės duomenys, pateikti specifikacijoje (2 priedėlis);

— skaidymo bandymo eiga yra grafiškai pavaizduota kreivėje, rodančioje eksponentinis tarpsnį (t_L), krypties koeficientą ir 50 procentų pašalinimo (nuo eksponentinis tarpsnio pabaigos) trukmę (t_{50}). Eksponentinis tarpsnis gali būti įvertintas grafiškai, kaip pavaizduota „Rezultatų tinkamumas ir aiškinimas“ skyriaus paveiksle arba paprastumo dėlei imamas kaip trukmė, per kurią skaidymas įvyksta 10 procentų;

— skaidymo, išmatuoto po 60 dienų arba pasibaigus bandymui, procentinė dalis.

Rezultatų aptarimas.

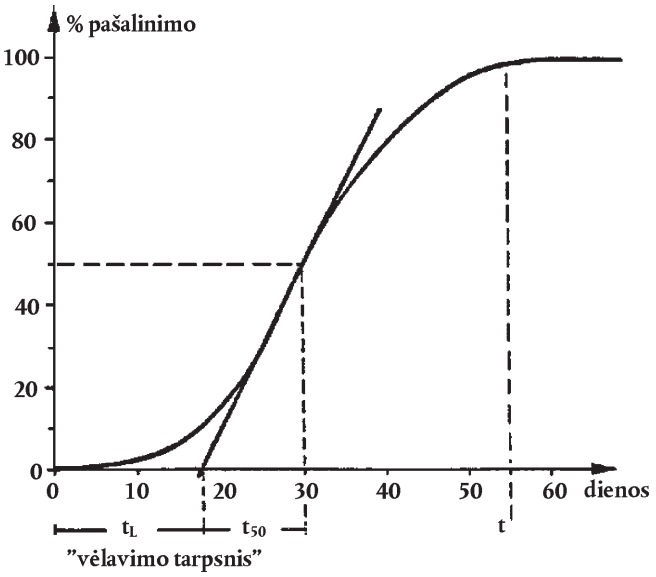
Rezultatų tinkamumas ir aiškinimas

34. Rezultatus, gautus etaloninėms cheminėms medžiagoms, pvz., natrio benzenkarboksilatui, natrio acetatui arba anilinui, turėtų būti įmanoma palyginti su tarplaboratorinio tyrimo rezultatais (3) (žr. „Etaloninės cheminės medžiagos“ skyrių, 7 pastraipą). Jei rezultatai, gauti etaloninėms cheminėms medžiagoms, yra netipiški, bandymą reikėtų pakartoti naudojant kitą jūros vandens ėminį. Nors inhibavimo bandymų rezultatus ne visuomet įmanoma tiesiogiai paaiškinti dėl bandomosios medžiagos DOC indėlio, suminio DOC šalinimo greičio reikšmingas sumažėjimas, palyginti su kontroliniu ėminiu, yra teigiamas toksinio poveikio ženklas.

35. Dėl santykinai didelių naudojamų bandymo koncentracijos verčių palyginti su dauguma natūralių sistemų (taigi nepalankaus santykio tarp bandomosios cheminės medžiagos ir kitų anglies šaltinių koncentracijos verčių), metodas turi būti laikomas parengiamuoju bandymu, kuris gali būti naudojamas parodyti, kad cheminė medžiaga lengvai biologiškai skaidoma arba neskaidoma. Todėl mažas rezultatas nebūtinai reiškia, kad bandomoji cheminė medžiaga nėra biologiškai skaidoma jūros aplinkoje, bet rodo, kad šiam dalykui nustatyti teks atlikti didesnį darbą.

Teorinio skaidymo bandymo pavyzdys, kuris rodo galimą t_L („eksponentinis tarpsnio“ trukmė) ir t_{50} (laiko tarpas nuo t_L), per kurį pašalinama 50 procentų, verčių įvertinimo būdą, pavaizduotas toliau pateiktame paveiksle.

▼M6



UŽDAROSIOS KOLBOS METODAS

ĮVADAS

1. Šis metodas – tai jūros vandeniui skirtas uždarosios kolbos metodo (5) variantas, kuris buvo galutinai parengtas kaip Danijos vandens kokybės instituto Europos Komisijai (EB) atlikto tarplaboratorinio tyrimo rezultatas (3).

2. Kaip ir kartu pateikiamo jūros vandeniui skirto kratomos kolbos metodo rezultatai, šio bandymo rezultatai neturi būti laikomi lengvo biologinio skaidumo rodikliais, bet jie turi būti naudojami konkrečiai, kai reikia gauti informaciją apie cheminių medžiagų biologinį skaidumą jūros aplinkoje.

METODO PRINCIPAS

3. Tam tikras bandomosios medžiagos kiekis ištirpinamas bandymo terpėje, kad būtų gauta paprastai 2–10 mg bandomosios cheminės medžiagos vienam litrui koncentracija (galima naudoti vieną ar kelias koncentracijos vertes). Tirpalas laikomas tamsoje pripildytoje uždarytoje kolboje pastovios temperatūros vonioje arba po gaubtu, kurių temperatūra 15–20 °C intervale reguliuojama ± 1 °C tikslumu. Jei tyrimo tikslas yra aplinkos situacijų modeliavimas, bandymus galima atlikti už šio normalios temperatūros intervalo ribų, jei padaromi reikiami temperatūros reguliavimo pritaikymai. Skaidymas stebimas atliekant deguonies analizę 28 dienų laikotarpiu.

4. Tarplaboratorinis tyrimas parodė, kad, tęsiant bandymą ilgiau kaip 28 dienas, naudingos informacijos, dažniausiai dėl didelių trukdžių, nebūtų gauta. Buvo per didelės tuščiojo ėminio biologinio deguonies suvartojimo (BOD) vertės, galbūt dėl augimo ant sienelių, kurį sukelia maišymo stoka, ir dėl nitrifikavimo. Todėl rekomenduojama trukmė – 28 dienos, tačiau, jei tuščiojo ėminio BOD vertė išlieka ne didesnė kaip 30 procentų (15 ir 40 pastraipos), bandymą būtų galima pratęsti.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

5. Siekiant sužinoti, ar bandymas gali būti taikomas tam tikrai cheminei medžiagai, turi būti žinomos kai kurios jos savybės. Reikia žinoti empirinę formulę, kad būtų galima apskaičiuoti teorinį deguonies poreikį (ThOD) (žr. 3 priedėlį); antraip, kaip pamatinė vertė turi būti nustatytas cheminės medžiagos cheminis deguonies suvartojimas (COD). COD taikymas mažiau priimtinas, nes, atliekant COD bandymą, ne visos cheminės medžiagos visiškai oksiduojasi.

▼M6

6. Cheminės medžiagos tirpumas turėtų būti ne mažesnis kaip 2 mg/l, nors iš esmės būtų galima bandyti mažiau tirpias chemines medžiagas (pvz., naudojant ultragarsą), taip pat ir lakiąsias chemines medžiagas. Reikia turėti duomenų apie bandomosios cheminės medžiagos grynumą arba apie pagrindinių komponentų santykines dalis, kad būtų galima aiškinti gautus rezultatus, ypač, kai rezultatas yra arti „atitikties“ lygio.

7. Informacija apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą bakterijoms, pvz., išmatuotą atliekant trumpalaikius kvėpavimo greičio bandymus (4), renkantis tinkamas bandymo koncentracijos vertes gali būti labai naudinga, taip pat gali ji gali būti svarbi tinkamai paaiškinti mažas biologinio skaidumo vertes. Tačiau tokios informacijos ne visada pakanka, kad būtų paaiškinti biologinio skaidumo bandymų rezultatai, ir labiau tinka 27 pastraipoje aprašyta procedūra.

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

8. Turi būti naudojamos tinkamos etaloninės cheminės medžiagos jūros vandens ėminio mikrobiniam aktyvumui tikrinti. Natrio benzenkarboksilatas, natrio acetatas ir anilinas gali būti šiam tikslui tinkamų cheminių medžiagų pavyzdžiai. Šių cheminių medžiagų skaidymo iki ne mažiau kaip 60 procentų (jų ThOD) trukmė turi būti palyginti trumpa, priešingu atveju rekomenduojama bandymą kartoti su kitu jūros vandens ėminiu.

9. Atliekant EK tarplaboratorinį tyrimą, kai jūros vandens ėminiai buvo imami iš skirtingų vietų ir skirtingais metų laikais (3), natrio benzenkarboksilatui gautas eksponentinis tarpsnis (t_L) ir laikas, per kurį pasiekiamas 50 procentų skaidymas (t_{50}), atmetus eksponentinis tarpsnį, buvo atitinkamai nuo 0 iki 2 dienų ir nuo 1 iki 4 dienų. Anilino t_L – nuo 0 iki 7 dienų, o t_{50} – nuo 21 iki 12 dienų.

ATKURIAMUMAS

10. Metodo atkuriamumas buvo nustatytas atliekant EB tarplaboratorinį tyrimą (3).

METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

11. Įprasta laboratorinė įranga ir:

(a) 250–300 ml BOD kolbos su šlifo kamščiais arba siaurakaklės 250 ml kolbos su šlifo kamščiais;

(b) Kelios 2, 3 ir 4 litrų kolbos su litro tūrio žymėmis bandymui paruošti ir BOD kolboms pripildyti;

(c) Vandens vonia arba pastovios temperatūros patalpa, kurioje nebūtų šviesos, kolboms laikyti pastovioje temperatūroje (± 1 °C).

(d) Ištirpusio deguonies analizės įranga;

(e) Membraniniai filtrai, 0,2–0,45 μm (neprivalomi);

(f) Specifinės analizės įranga (neprivaloma).

Jūros vanduo

12. Jūros vandens ėminys paimamas į gerai išvalytą talpyklą ir vežamas į laboratoriją, pageidautina, per vieną ar dvi dienas po paėmimo. Vežant ėminį, jo temperatūra neturi pakilti gerokai aukščiau bandymo temperatūros.

▼M6

13. Ėminio ėmimo vieta tiksliai identifikuojama ir apibūdinama, atsižvelgiant į jos užterštumo ir mitybinių medžiagų būseną. Į šį apibūdinimą, ypač priekrantės vandenų, įtraukiamas heterotrofinių mikroorganizmų kolonijų skaičius ir ištirpusio nitrato, amonio ir fosfato koncentracijos nustatymas.

14. Apie patį jūros vandens ėminį pateikiama tokia informacija:

— ėmimo data;

— ėmimo gylis;

— ėminio išvaizda, drumstumas ir kt.;

— temperatūra ėmimo metu;

— druskingumas;

— ištirpusi organinė anglis (DOC);

— vėlinimo tarp ėminio paėmimo ir jo bandymo trukmė.

15. Jei nustatoma, kad jūros vandens ėminio DOC kiekis yra labai didelis arba manoma, kad tuščiojo ėminio BOD po 28 dienų bus didesnis kaip 30 procentų etaloninių medžiagų BOD, prieš naudojant jūros vandenį rekomenduojama jį maždaug savaitę sendinti.

16. Sendinama laikant aerobinėmis sąlygomis bandymo temperatūroje ir tamsoje arba išsklaidytoje šviesoje. Jei būtina, aerobinės sąlygos užtikrinamos nestipriai aeruojant. Sendinant mažėja lengvai skaidomų organinių mediagų kiekis. Atliekant tarplaboratorinį tyrimą (3), nebuvo nustatyta skirtumo tarp sendintų ir naujai paimtų jūros vandens ėminių skaidumo potencialo.

17. Prieš naudojant atliekamas jūros vandens pradinis apdorojimas, kad būtų pašalintos stambios dalelės, pvz., filtruojama per nailono filtrą arba akytąjį popierinį filtrą (ne per membraninį arba stiklo pluošto filtrus), arba sedimentacijos ir dekantavimo keliu. Taikyta procedūra turi būti nurodyta ataskaitoje. Pradinis apdorojimas, jei naudojamas, atliekamas po sendinimo.

Mineralinių mitybinių medžiagų pradiniai tirpalai

18. Ruošiami šie pradiniai tirpalai iš analiziškai grynų reagentų:

(a)	Kalio divandenilio ortofosfato, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikalio vandenilio ortofosfato, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinatrio vanenilio ortofosfato dihidrato, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Amonio chlorido, NH_4Cl	0,50 g
	Ištirpinama ir skiedžiama iki 1 litro distiliuotu vandeniu.	
(b)	Kalcio chlorido, $CaCl_2$	27,50 g
	Ištirpinama ir skiedžiama iki 1 litro distiliuotu vandeniu.	
(c)	Magnio sulfato heptahidrato, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Ištirpinama ir skiedžiama iki 1 litro distiliuotu vandeniu.	
(d)	Geležies (III) chlorido heksahidrato, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Ištirpinama ir skiedžiama iki 1 litro distiliuotu vandeniu.	

▼M6

Nuosėdų susidarymo (d) tirpale galima išvengti, įlašinant vieną lašą koncentruotos HCl arba įdedant 0,4 g etilendiamintetracto rūgšties (EDTA, dinatrio druskos) litrui. Jei pradiniame tirpale susidaro nuosėdos, jis keičiamas naujai paruoštu tirpalu.

Bandymo terpės ruošimas

19. Įpilama po 1 ml kiekvieno iš pirmiau nurodytų pradinių tirpalų vienam litrui apdoroto jūros vandens. Bandymo terpė prisotinama oru bandymo temperatūroje aeruojant švariu suslėgtuoju oru ne trumpiau kaip 20 min. Kontrolės tikslais nustatoma ištirpusio deguonies koncentracija. Ištirpusio deguonies soties koncentraciją, kaip druskingumo ir temperatūros funkciją, galima nustatyti pagal nomogramą, pridedama prie šio bandymo metodo (4 priedėlis).

Sėjinys

20. Be mikroorganizmų, kurie jau yra jūros vandenyje, specialaus sėjinio nededama. Jūros vandens bandymo terpėje (taip pat pageidautina pradiniuose jūros vandens ėminiuose) nustatomas (nebūtinai) kolonijas sudarančių heterotrofų skaičius, pvz., lėkštelės kolonijų skaičius, naudojant jūros dumblių agarą. Tai ypač pageidautina naudojant priekrantės arba užterštų vietų ėminius. Tikrinamas jūros vandens heterotrofų mikrobinis aktyvumas, atliekant bandymą su etalonine medžiaga.

Bandymo kolbų ruošimas

21. Atliekami visi būtini veiksmai, įskaitant jūros vandens sendinimą ir pradinį apdorojimą pasirinktoje bandymo temperatūroje nuo 15 iki 20 °C, taip pat užtikrinamas visų stiklinių indų švarumas, bet ne sterilumas.

22. Ruošiamos BOD kolbų grupės bandomosios ir etaloninės cheminės medžiagos BOD nustatyti, vienu metu atliekant bandymų serijas. Visos analizės atliekamos kaip kartotinės (tuščiųjų ėminių, etaloninių ir bandomųjų cheminių medžiagų), t. y. kiekvienam nustatymui ruošiamos dvi kolbos. Analizės atliekamos bent 0, 5, 15 ir 28 dieną (keturi nustatymai). Atliekant keturis deguonies nustatymus iš viso reikės $3 \times 2 \times 4 = 24$ kolbų (tuščiojo ėminio, etaloninės ir bandomosios cheminės medžiagos), taigi maždaug 8 litrų bandymo terpės (vienai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai).

23. Bandomosios ir etaloninės cheminės medžiagos tirpalai ruošiami atskirai pakankamai didelio tūrio kolbose (11 pastraipa), iš pradžių įdedant bandomąją ir etaloninę cheminę medžiagą tiesiogiai arba įpilant koncentruoto pradinio tirpalo į iš dalies pripildytas dideles kolbas. Įpilama dar bandymo terpės, kad būtų gauta reikiama galutinė koncentracija. Jei naudojami bandomosios ir (arba) etaloninės cheminės medžiagos pradiniai tirpalai, būtina užtikrinti, kad reikšmingai nepakistų jūros vandens terpės druskingumas.

24. Bandomosios ir etaloninės cheminės medžiagos koncentracijos vertės pasirenkamos, atsižvelgiant į:

(a) ištirpusio deguonies tirpumą jūros vandenyje dažniausiai pasitaikančiomis bandymo temperatūros ir druskingumo sąlygomis (žr. pridedamą nomogramą, 4 priedėlis);

(b) jūros vandens tuščiojo ėminio BOD ir

(c) numanomą bandomosios cheminės medžiagos biologinį skaidumą.

▼M6

25. 15 °C ir 20 °C temperatūroje ir esant 32 tūkstantųjų druskingumui (okeano vanduo), ištirpusio deguonies tirpumas yra maždaug 8,1 ir 7,4 mg/l. Paties jūros vanduo gali suvartoti deguonies (tuščiojo ėminio kvėpavimui) 2 mg O_2/l arba daugiau, jei jūros vanduo nesendintas. Todėl siekiant užtikrinti, kad po bandomosios cheminės medžiagos oksidacijos deguonies koncentracija liktų reikšminga, cheminių medžiagų, kurios, kaip manoma, visiškai suskaidomos bandymų sąlygomis (pvz., etaloninių cheminių medžiagų) naudojama pradinė koncentracija yra maždaug 2–3 mg/l (atsižvelgiant į ThOD). Mažesnio skaidumo cheminių medžiagų bandymo koncentracija gali būti didesnė, iki maždaug 10 mg/l, jei nėra toksinio poveikio. Gali būti naudinga atlikti lygiagrečius bandymus su mažos (apie 2 mg/l) ir didelės (apie 10 mg/l) koncentracijos bandomąja chemine medžiaga.

26. Kolbose, kuriose nėra bandomosios arba etaloninės cheminės medžiagos, lygiagrečiai turi būti nustatytas deguonies tuščiasis ėminys.

27. Jei turi būti nustatyti inhibavimo reiškiniai, didelėse kolbose atskirai ruošiama tokia tirpalų serija (13 pastraipa):

(a) 2 mg litrui lengvai skaidomos cheminės medžiagos, pvz., kurios nors išvardytos etaloninės cheminės medžiagos;

(b) *x* mg litrui bandomosios cheminės medžiagos (*x* paprastai 2);

(c) 2 mg litrui lengvai skaidomos cheminės medžiagos ir *x* mg litrui bandomosios cheminės medžiagos.

Fizikinių ir cheminių reiškinių kontrolinių ėminių bandymas

28. Jei pasirenkama atlikti specifinę analizę, galima atlikti fizikinių ir cheminių savybių bandymą, kad būtų galima patikrinti, ar bandomoji medžiaga šalinama pagal abiotinius mechanizmus, pvz., hidrolizės arba adsorbcijos. Fizikinių ir cheminių reiškinių kontrolės bandymą galima atlikti į dvi kolbas su bandomąja chemine medžiaga įdedant gyvsidabrio (II) chlorido ($HgCl_2$) ([1]) (50–100 mg/l), kad būtų apribotas mikrobinis aktyvumas. Reikšmingas specifinės cheminės medžiagos koncentracijos sumažėjimas atliekant bandymą rodo, kad yra abiotinio pašalinimo mechanizmai.

BOD kolbų skaičius atliekant tipinį bandymą

29. Atliekant tipinį bandymą, naudojamos šios kolbos:

— mažiausiai 8 su bandomąja chemine medžiaga;

— mažiausiai 8 tik su jūros vandeniu, į kurį pridėta mitybinių medžiagų;

— mažiausiai 8 su etalonine chemine medžiaga ir, jei būtina

— 6 kolbos su bandomąja ir etalonine chemine medžiaga (toksiškumo kontrolinis ėminys).

PROCEDŪRA

30. Paruoštas tirpalas iš karto siurbiamas iš reikiamos didelės kolbos apatinio tūrio ketvirtadalio (ne nuo dugno) atitinkamai BOD kolbų grupei pripildyti. Iš karto nustatomas nulinių kontrolinių ėminių (nulinio laiko) ištirpęs deguonis (33 pastraipa) arba jie konservuojami, jei cheminė analizė būtų atliekama vėliau, nusodinant $MnCl_2$ (mangano (II) chloridu) ir NaOH (natrio hidroksidu).

([1]) Gyvsidabrio (II) chloridas ($HgCl_2$) yra labai toksiška cheminė medžiaga, kuri turi būti naudojama taikant tinkamas atsargumo priemones. Šios cheminės medžiagos turinčios vandeninės atliekos turėtų būti tinkamai šalinamos; jos neturėtų būti išleidžiamos į kanalizacijos sistemą.

▼M6

31. Likusios lygiagrečiai nustatomo BOD kolbos inkubuojamos bandymo temperatūroje (15–20 °C), laikomos tamsoje ir išimamos iš inkubavimo zonos po tam tikro laiko (pvz., po 5, 15 ir 28 dienų, bet ne mažiau) ir analizuojamos ištirpusiam deguoniui nustatyti (33 pastraipa).

32. Specifinės (neprivalomos) analizės ėminiai filtruojami per membraninį filtrą (0,2-0,45 μm) arba 15 min centrifuguojami. Jei ėminiai neanalizuojami iš karto, juos galima laikyti 2–4 °C temperatūroje iki 48 h arba ilgesnį laiką – 18 °C temperatūroje, (jei žinoma, kad cheminė medžiaga nebus paveikta, prieš laikymą ji parūgštinama iki pH 2).

Ištirpusio deguonies nustatymas

33. Ištirpusio deguonies koncentracija nustatoma taikant nacionaliniu arba tarptautiniu mastu patvirtintą cheminį arba elektrocheminį metodą.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

34. Analizės rezultatai įrašomi į pridedamas specifikacijas (5 priedėlis).

35. BOD apskaičiuojamas kaip tuščiojo ėminio ir bandomosios cheminės medžiagos tirpalo bandymų sąlygomis suvartoto deguonies skirtumas. Gauta suvartoto deguonies neto vertė dalijama iš cheminės medžiagos koncentracijos (m/v), kad BOD būtų išreikštas kaip mg BOD/mg bandomosios cheminės medžiagos. Skaidymas apibrėžiamas kaip biocheminio deguonies suvartojimo santykis su teoriniu deguonies suvartojimu (ThOD) (pageidautina) arba su cheminiu deguonies suvartojimu (COD) ir išreiškiamas procentine dalimi (žr. 36 pastraipą).

36. Bandomosios ir etaloninės cheminės medžiagos biologinio skaidymo vertės apskaičiuojamos kiekvienam ėminių ėmimo laikui taikant vieną iš šių lygčių:

$$\%\ biologinis\ skaidymas = \frac{mg\ O_2/mg\ bandomosios\ medžiagos}{mg\ ThOD/mg\ bandomosios\ medžiagos} \times 100$$

$$\%\ biologinis\ skaidymas = \frac{mg\ O_2/mg\ bandomosios\ medžiagos}{mg\ COD/mg\ bandomosios\ medžiagos} \times 100$$

čia:

ThOD – teorinis deguonies suvartojimas (skaičiavimas 3 priedėlyje)

COD – cheminis deguonies suvartojimas, nustatytas atliekant bandymą.

Pastaba: skaičiuojant abiem būdais (ThOD *arba* COD procentinės dalies), kartais gaunami nevienodi rezultatai; pageidautina naudoti ThOD, nes, atliekant COD bandymą, kai kurios cheminės medžiagos nevisiškai oksiduojasi.

37. Skaidymo eiga pateikiama grafiškai kaip kreivė (žr. pavyzdį „Rezultatų tinkamumas ir aiškinimas“ skyriuje). Jei duomenų pakanka, iš biologinio skaidymo kreivės apskaičiuojamas eksponentinis tarpsnis (t_L) ir 50 procentų pašalinimo nuo eksponentinis tarpsnio pabaigos trukmė (t_{50}).

38. Jei taikoma specifinė analizė (neprivaloma), nurodoma pradinio skaidymo procentinė dalis, kaip specifinės medžiagos pašalinimo bandymo laikotarpiu procentinė dalis (pataisyta atsižvelgiant į tuščiąjį analizės ėminį).

▼M6

Bandymo ataskaita

39. Bandymų ataskaitoje turi būti ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— fizikinė būsena ir, jei tinka, fizikinės ir cheminės savybės;

— identifikavimo duomenys.

Bandymų sąlygos:

— ėminių ėmimo vietos vieta ir aprašymas: užterštumo ir mitybinių medžiagų būsena (kolonijų skaičius, nitratas, amonis, fosfatas, jei tinka);

— ėminio charakteristikos (ėmimo data, gylis, išvaizda, temperatūra, druskingumas, DOC (neprivalomas), laiko tarpas tarp paėmimo ir bandymo);

— taikytas jūros vandens sendinimo metodas (jei buvo);

— taikytas jūros vandens pradinio apdorojimo metodas (filtravimas ar sedimentacija);

— taikytas COD nustatymo (jei atliekamas) metodas;

— taikytas deguonies matavimo metodas;

— bandymų sąlygomis mažai tirpių cheminių medžiagų dispergavimo procedūra;

— heterotrofų skaičiaus jūros vandenyje nustatymo metodas (lėkštelės kolonijų skaičiaus metodas arba alternatyvi procedūra);

— taikytas DOC nustatymo (jei atliekamas) metodas;

— taikytas specifinės analizės (neprivaloma) metodas;

— kiti neprivalomi metodai, taikyti jūros vandeniui apibūdinti (ATP matavimas ir kt.).

Rezultatai:

— specifikacijoje pateikti analizės duomenys (5 priedėlis);

— skaidymo bandymo eiga grafiškai pavaizduota kreivėje, rodančioje eksponentinis tarpsnį (t_L), krypties koeficientą ir trukmę (nuo eksponentinis tarpsnio pabaigos), per kurią deguonies suvartojimas dėl bandomosios cheminės medžiagos oksidacijos pasiekia 50 procentų visiško deguonies suvartojimo (t_{50}). Eksponentinis tarpsnis gali būti įvertintas grafiškai, kaip pavaizduota pridedame paveiksle, arba paprastumo dėlei imamas kaip trukmė, per kurią skaidymas įvyksta 10 procentų;

— skaidymo, išmatuoto po 28 dienų, procentinė dalis.

Rezultatų aptarimas.

Rezultatų tinkamumas ir aiškinimas

40. Tuščiojo ėminio kvėpavimui suvartoto deguonies kiekis neturėtų būti didesnis kaip 30 procentų kolboje esančio deguonies. Jei, naudojant naujai paimtą jūros vandenį, šio kriterijaus atitiktis neįmanoma, prieš naudojant jis turi būti sendinamas (stabilizuojamas).

41. Reikėtų atsižvelgti į tai, kad azoto turinčios cheminės medžiagos gali turėti įtakos rezultatams.

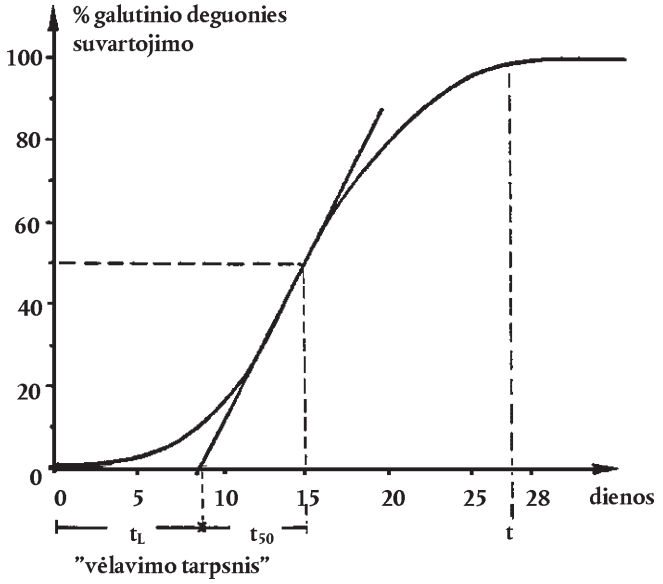
▼M6

42. Rezultatus, gautus etaloninėms cheminėms medžiagoms natrio benzenkarboksilatui ir anilinui, turėtų būti įmanoma palyginti su tarplaboratorinio tyrimo rezultatais (3) (9 pastraipa). Jei rezultatai, gauti etaloninėms cheminėms medžiagoms, yra netipiški, bandymą reikėtų pakartoti naudojant kitą jūros vandens ėminį.

43. Galima daryti prielaidą, kad bandomoji medžiaga yra bakterijų inhibitorius (naudojamos koncentracijos), jei etaloninės ir bandomosios cheminių medžiagų mišinio BOD yra mažesnis nei šių dviejų cheminių medžiagų atskirų tirpalų BOD suma.

44. Dėl santykinai didelių naudojamų bandymo koncentracijos verčių palyginti su dauguma natūralių sistemų, taigi nepalankaus santykio tarp bandomosios cheminės medžiagos ir kitų anglies šaltinių koncentracijos verčių, metodas turi būti laikomas parengiamuoju bandymu, kuris gali būti naudojamas parodyti, kad cheminė medžiaga lengvai biologiškai skaidoma arba neskaidoma. Todėl mažas rezultatas nebūtinai reiškia, kad bandomoji cheminė medžiaga nėra biologiškai skaidoma jūros aplinkoje, bet rodo, kad šiam dalykui nustatyti teks atlikti didesnį darbą.

Teorinio skaidymo bandymo pavyzdys, aiškinantis galimą t_L („eksponentinis tarpsnio“ trukmės) ir laiko tarpo (pradžia nuo t_L), per kurį deguonies suvartojimas dėl bandomosios cheminės medžiagos oksidacijos pasiekia 50 procentų galutinio deguonies suvartojimo, t_{50} verčių įvertinimo būdą, pateiktas toliau:



NUORODOS

(1) de Kreuk J.F. and Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. Chemosphere, 10 (6); 561-573.

(2) Šio priedo C.4-B skyrius. Lengvo biologinio skaidumo nustatymas. III dalis. Modifikuotas EBPO atrankos bandymas

(3) Nyholm N. and Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, March 1987, Commission of the European Communities.

(4) Šio priedo C.11 skyrius. Biologinis skaidymas. Aktyviojo dumblo kvėpavimo inhibavimo bandymas (anglies ir amonio oksidavimas).

(5) Šio priedo C.4 skyriaus E skirsnis. Lengvo biologinio skaidumo nustatymas. VI dalis. Uždarosios kolbos metodas.

▼M6

1 priedėlis

Organinės anglies nustatymas jūros vandenyje

KRATOMOS KOLBOS METODAS

Organinė anglis vandens ėminyje nustatoma, jame esančius organinius junginius oksidavus į anglies dioksidą, dažniausiai taikant vieną iš šių trijų būdų:

— šlapią oksidavimą persulfatu ir UV švitinimu;

— šlapią oksidavimą persulfatu aukštoje (116–130 °C) temperatūroje;

— deginimą.

Išsiskyręs CO_2 kiekybiškai nustatomas taikant infraraudonąją spektrometriją arba titrimetriniu metodu. Arba CO_2 redukuojamas iki metano, kuris kiekybiškai nustatomas liepsnos jonizaciniu detektoriumi (FID).

Persulfato ir UV metodas paprastai taikomas analizuojant „švarų“ vandenį, turintį mažą kietųjų dalelių kiekį. Abu kiti metodai gali būti taikomi daugeliui vandens ėminių tipų, kai oksidavimas persulfatu aukštoje temperatūroje yra tinkamiausias metodas mažai anglies turintiems ėminiams, o deginimo metodas taikomas ėminiams, kurių nelakiosios organinės anglies (NVOC) kiekis yra gerokai didesnis nei 1 mg C/l.

Trukdžiai

Visi trys metodai priklauso nuo ėminyje esančios neorganinės anglies (IC) pašalinimo arba kompensavimo. CO_2 pašalinimas prapūtimu iš parūgštinto ėminio yra dažniausiai taikomas IC šalinimo būdas, nors jį taikant netenkama lakiųjų organinių junginių nuostolių (1). Visiškas IC pašalinimas arba kompensavimas turi būti užtikrintas kiekvienai ėminio matricai ir be NVOC turi būti nustatyta lakioji organinė anglis (VOC), atsižvelgiant į ėminio tipą.

Dėl didelės chlorido koncentracijos sumažėja oksidavimo efektyvumas, taikant persulfato ir UV metodą (2). Tačiau šį trukdį galima pašalinti, jei oksidavimo reagentas modifikuojamas pridedant gyvsidabrio (II) nitrato. Rekomenduojama, kad būtų naudojamas maksimaliai priimtinas ėminio tūris kiekvienam chlorido turinčio ėminio tipui įvertinti. Jei didelę druskos koncentraciją turintis ėminys analizuojamas deginimo metodu, katalizatorius gali pasidengti druska ir gali būti per didelė deginimo vamzdžio korozija. Reikėtų imtis gamintojo vadove nurodytų atsargumo priemonių.

Labai drumsti ėminiai ir daug kietųjų dalelių turintys ėminiai gali būti ne visiškai oksiduoti taikant persulfato ir UV metodą.

Tinkamo metodo pavyzdys

Nelakioji organinė anglis nustatoma oksiduojant persulfatu ir UV švitinimu, o išsiskyręs CO_2 kiekybiškai nustatomas taikant nedispersinę infraraudonąją spektrometriją.

Oksidavimo reagentas modifikuojamas pagal (2) pateiktus patarimus, kaip aprašyta gamintojo vadove:

a) 8,2 g $HgCl_2$ ir 9,6 g $Hg(NO_3)_2$ H_2O ištirpinama keliuose šimtuose mililitrų mažos anglies koncentracijos laboratorinio vandens.

b) 20 g $K_2S_2O_8$ ištirpinama gyvsidabrio druskos tirpale.

▼M6

c) į mišinį įpilama 5 ml HNO_3 (konc.).

d) reagentas skiedžiamas iki 1 000 ml.

Trukdžiai dėl chloridų pašalinami, jei naudojamas ėminio tūris 40 µl esant 10 procentų chlorido ir ėminio tūris 200 µl esant 1,9 procento chlorido. Didesnės chlorido koncentracijos ir (arba) didesnio tūrio ėminiai gali būti analizuojami taikant šį metodą, jei išvengiama chlorido kaupimosi oksidavimo inde. Toliau, jei reikia, gali būti nustatyta tiriamo tipo ėminio lakioji organinė anglis.

NUORODOS

(1) ISO, Water quality – determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, January 16, 1986.

(2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16th edition, 1985.

Taip pat įdomu (pateikiamas autoanalizės sistemos aprašymas):

(3) Schreurs W. (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, 137-142.

▼M6

2 priedėlis

Biologinis skaidymas jūros vandenyje

KRATOMOS KOLBOS METODAS

SPECIFIKACIJA

1. **LABORATORIJA:**

2. **BANDYMO PRADŽIOS DATA:**

3. **BANDOMOJI CHEMINĖ MEDŽIAGA:**

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija: mg/l cheminės medžiagos

Pradinė koncentracija terpėje t_0: mg/l medžiagos

: mg DOC/l

4. **JŪROS VANDUO:**

Šaltinis:

Ėmimo data:

Ėmimo gylis:

Išvaizda ėmimo momentu (pvz., drumstas ir kt.):

Druskingumas ėmimo momentu: ‰

Temperatūra ėmimo momentu: °C

DOC, praėjus *x* valandų po paėmimo: mg/l

Apdorojimas prieš bandymą (pvz., filtravimas, sedimentacija,

Mikroorganizmų kolonijų skaičius — pradinis ėminys: kolonijų/ml

— bandymo pradžioje: kolonijų/ml

Kitos charakteristikos:

5. **ANGLIES NUSTATYMAS:**

Anglies analizatorius:

	Kolba Nr.		DOC po n dienų (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Bandymas: jūros vanduo su pridėtomis mitybinėmis medžiagomis ir bandomąja chemine medžiaga	1	a_1					
		a_2					
		vidutinė vertė, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		vidutinė vertė, $C_{b(t)}$					

▼**M6**

	Kolba Nr.		DOC po n dienų (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Tuščiasis ėminys: jūros vanduo be bandomosios cheminės medžiagos ir su pridėtomis mitybinėmis medžiagomis	1	c_1					
		c_2					
		vidutinė vertė, $C_{c(t)}$					
	2	d_1					
		d_2					
		vidutinė vertė, $C_{d(t)}$					
	vidutinė vertė, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **NEAPDOROTŲ DUOMENŲ ĮVERTINIMAS:**

Kolbos Nr.	Rezultatų skaičiavimas	% skaidymo po n dienų				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a\,(t)} - C_{bl\,(t)}}{C_0 - C_{bl\,(0)}} \times 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b\,(t)} - C_{bl\,(t)}}{C_0 - C_{bl\,(0)}} \times 100$	0				
Vidutinė vertė (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) D_1 ir D_2 vidutinė vertė neturėtų būti skaičiuojama, jei jos labai skiriasi.

Pastaba: Panašūs formatai gali būti taikomi, kai po skaidymo atliekama specifinė analizė etaloninei medžiagai ir toksiškumo kontroliniams ėminiams.

7. **ABIOTINIS SKAIDYMAS (neprivalomas)**

	Laikas (dienos)	
	0	t
DOC koncentracija (mg/l) steriliame kontroliniame ėminyje	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\%\ abiotinis\ skaidymas = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

▼M6

3 priedėlis

Teorinio biocheminio deguonies suvartojimo skaičiavimas

UŽDAROSIOS KOLBOS METODAS

Cheminės medžiagos $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$, kurios molekulinė masė MW, ThOD apskaičiuojamas pagal:

$$ThOD_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

Šiuo skaičiavimu atsižvelgiama į tai, kad C mineralizuojama iki CO_2, H iki H_2O, P iki P_2O_5 ir Na iki Na_2O. Halogenas pašalinamas kaip vandenilio halogenidas, o azotas kaip amoniakas.

Pavyzdys:

Gliukozė $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$ThOD = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 \ \ mg\ O_2/mg\ gliukozės$$

Išskyrus šarminių metalų druskas, druskų molekulinė masė skaičiuojama darant prielaidą, kad druskos buvo hidrolizuotos.

Daroma prielaida, kad siera oksiduota iki +6 būsenos.

Pavyzdys:

natrio n-dodecilbenzensulfonatas $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 \ \ mg\ O_2/mg\ cheminės\ medžiagos$$

Jei cheminė medžiaga turi azoto, jis gali būti pašalintas kaip amoniakas, nitritas ar nitratas, kurie atitinka skirtingas teorinio biocheminio deguonies suvartojimo vertes.

$$ThOD_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2_p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

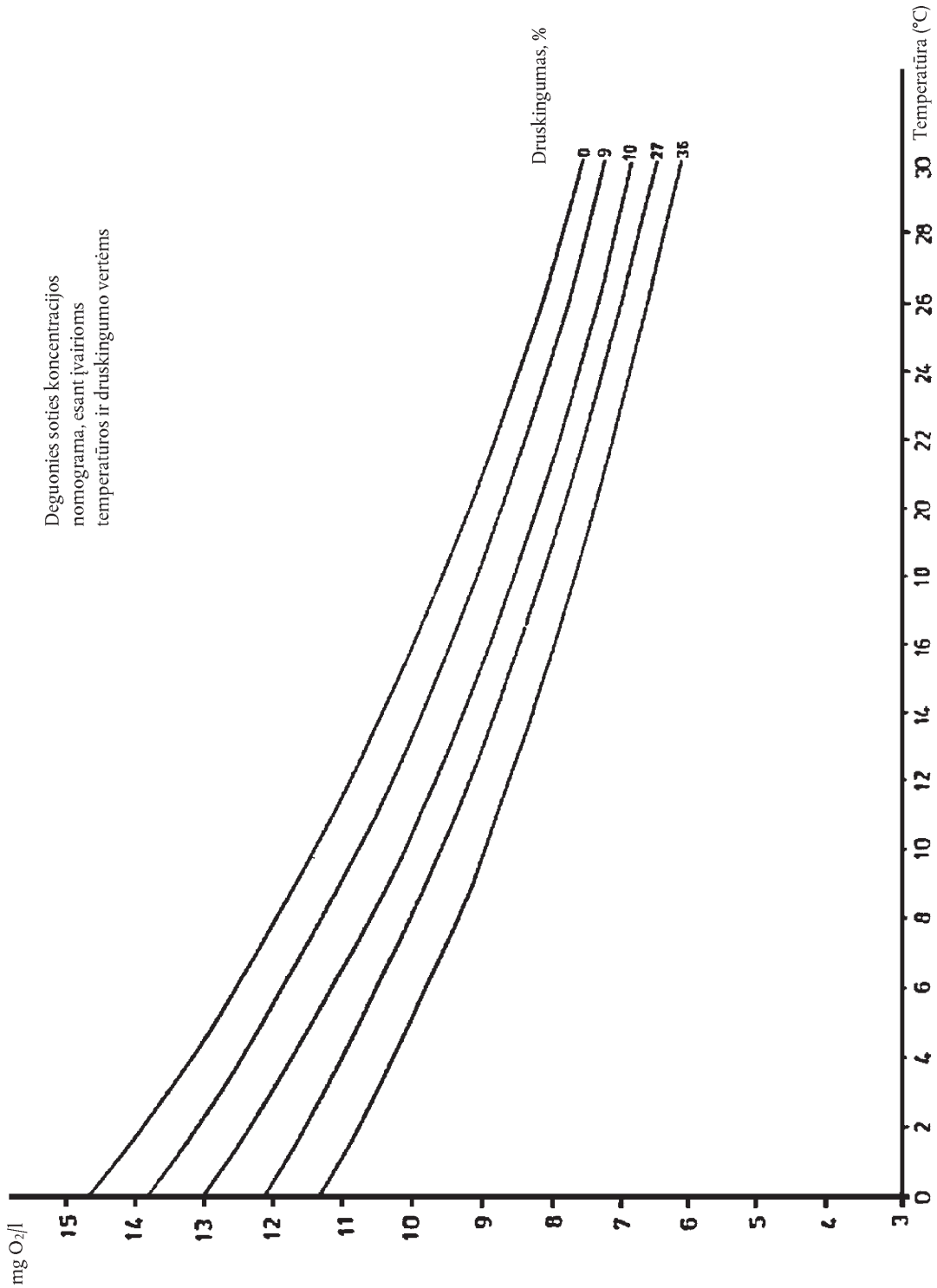
Daroma prielaida, kad analizuojant antrinį aminą buvo stebimas tik nitrato susidarymas:

$(C_{12}H_{25})_2$ NH, MW = 353

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 \ \ mg\ O_2/mg\ cheminės\ medžiagos$$

▼**M6**

4 priedėlis



▼M6

5 priedėlis

Biologinis skaidymas jūros vandenyje.

UŽDAROSIOS KOLBOS METODAS

SPECIFIKACIJA

1. **LABORATORIJA:**

2. **BANDYMO PRADŽIOS DATA:**

3. **BANDOMOJI CHEMINĖ MEDŽIAGA:**

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija:	mg/l
Pradinė konc. jūros vandens terpėje:	mg/l
ThOD arba COD:	mg O_2/mg bandomosios medžiagos

4. **JŪROS VANDUO:**

Šaltinis:

Ėmimo data:

Ėmimo gylis:

Išvaizda ėmimo momentu (pvz., drumstas ir kt.):

Druskingumas ėmimo momentu:	‰
Temperatūra ėmimo momentu:	°C
DOC, praėjus *x* valandų po paėmimo:	mg/l

Apdorojimas prieš bandymą (pvz., filtravimas, sedimentacija, sendinimas ir kt.):

Mikroorganizmų kolonijų skaičius — pradinis ėminys: kolonijų/ml

— bandymo pradžioje: kolonijų/ml

Kitos charakteristikos:

5. **BANDYMO TERPĖ:**

Temperatūra po aeravimo:	°C
O_2 koncentracija po aeravimo ir stovint prieš bandymo pradžią:	mg O_2/l

6. **DO NUSTATYMAS:**

Metodas: Vinklerio ar elektrometrinis metodas

	Kolba Nr.		mg O_2/l po *n* dienų			
			0	5	15	28
Bandymas: jūros vanduo su pridėtomis mitybinėmis medžiagomis ir bandomąja chemine medžiaga	1	a_1				
	2	a_2				
	Bandinio su bandomąja medžiaga vidutinė vertė	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼M6

	Kolba Nr.		mg O_2/l po *n* dienų			
			0	5	15	28
Tuščiasis ėminys: jūros vanduo su pridėtomis mitybinėmis medžiagomis, bet be bandomosios cheminės medžiagos	1	c_1				
	2	c_2				
	Tuščiojo bandinio vidutinė vertė	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Pastaba: panašus formatas gali būti taikomas etaloninei medžiagai ir toksiškumo kontroliniams ėminiams.

7. **DO SUVARTOJIMAS. SKAIDYMO % (% D):**

	DO suvartojimas po *n* dienų		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ (1)			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)(1)}{bandomoji\ cheminė\ medžiaga(mg/l) \times ThOD} \times 100$			

(1) Daroma prielaida, kad $m_{b(0)} = m_{t(0)}$, čia
$m_{b(0)}$ – tuščiojo ėminio vertė 0 dieną,
$m_{t(0)}$ – bandomosios cheminės medžiagos vertė 0 dieną.
Jei $m_{b(0)}$ nelygi $m_{t(0)}$, naudojama $(m_{t(0)} - m_{t(x)}) - (m_{b(0)} - m_{b(x)})$, čia
$m_{b(x)}$ – tuščiojo ėminio vertė *x* dieną,
$m_{t(x)}$ – bandomosios cheminės medžiagos vertė x dieną.

▼M6

C.43. ORGANINIŲ JUNGINIŲ ANAEROBINIS BIOLOGINIS SKAIDUMAS SUSKAIDYTAME DUMBLE. DUJŲ SUSIDARYMO MATAVIMO METODAS

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 311 (2006). Yra keli atrankos bandymai organinių cheminių medžiagų aerobiniam biologiniam skaidumui vertinti (C.4, C.9, C.10 ir C.11 (1) bandymo metodai bei EBPO TG 302C (2)), ir šių metodų taikymo rezultatai buvo sėkmingai taikomi cheminių medžiagų kitimui aerobinėje aplinkoje, ypač aerobinėse nuotekų apdorojimo stadijose, prognozuoti. Vandenyje netirpios cheminės medžiagos, taip pat tos, kurios adsorbuojamos ant nuotekų kietųjų dalelių, įvairiu santykiu apdorojamos aerobinėmis sąlygomis, nes šių cheminių medžiagų yra nusodintame dumble. Tačiau didžiąją šių cheminių medžiagų dalį suriša pirminis nusodintas dumblas, kuris atskiriamas nuo neapdorotų nuotekų nusodintuve prieš tai, kaip nusodintos arba virš nuosėdų esančios nuotekos apdorojamos aerobiškai. Dumblas, turintis šiek tiek tirpių cheminių medžiagų porų skystyje, tiekiamas į kaitinamus pūdytuvus, kad būtų anaerobiškai apdorotas. Šioje serijoje dar nėra anaerobinio biologinio skaidumo anaerobiniuose pūdytuvuose vertinimo bandymų, todėl šio bandymo tikslas yra užpildyti šią spragą; jis nebūtinai tinka kitoms bedeguonėms aplinkos terpėms.

2. Respirometriniai metodai, kuriais matuojamas anaerobinėmis sąlygomis susidarančių dujų, daugiausia metano (CH_4) ir anglies dioksido (CO_2), kiekis, buvo sėkmingai taikomi anaerobiniam biologiniam skaidumui vertinti. Birch ir kt. (3) apžvelgė šias procedūras ir padarė išvadą, kad išsamiausias buvo ankstesniais tyrimais (5)(6)(7) pagrįstas Shelton ir Tiedje darbas(4). Metodas (4), kurį toliau tobulino kiti (8) ir kuris tapo Amerikos standartais (9)(10), neišsprendė problemų, susijusių su skirtingu CO_2 ir CH_4 tirpumu bandymo terpėje ir su teorinio dujų susidarymo iš bandomosios cheminės medžiagos skaičiavimu. ECETOC ataskaitoje (3) rekomenduojamas papildomas skystyje virš nuosėdų ištirpusios neorganinės anglies (DIC) kiekio matavimas, kuris išplečia metodo taikymą. Buvo atliktas tarptautinis ECETOC metodo kalibravimas (arba tarplaboratorinis bandymas) ir metodas tapo ISO standartu ISO 11734 (11).

3. Šiame bandymo metode, kuris pagrįstas ISO 11734 (11), aprašomas atrankos metodas, kuriuo būtų įvertintas organinių cheminių medžiagų potencialus anaerobinis biologinis skaidumas specifinėmis sąlygomis (t. y. anaerobiniame pūdytuve tam tikru laiku ir esant tam tikram mikroorganizmų koncentracijos intervalui). Kadangi naudojamas praskiestas dumblas su palyginti didele bandomosios cheminės medžiagos koncentracija ir bandymo trukmė paprastai yra ilgesnė nei išlaikymo anaerobiniuose pūdytuvuose trukmė, bandymų sąlygos nebūtinai atitinka anaerobinių pūdytuvų sąlygas ir bandymas netinka organinių cheminių medžiagų anaerobiniam biologiniam skaidumui skirtingomis aplinkos sąlygomis vertinti. Dumblas veikiamas bandomąja chemine medžiaga iki 60 dienų, ir tai yra ilgiau nei normali dumblo išlaikymo anaerobiniuose pūdytuvuose trukmė (nuo 25 iki 30 dienų), nors išlaikymo pramoniniuose įrenginiuose trukmė gali būti gerokai didesnė. Prognozė atsižvelgiant į šio bandymo rezultatus nėra tokia patikima kaip aerobinio biologinio skaidymo atveju, nes duomenų apie bandomųjų cheminių medžiagų elgseną atliekant „lengvo“ aerobinio skaidumo bandymus bei modeliavimo bandymus ir apie aerobinę aplinką pakanka, kad nekiltų abejonių dėl ryšio buvimo; anaerobinei aplinkai tokių panašių duomenų yra mažai. Galima daryti prielaidą, kad vyksta visiškas anaerobinis biologinis skaidymas, jei dujų gamyba pasiekia 75 %–80 % jų teorinio kiekio. Šiame bandyme taikomi dideli cheminės medžiagos ir biomasės santykiai reiškia, kad cheminė medžiaga, kuri virsta dujomis, turi didesnę suskaidymo anaerobiniame pūdytuve tikimybę. Be to, cheminės medžiagos, kurios bandymo sąlygomis nevirsta dujomis, nebūtinai išliktų esant aplinkos

▼M6

sąlygas labiau atitinkantiems cheminės medžiagos ir biomasės santykiams. Taip pat yra kitų anaerobinių reakcijų, kurioms vykstant cheminės medžiagos gali būti suskaidytos bent iš dalies, pvz., chloro eliminavimo reakcija, bet šiuo bandymu tokios reakcijos neaptinkamos. Tačiau taikant specifinius analizės metodus bandomajai cheminei medžiagai nustatyti, jos išnykimą galima stebėti (žr. 6, 30, 44 ir 53 pastraipas).

BANDYMO PRINCIPAS

4. Mažos (< 10 mg/l) neorganinės anglies (IC) koncentracijos išplautas pūdytas dumblas ([1]) maždaug dešimt kartų skiedžiamas taip, kad suminė kietųjų dalelių koncentracija būtų nuo 1 g/l iki 3 g/l, ir iki 60 dienų inkubuojamas 35 °C ± 2 °C temperatūroje uždaruose induose su nuo 20 iki 100 mg C/l bandomosios cheminės medžiagos. Į dumblo aktyvumą atsižvelgiama matuojant lygiagrečius tuščiuosius kontrolinius ėminius su dumblo sėjiniu terpėje, bet be bandomosios cheminės medžiagos.

5. Matuojamas indo tuščiosios erdvės slėgio didėjimas dėl anglies dioksido ir metano susidarymo. Bandymų sąlygomis didžioji susidariusio CO_2 dalis ištirps skystojoje fazėje arba virs karbonatu arba hidrokarbonatu. Ši neorganinė anglis matuojama baigus bandymą.

6. Dėl bandomosios cheminės medžiagos skaidymo gautas anglies (neorganinės ir metano) kiekis apskaičiuojamas, iš susidariusių dujų kiekio ir IC kiekio skystojoje fazėje atėmus tuščiojo kontrolinio bandinio vertes. Biologinio skaidymo laipsnis apskaičiuojamas pagal gautą suminį IC ir metano anglies kiekį kaip išmatuoto arba apskaičiuoto įdėtos cheminės medžiagos anglies kiekio procentinė dalis. Biologinio skaidymo eigą galima stebėti atliekant tik susidariusių dujų kiekio tarpinius matavimus. Be to, pradinį biologinį skaidymą galima nustatyti atliekant specifinę analizę bandymo pradžioje ir pabaigoje.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

7. Reikėtų žinoti bandomosios cheminės medžiagos grynumo, tirpumo vandenyje, lakumo ir adsorbcijos charakteristikas, kad būtų galima tinkamai aiškinti rezultatus. Reikia žinoti bandomosios cheminės medžiagos organinės anglies kiekį (% m/m) pagal cheminę sandarą arba matuojant. Ar bandymas tinka lakiosioms bandomosioms cheminėms medžiagoms, padėtų spręsti išmatuota arba apskaičiuota Henrio dėsnio konstanta. Naudinga turėti informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą anaerobinėms bakterijoms, kad būtų galima pasirinkti tinkamą bandymo koncentraciją ir aiškinti mažo biologinio skaidumo rezultatus. Rekomenduojama įtraukti inhibavimo kontrolinį bandinį, išskyrus atvejus, kai yra žinoma, kad bandomoji cheminė medžiaga nėra anaerobinės mikroorganizmų veiklos inhibitorius (žr. 21 pastraipą ir ISO 13641-1 (12)).

([1]) Pūdytas dumblas yra nusodintų nuotekų fazių ir aktyviojo dumblo mišinys, inkubuotas anaerobiniame pūdytuve maždaug 35 °C, kad būtų sumažintas biomasės kiekis ir išspręstos kvapo problemos bei pagerinta dumblo vandens šalinimo geba. Jį sudaro anaerobinių rūgimo ir metanogeninių bakterijų derinys, gaminantis anglies dioksidą ir metaną (11).

▼M6

BANDYMO METODO TAIKOMUMAS

8. Bandymo metodą galima taikyti vandenyje tirpioms cheminėms medžiagoms, taip pat jis tinka mažai tirpioms ir netirpioms cheminėms medžiagoms, jei taikomas tikslus dozavimo metodas, pvz., žr. ISO 10634 (13). Sprendimas dėl lakiųjų medžiagų dažniausiai turi būti priimamas kiekvienu atveju atskirai. Gali tekti imtis specialių priemonių, pvz., neišleisti dujų bandymo eigoje.

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

9. Procedūrai išbandyti bandoma etaloninė cheminė medžiaga lygiagrečiai įrengiant atitinkamus indus kaip normalių bandymų dalį. Pavyzdžiui, tinka fenolis, natrio benzenkarboksilatas ir polietilenglikolis 400, kurių skaidymas per 60 dienų turėtų pasiekti daugiau kaip 60 % teorinio dujų kiekio (t. y. metano ir neorganinės anglies) (3)(14).

BANDYMO REZULTATŲ ATKURIAMUMAS

10. Atliekant tarptautinį tarplaboratorinį bandymą (14), buvo gautas geras trijų kartotinių bandymo indų dujų slėgio matavimo atkuriamumas. Santykinis standartinis nuokrypis (variacijos koeficientas, COV) paprastai buvo mažesnis kaip 20 %, nors ši vertė dažnai padidėdavo iki > 20 % esant toksinėms cheminėms medžiagoms arba arti 60 dienų inkubavimo laikotarpio pabaigos. Taip pat didesni nuokrypiai buvo nustatyti indams, kurių tūris < 150 ml. Galutinės bandymo terpės pH vertės buvo nuo 6,5 iki 7,0.

11. Atliekant tarplaboratorinį tyrimą buvo gauti šie rezultatai.

Bandomoji cheminė medžiaga	Visi duomenys n_1	Vidutinis skaidymas (visų duomenų) (%)	Santykinis standartinis nuokrypis (visų duomenų) (%)	Tinkami duomenys n2	Vidutinis skaidymas (tinkamų duomenų) (%)	Santykinis standartinis nuokrypis (tinkamų duomenų) (%)	Tinkamų bandymų skaidymo duomenys > 60 % n_3
Palmitino rūgštis	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19, 70 % (*)
Polietilenglikolis 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24, 83 % (*)

(*) n_2 dalis.

12. Vidutinės vertės variacijos koeficientai, gauti palmitino rūgščiai ir polietilenglikoliui 400, buvo atitinkamai 45 % (n = 36) ir 35 % (n = 38). Atmetus < 40 % ir > 100 % vertes (dėl pirmosios daroma prielaida, kad sąlygos blogesnės nei normalios, antrosios – dėl nežinomų priežasčių), COV atitinkamai sumažėjo iki 26 % ir 23 %. Palmitino rūgščiai gautų „tinkamų“ verčių, kai skaidymas ne mažesnis kaip 60 %, dalis buvo 70 %, o polietilenglikoliui 400 – 83 %. Pagal DIC matavimus gautos biologinio skaidymo procentinės dalys buvo palyginti mažos, bet kintamos. Palmitino rūgščiai gautas intervalas buvo 0–35 %, vidutinė vertė 12 %, kai COV 92 %, o polietileneglikoliui 400 0–40 %, vidutinė vertė 24 %, kai COV 54 %.

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

13. Reikalinga įprasta laboratorinė įranga ir:

a. inkubatorius, kuris nekibirkščiuoja ir kurio reguliuojama temperatūra yra 35 °C ± 2 °C;

▼M6

b. reikiamo nominalaus tūrio slėginiai stikliniai bandymo indai ([1]), galintys išlaikyti maždaug 2 bar ir turintys orui sandarią membraną. Viršutinės erdvės tūris turėtų būti maždaug nuo 10 % iki 30 % viso tūrio. Jei biodujos išleidžiamos reguliariai, pakanka maždaug 10 % viršutinės erdvės tūrio, bet jei dujos išleidžiamos tik baigiant bandymą, reikiamas tūris turi būti 30 %. Kai slėgis mažinamas kiekvieną kartą imant ėminį, rekomenduojami stikliniai serumo buteliai, kurių nominalus tūris 125 ml, visas tūris maždaug 160 ml, užkimšti serumo membrana ([2]) ir užspausti aliuminio žiedais;

c. slėgmatis ([3]), pritaikytas susidariusių dujų slėgiui matuoti ir jas išleisti, pvz., rankinis precizinis slėgmatis, prijungtas prie tinkamos švirkšto adatos; dujoms sandarus trišakis vožtuvas palengvina perteklinio slėgio mažinimą (1 priedėlis). Būtina, kad slėgio keitlio, vamzdžių ir vožtuvo vidinis tūris būtų kuo mažesnis, kad paklaidos dėl įrangos tūrio nepaisymo būtų nereikšmingos;

Pastaba. Slėgio rodmenys tiesiogiai naudojami viršutinėje erdvėje susidariusios anglies kiekiui apskaičiuoti (nuo 42 iki 44 pastraipos). Arba, naudojant perskaičiavimo grafiką, slėgio rodmenis galima perskaičiuoti į susidariusių dujų tūrius (35 °C, atmosferos slėgis). Šis grafikas sudarytas pagal duomenis, gautus į grupę bandymo indų (pvz., serumo butelių) įpurškiant žinomus azoto dujų tūrius 35 ± 2 °C temperatūroje ir užrašant gautus stabilizuoto slėgio rodmenis (žr. 2 priedėlį). Skaičiavimas pateiktas 44 pastraipos pastaboje.

Įspėjimas. Būkite atsargūs – neįsidurkite mikrošvirkšto adata.

d. Anglies analizatorius, tinkamas tiesiogiai nustatyti neorganinę anglį nuo 1 mg/l iki 200 mg/l;

e. Didelio preciziškumo dujų ir skysčių ėminių švirkštai;

f. Magnetinės maišyklės ir magnetai (neprivaloma);

g. Apsauginė kamera su pirštinėmis (rekomenduojama).

Reagentai

14. Naudojami tik analiziškai gryni reagentai.

([1]) Rekomenduojamas tūris nuo 0,1 litro iki 1 litro.

([2]) Rekomenduojama naudoti dujoms sandarias polisiloksano membranas. Be to, rekomenduojama tikrinti gaubtelių sandarumą dujoms, ypač butilkaučiuko membranų, nes kelios komercinės membranos nėra pakankamai sandarios metano dujoms, o kai kurios membranos nustoja būti sandarios, kai bandymų sąlygomis jos praduriamos adata.

([3]) Įtaisas turėtų būti naudojamas ir reguliariais laiko tarpais kalibruojamas pagal gamintojo instrukcijas. Jei naudojamas nustatytos kokybės slėgmatis, pvz., sandarintas plienine membrana, laboratorijoje jo kalibruoti nereikia. Kalibravimo tikslumą galima patikrinti laboratorijoje, vieną slėgio vertę 1×10^5 Pa matuojant slėgmačio su mechaniniu indikatoriumi atžvilgiu. Kai ši vertė matuojama tiksliai, tiesiškumas taip pat išliks nepakitęs. Jei naudojami kiti matavimo įtaisai (be sertifikuoto gamintojo kalibravimo), rekomenduojama kalibruoti visą diapazoną reguliariais intervalais.

▼M6

Vanduo

15. Distiliuotas arba dejonizuotas vanduo (degazuotas prapučiant azoto dujas, turinčias mažiau kaip 5 µl/l deguonies), turintis mažiau kaip 2 mg/l ištirpusios organinės anglies (DOC).

Bandymo terpė

16. Ruošiama skiedimo terpė, kurią sudarytų šios sudedamosios dalys nurodytais kiekiais

Bevandenio kalio divandenilio fosfatas (KH_2PO_4)	0,27 g
Dinatrio vandenilio fosfato dodekahidratas ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$))	1,12 g
Amonio chloridas (NH_4Cl)	0,53 g
Kalcio chlorido dihidratas ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,075 g
Magnio chlorido heksahidratas ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,10 g
Geležies (II) chlorido tetrahidratas ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,02 g
Rezazurinas (deguonies indikatoriaus)	0,001 g
Natrio sulfido nonahidratas ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	0,10 g
Pradinis mikroelementų tirpalas (neprivalomas, 18 pastraipa)	10 ml
Skiedžiama degazuotu vandeniu (15 pastraipa)	iki 1 litro

Pastaba. Reikėtų naudoti tik ką gautą natrio sulfidą arba prieš naudojant jį reikėtų išplauti ir išdžiovinti, kad būtų užtikrinta pakankama redukcinė geba. Bandymą galima atlikti nenaudojant apsauginės kameros su pirštinėmis (žr. 26 pastraipą). Šiuo atveju terpės galutinė natrio sulfido koncentracija turėtų būti padidinta iki 0,20 g $Na_2S \cdot 9H_2O$ litrui. Natrio sulfidą taip pat galima įpilti per uždarytų bandymo indų membraną kaip atitinkamą pradinį anaerobinį natrio sulfido tirpalą, nes ši procedūra sumažins oksidacijos riziką. Natrio sulfidą galima pakeisti titano (III) citratu, kuris įpilamas per uždarytų bandymo indų membraną, kad būtų gauta nuo 0,8 iki 1,0 mmol/l galutinė koncentracija. Titano (III) citratas yra labai efektyvus ir mažai toksiškas redukavimo agentas, kuris ruošiamas taip: 2,94 g trinatrio citrato dihidrato ištirpinama 50 ml degazuoto vandens (kad būtų gautas 200 mmol/l tirpalas) ir įpilama 5 ml 15 % (m/V) titano (III) chlorido tirpalo. Neutralizuojama iki pH 7 ± 0,2 neorganiniu šarmu ir azoto srovėje supilama į tinkamą indą. Šio pradinio titano (III) citrato tirpalo koncentracija yra 164 mmol/l.

17. Bandymo terpės komponentai sumaišomi, išskyrus redukavimo agentą (natrio sulfidą ar titano citratą) ir prieš pat naudojant tirpalą per jį maždaug 20 min pučiamos azoto dujos deguoniui pašalinti. Tada įpilamas naujai paruošto redukavimo agento tirpalo reikiamas tūris (paruoštas degazuotame vandenyje) iš karto prieš naudojant terpę. Prireikus reguliuojama terpės pH vertė praskiestu neorganinės rūgšties ar šarmo tirpalu iki 7 ± 0,2.

▼M6

Pradinis mikroelementų tirpalas (neprivalomas)

18. Rekomenduojama bandymo terpėje turėti šių mikroelementų, kad pagerėtų anaerobinio skaidymo procesas, ypač, jei naudojama maža (pvz., 1 g/l) sėjinio koncentracija (11).

Mangano chlorido tetrahidratas ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50 mg
Boro rūgštis (H_3BO_3)	5 mg
Zinko chloridas ($ZnCl_2$)	5 mg
Vario (II) chloridas ($CuCl_2$)	3 mg
Dinatrio molibdato dihidratas ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	1 mg
Kobalto chlorido heksahidratas ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	100 mg
Nikelio chlorido heksahidratas($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	10 mg
Dinatrio selenitas (Na_2SeO_3)	5 mg
Skiedžiama degazuotu vandeniu (15 pastraipa)	iki 1 litro

Bandomoji cheminė medžiaga

19. Bandomoji medžiaga įdedama kaip pradinis tirpalas, suspensija, emulsija arba tiesiogiai kaip kieta medžiaga arba skystis, arba adsorbuota ant stiklo pluošto filtro, kad būtų gauta ne didesnė kaip 100 mg/l organinės anglies koncentracija. Jei naudojami pradiniai tirpalai, vandenyje (15 pastraipa) (iš kurio prieš tai pašalinamas deguonis, prapučiant azoto dujas) ruošiamas tokios koncentracijos tinkamas tirpalas, kad įpilamo tirpalo tūris būtų mažesnis kaip 5 % viso reakcijos mišinio tūrio. Prireikus reguliuojama terpės pH vertė iki 7 ± 0,2. Dėl bandomųjų cheminių medžiagų, kurios mažai tirpsta vandenyje, žr. ISO 10634 (13). Jei naudojamas tirpiklis, ruošiamas papildomas kontrolinis ėminys, kurį sudarytų tik tirpiklis apsėtoje terpėje. Reikėtų vengti naudoti organinius tirpiklius, kurie yra žinomi kaip metano susidarymo inhibitoriai, pvz., chloroformą ir anglies tetrachloridą.

Įspėjimas. Reikia atsargiai elgtis su toksinėmis ir nežinomų savybių bandomosiomis cheminėmis medžiagomis.

Etaloninės cheminės medžiagos

20. Procedūrai kontroliuoti sėkmingai naudojamos etaloninės cheminės medžiagos, pvz., natrio benzenkarboksilatas, fenolis ir polietilenglikolis 400, kurių skaidymas per 60 dienų yra didesnis kaip 60 %. Pasirinktos etaloninės cheminės medžiagos pradinis tirpalas (degazuotame vandenyje) ruošiamas taip pat, kaip bandomosios cheminės medžiagos tirpalas, ir prireikus nustatoma pH 7 ± 0,2 vertė.

Inhibavimo kontrolinis ėminys (jei reikia)

21. Norint gauti informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos toksiškumą anaerobiniams mikroorganizmams, kad būtų galima nustatyti tinkamiausią bandymo koncentraciją, į indą su bandymo terpe dedama bandymo koncentracijos bandomoji cheminė medžiaga ir etaloninė cheminė medžiaga (žr. 16 pastraipą) (žr. 19 ir 20 pastraipas, taip pat ISO 13641-1 (12)).

▼M6

Pūdytas dumblas

22. Pūdytas dumblas paimamas iš nuotekų valymo įrenginio pūdytuvo, daugiausia apdorojančio buitines nuotekas. Dumblas turėtų būti išsamiai apibūdintas ir pagrindinė informacija turėtų būti pateikta ataskaitoje (žr. 54 pastraipą). Jei numatoma naudoti pritaikytą sėjinį, galima naudoti pūdytą dumblą iš pramoninių nuotekų valymo įrenginio. Pūdytas dumblas imamas į plačiakaklius butelius, pagamintus iš didelio tankio polietileno arba panašios plėstis galinčios medžiagos. Dumblo pridedama iki maždaug 1 cm nuo butelio viršaus ir butelis sandariai uždaromas, pageidautina, apsauginiu vožtuvu. Atvežtas į laboratoriją surinktas dumblas gali būti naudojamas tiesiogiai arba dedamas į laboratorinį pūdytuvą. Perteklinės biodujos išleidžiamos atsargiai atidarant butelius su dumblu. Arba, kaip sėjinio šaltinį, galima naudoti laboratorijoje subrandintą anaerobinį dumblą, bet jo aktyvumo diapazonas gali būti mažesnis.

Įspėjimas. Iš pūdyto dumblo skiriasi degiosios dujos, kurios kelia gaisro ir sprogimo riziką; be to jame yra potencialiai patogeniškų organizmų, todėl, dirbant su dumblu, reikia imtis tinkamų apsauginių priemonių. Dėl saugos negalima dumblo rinkti į stiklinius indus.

23. Siekiant sumažinti foninę dujų gamybą ir tuščiųjų kontrolinių ėminių įtaką, galbūt reikėtų atlikti dumblo pradinį pūdymą. Jei reikia atlikti pradinį pūdymą, nepridedant jokių mitybinių medžiagų arba substratų, dumblas turėtų būti paliekamas pūti 35 °C ± 2 °C temperatūroje iki 7 dienų. Nustatyta, kad maždaug po 5 dienų pradinio pūdymo, paprastai optimaliai sumažėja tuščiojo ėminio dujų gamyba, bet nepriimtinai nepailgėja bandomojo tarpsnio vėlavimo arba inkubavimo laikotarpiai ar nemažėja aktyvumas mažo bandytų cheminių medžiagų skaičiaus atžvilgiu.

24. Jei bandomųjų cheminių medžiagų biologinis skaidumas yra arba manoma, kad gali būti mažas, sprendžiama dėl pradinės dumblo ekspozicijos bandomąja chemine medžiaga, kad būtų gautas geriau pritaikytas sėjinys. Tokiu atveju bandomoji cheminė medžiaga, kurios organinės anglies koncentracija yra nuo 5 mg/l iki 20 mg/l, dedama į pūdytą dumblą ir inkubuojama iki 2 savaičių. Prieš naudojant dumblą po pradinės ekspozicijos, jis gerai išplaunamas (žr. 25 pastraipą), o bandymo ataskaitoje nurodomos pradinės ekspozicijos sąlygos.

Sėjinys

25. Prieš pat naudojant dumblas plaunamas (žr. nuo 22 iki 24 pastraipas), kad IC koncentracija galutinėje bandymo suspensijoje sumažėtų iki mažiau kaip 10 mg/l. Dumblas centrifuguojamas užkimštuose mėgintuvėliuose (pvz., 3 000 *g*, trukmė 5 min) ir tirpalas virš nuosėdų išpilamas. Gaunama centrifugavimo nuosėdų suspensija degazuotoje terpėje (16 ir17 pastraipos), suspensija pakartotinai centrifuguojama ir tirpalas virš nuosėdų išpilamas. Jei IC sumažėjo nepakankamai, dumblo plovimo procedūra galėtų būti pakartota ne daugiau kaip du kartus. Neatrodo, kad tai galėtų neigiamai veikti mikroorganizmus. Pagaliau centrifugavimo nuosėdos suspenduojamos reikiamame bandymo terpės tūryje ir nustatoma suminė kietųjų medžiagų koncentracija [pvz., ISO 11923 (15)]. Galutinė suminė kietųjų medžiagų koncentracija bandymo induose turėtų būti nuo 1 g/l iki 3 g/l (arba maždaug 10 % nepraskiesto pūdyto dumblo kietųjų medžiagų koncentracijos). Pirmiau nurodyti veiksmai atliekami taip, kad dumblo sąlytis su deguonimi būtų kuo mažesnis (pvz, naudojama azoto atmosfera).

▼M6

BANDYMO PROCEDŪRA

26. Atliekamos šios pradinės procedūros, taikant metodus, kurie užtikrintų kuo mažesnį pūdyto dumblo ir deguonies sąlytį, pvz., gali tekti dirbti apsauginės kameros su pirštinėmis viduje azoto dujų atmosferoje ir (arba) prapūsti butelius azotu (4).

Bandomųjų ir kontrolinių ėminių ruošimas

27. Ruošiami ne mažiau kaip trys bandomosios cheminės medžiagos, tuščiųjų kontrolinių ėminių, etaloninės cheminės medžiagos, inhibavimo kontrolinių ėminių (jei reikia) bandymo indai (žr. 13-b pastraipą) ir slėgio kontrolės kameros (neprivaloma procedūra) (žr. 7 ir nuo 19 iki 21 pastraipas). Taip pat galima paruošti papildomus indus, norint įvertinti pradinį biologinį skaidymą, taikant specifinius bandomosios cheminės medžiagos analizės metodus. Vieną tuščiųjų kontrolinių ėminių rinkinį galima panaudoti kelioms bandomosioms cheminėms medžiagoms atliekant tą patį bandymą, jei atitinka viršutinės erdvės tūriai.

28. Ruošiamas praskiestas sėjinys ir įpilamas į indus, pvz., naudojant pipetę plačia anga. Gerai sumaišyto sėjinio alikvotinės dalys (25 pastraipa) įpilamos taip, kad suminė kietųjų medžiagų koncentracija būtų vienoda visuose induose (nuo 1 g/l iki 3 g/l). Įpilami bandomosios ir etaloninės cheminių medžiagų pradiniai tirpalai, prieš tai nustačius pH 7 ± 0,2, jei būtina. Bandomoji ir etaloninė cheminė medžiaga įdedamos tinkamiausiu naudojimo būdu (19 pastraipa).

29. Organinės anglies bandymo koncentracija paprastai turėtų būti nuo 20 mg/l iki 100 mg/l (4 pastraipa). Jei bandomoji cheminė medžiaga yra toksinė, bandymo koncentraciją reikėtų sumažinti iki 20 mg C/l arba iki dar mažesnės koncentracijos, jei reikia išmatuoti tik pradinį biologinį skaidymą, taikant specifinę analizę. Reikėtų pastebėti, kad bandymo rezultatų kintamumas didėja mažėjant bandymo koncentracijai.

30. Į indus su tuščiaisiais ėminiais vietoje pradinio tirpalo, suspensijos arba emulsijos įpilamas ekvivalentinis nešiklio kiekis, naudojamas bandomajai medžiagai dozuoti. Jei bandomoji cheminė medžiaga buvo įdedama naudojant stiklo pluošto filtrus arba organinius tirpiklius, į tuščiąjį ėminį įdedamas filtras arba ekvivalentinis tūris tirpiklio, kuris buvo išgarintas. Paruošiamas papildomas kartotinis bandinys su bandomąja chemine medžiaga pH vertei matuoti. Prireikus reguliuojama pH vertė iki 7 ± 0,2, nedideliais praskiesto neorganinės rūgšties ar šarmo tirpalo kiekiais. Į visus bandymo indus turėtų būti įpiltas toks pats neutralizavimo agentų kiekis. Šių tirpalų neturėtų prireikti įpilti, nes bandomosios cheminės medžiagos ir etaloninės cheminės medžiagos pradinių tirpalų pH vertė vieną kartą jau buvo nustatyta (žr. 19 ir 20 pastraipas). Jei reikia matuoti pradinį biologinį skaidymą, tinkamą ėminį reikėtų imti iš pH kontrolės indo arba iš papildomo bandymo indo ir bandomosios cheminės medžiagos koncentracija turėtų būti išmatuota taikant specifinę analizę. Į visus indus galima įdėti aptrauktus magnetus, jei reakcijos mišinius reikia maišyti (neprivaloma).

31. Būtina užtikrinti, kad suminis skysčio tūris V_1 ir viršutinės erdvės tūris V_h būtų vienodi visuose induose; V_1 ir V_h vertės įsimenamos ir užrašomos. Visus indus reikėtų uždaryti dujoms imti skirta membrana ir pernešti iš apsauginės kameros su pirštinėmis (žr. 26 pastraipą) į inkubatorių (žr. 13-a pastraipą).

▼M6

Netirpios bandomosios cheminės medžiagos

32. Vandenyje mažai tirpių cheminių medžiagų pasverti kiekiai dedami tiesiogiai į paruoštus indus. Kai būtinas tirpiklis (žr. 19 pastraipą), bandomosios cheminės medžiagos tirpalas ar suspensija pilami į tuščius indus. Jei įmanoma, tirpiklis išgarinamas, į indus pučiant azoto dujas, ir tada pridedami kiti komponentai, t. y. praskiestas dumblas (25 pastraipa) ir degazuotas vanduo, jei reikia. Taip pat turi būti paruoštas papildomas tirpiklio kontrolinis ėminys (žr. 19 pastraipą). Kitų netirpių medžiagų pridėjimo būdų galima paieškoti ISO 10634 (13). Skystas bandomąsias chemines medžiagas galima įšvirkšti į visiškai paruoštus uždarytus indus, jei manoma, kad pradinė pH vertė nėra didesnė kaip 7 ± 1, priešingu atveju dozuojama, kaip aprašyta pirmiau (žr. 19 pastraipą).

Inkubavimas ir dujų slėgio matavimas

33. Paruošti indai inkubuojami 35 °C ± 2 °C temperatūroje maždaug 1 h, kad nusistovėtų pusiausvyra ir į atmosferą būtų išleistos perteklinės dujos, pvz., iš eilės kratomas kiekvienas indas, per membraną įstatoma slėgmačio adata (13-c pastraipa) ir vožtuvas laikomas atidarytu tol, kol slėgmatis rodo nulį. Jei šioje stadijoje ar atliekant tarpinius matavimus viršutinės erdvės slėgis yra mažesnis nei atmosferos, reikėtų pripūsti azoto dujų, kad būtų atstatytas atmosferos slėgis. Vožtuvas uždaromas (žr. 13-c pastraipą) ir inkubavimas tamsoje tęsiamas užtikrinant, kad visos indų dalys būtų pūdymo temperatūros. Indai apžiūrimi po inkubavimo nuo 24 iki 48h. Indai atmetami, jei skysčio virš nuosėdų spalva yra ryškiai rausva, t. y. jei rezazurinas (žr. 16 pastraipą) pakeitė spalvą, rodydamas deguonies buvimą (žr. 50 pastraipą). Nors nedideli deguonies kiekiai sistemai gali nepakenkti, didesnė jo koncentracija gali sukelti stiprų anaerobinio biologinio skaidymo inhibavimą. Atsitiktinio atskiro trijų ėminių rinkinio indo atmetimas gali būti priimtinas, bet esant didesniam nei šis trikčių skaičiui bandymo procedūros turi būti ištirtos ir bandymas pakartotas.

34. Kiekvieno indo turinys atsargiai maišomas kelias minutes plakant arba purtant mažiausiai nuo 2 iki 3 kartų per savaitę ir prieš pat slėgio matavimą. Purtant sėjinys vėl suspenduojamas ir užtikrinama dujų pusiausvyra. Visi slėgio matavimai turėtų būti atliekami greitai, nes gali sumažėti bandymo indų temperatūra ir būtų gauti klaidingi rodmenys. Matuojant slėgį, viso bandymo indo, įskaitant viršutinę erdvę, temperatūra turėtų būti pūdymo temperatūros. Dujų slėgis matuojamas, pvz., įstatant per membraną švirkšto adatą (13-c pastraipa), prijungtą prie slėgio matuoklio. Reikėtų imtis atsargumo priemonių, kad vanduo nepatektų į švirkšto adatą; jei taip atsitinka, šlapias dalis reikėtų išdžiovinti ir įstatyti naują adatą. Slėgį reikėtų matuoti milibarais (žr. 42 pastraipą). Dujų slėgį induose galima matuoti periodiškai, pvz., kas savaitę, ir perteklines dujas galima išleisti į atmosferą. Arba slėgis matuojamas tik bandymo pabaigoje, kad būtų nustatytas gautų dujų kiekis.

35. Rekomenduojama gauti tarpinius dujų slėgio rodmenis, nes slėgio didėjimas suteikia informacijos apie tai, kada bandymą galima baigti, ir sudaro sąlygas stebėti kinetiką (žr. 6 pastraipą).

▼M6

36. Paprastai bandymas baigiamas po 60 dienų inkubavimo laikotarpio, išskyrus atvejus, kai matuojant slėgį gauta biologinio skaidymo kreivė pasiekia pastoviosios būsenos tarpsnį anksčiau; tai yra tarpsnis, kuriame pasiekiamas maksimalus skaidymas ir biologinio skaidymo kreivė išsilygina. Jei pastoviosios būsenos vertė yra mažesnė kaip 60 %, aiškinimas yra problemiškas, nes tai rodo, kad mineralizuota tik dalis molekulės arba yra padaryta klaida. Jei įprastinio inkubavimo laikotarpio pabaigoje dujos vis dar susidaro, bet pastoviosios būsenos tarpsnis akivaizdžiai nepasiektas, reikėtų spręsti apie bandymo pratęsimą, kad būtų galima patikrinti, ar bus pasiekta plokščioji sritis (> 60 %).

Neorganinės anglies matavimas

37. Po paskutinio dujų slėgio matavimo bandymo pabaigoje dumblas paliekamas nusėsti. Iš eilės atidaromi visi indai ir nedelsiant imamas ėminys neorganinės anglies (IC) koncentracijai (mg/l) skystyje virš nuosėdų nustatyti. Skysčio virš nuosėdų nereikėtų nei centrifuguoti, nei filtruoti, nes būtų nepriimtini ištirpusio anglies dioksido nuostoliai. Jei skysčio negalima analizuoti paėmus ėminį, jį, atvėsintą iki maždaug 4 °C, galima laikyti iki 2 dienų uždarytame buteliuke, kuriame nėra viršutinės erdvės. Išmatavus IC, matuojama ir užrašoma pH vertė.

38. IC skystyje virš nuosėdų taip pat galima nustatyti netiesiogiai, ištirpusią IC išskiriant kaip anglies dioksidą, kurį galima išmatuoti viršutinėje erdvėje. Po paskutinio dujų slėgio matavimo kiekviename iš bandymo indų nustatomas atmosferos slėgis. Kiekvieno indo turinys parūgštinamas iki maždaug pH 1, per uždarytų indų membraną įpilant koncentruotos neorganinės rūgšties (pvz., H_2SO_4). Purtomi indai inkubuojami 35 °C ± 2 °C temperatūroje maždaug 24 h ir slėgmačiu matuojamas dujų slėgio dėl išsiskyrusio anglies dioksido rodmuo.

39. Gaunami atitinkamo tuščiojo ėminio, pamatinės cheminės medžiagos ir, jei įtraukti, inhibavimo kontrolinio ėminio indų rodmenys (žr. 21 pastraipą).

40. Kartais, ypač, jei tie patys kontrolinių ėminių indai naudojami kelioms bandomosioms cheminėms medžiagoms, reikėtų spręsti klausimą dėl tarpinių IC koncentracijos verčių matavimo bandymo ir kontroliniuose induose, jei tinka. Šiuo atveju visiems tarpiniams matavimams reikėtų paruošti pakankamą skaičių indų. Ši procedūra labiau priimtina palyginti su visų ėminių ėmimu tik iš vieno indo. Imti iš vieno indo galima tik tuo atveju, jei nelaikoma, kad reikiamas tūris DIC analizei atlikti yra per didelis. DIC reikėtų matuoti po dujų slėgio matavimo neišleidžiant perteklinių dujų, kaip aprašyta toliau:

— neatidarant indų, kiek įmanoma mažesni skysčio virš nuosėdų ėminiai imami švirkštu per membraną ir ėminyje nustatoma IC;

— paėmus ėminį, perteklinės dujos išleidžiamos arba neišleidžiamos;

— reikėtų atsižvelgti į tai, kad net dėl mažo skysčio virš nuosėdų tūrio sumažėjimo (pvz., apie 1 %) gali gerokai padidėti viršutinės erdvės dujų tūris (V_h);

— daroma lygčių (žr. 44 pastraipą) pataisa, jei reikia padidinant 3 lygties V_h.

▼M6

Specifinė analizė

41. Jei turi būti nustatytas pradinis anaerobinis skaidymas (žr. 30 pastraipą), iš indų su bandomąja chemine medžiaga bandymo pradžioje ir pabaigoje imamas reikiamas ėminio tūris specifinei analizei atlikti. Jei tai daroma, reikia pastebėti, kad pakis viršutinės erdvės (V_h) ir skysčio (V_l) tūriai, ir į tai turi būti atsižvelgta skaičiuojant dujų susidarymo rezultatus. Specifinės analizės ėminius taip pat galima imti iš papildomų mišinių, iš anksto paruoštų šiam tikslui (30 pastraipa).

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

42. Dėl praktinių priežasčių dujų slėgis matuojamas milibarais (1 mbar = 1h Pa = 10^2 Pa; 1 Pa = 1 N/m^2), tūris – litrais, o temperatūra –Celsijaus laipsniais.

Anglies kiekis viršutinėje erdvėje

43. Kadangi 1 mol metano ir 1 mol anglies dioksido turi po 12 g anglies, anglies masė tam tikrame išsiskyrusių dujų tūryje gali būti išreikšta taip:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad [1] \text{ lygtis}$$

čia:

m – anglies masė (mg) tam tikrame išsiskyrusių dujų tūryje;

12 – santykinė atominė anglies masė;

n – dujų molių skaičius tam tikrame tūryje.

Jei be metano ar anglies dioksido susidaro dideli kiekiai kitų dujų (pvz., N_2O), [1] formulę reikėtų pataisyti, kad būtų aprašytas galimas susidariusių dujų poveikis.

44. Pagal dujų dėsnius n galima išreikšti taip:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad [2] \text{ lygtis}$$

čia:

p – dujų slėgis (Paskaliais);

V – dujų tūris (m^3);

R – molinė dujų konstanta [8,314J/(mol K)];

T – inkubavimo temperatūra (Kelvinais).

Sujungiant [1] ir [2] lygtis ir atsižvelgiant į dujų susidarymą tuščiajame kontroliniame ėminyje, gaunama:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0,1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad [3] \text{ lygtis}$$

čia:

m_h – anglies, susidariusios kaip dujos viršutinėje erdvėje, neto masė (mg);

Dp – skirtumo tarp pradinio ir galutinio slėgio bandymo induose vidutinės vertės ir atitinkamos tuščiųjų ėminių vidutinės vertės skirtumas (milibarais);

▼M6

V_h – bandymo indo viršutinės erdvės tūris (l);

0,1 – niutonų/m^2 į milibarus ir m^3 į litrus perskaičiavimo faktorius.

[4] lygtį reikėtų naudoti esant įprastinei inkubavimo 35 °C (308 K) temperatūrai:

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot V_h) \qquad \text{[4] lygtis}$$

Pastaba: alternatyvus tūrio skaičiavimas. Slėgmačio rodmenys perskaičiuojami į susidariusių dujų ml pagal standartinę kreivę, gautą slėgmačio rodmenis pateikiant kaip įpurkštų dujų tūrio (ml) funkciją (2 priedėlis). Dujų molių skaičius (n) kiekvieno indo viršutinėje erdvėje apskaičiuojamas sumin pagamintų dujų tūrį (ml) dalijant iš 25 286 ml/mol, vieno dujų molio užimamo tūrio 35 °C temperatūroje ir esant standartiniam atmosferos slėgiui. Kadangi 1 mol metano ir 1 mol anglies dioksido turi po 12 g anglies, anglies masė (mg) viršutinėje erdvėje (m_h) gaunama pagal [5] lygtį:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{[5] lygtis}$$

Atsižvelgiant į dujų susidarymą tuščiajame kontroliniame ėminyje, gaunama:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0,475\Delta V \qquad \text{[6] lygtis}$$

čia:

m_h – anglies, susidariusios kaip dujos viršutinėje erdvėje, neto masė (mg);

DV – skirtumo tarp dujų, susidariusių bandymo indų ir tuščiojo kontrolinio bandinio indų viršutinėje erdvėje, tūrio vidutinė vertė;

25 286 – tūris, kurį užima 1 molis dujų, esant 35 °C ir 1 atmosferos slėgiui.

45. Biologinio skaidymo eigą galima stebėti suminį slėgio padidėjimą Dp (milibarais) pateikiant kaip laiko funkciją, jei tinka. Iš šios kreivės identifikuojamas ir užrašomas eksponentinis tarpsnis (dienos). Eksponentinis tarpsnis yra laikas nuo bandymo pradžios iki reikšmingo skaidymo pradžios (pvz., žr. 3 priedėlį). Jei buvo imami ir analizuojami tarpiniai skysčio virš nuosėdų ėminiai (žr. 40, 46 ir 47 pastraipas), vietoje vien tik suminio slėgio grafike gali būti pateiktas suminis susidariusios C kiekis (dujose ir skystyje).

Skystyje esanti anglis

46. Į metano kiekį skystyje neatsižvelgiama, nes žinoma, kad jo tirpumas vandenyje yra labai mažas. Bandymo indų skysčio neorganinės anglies masė apskaičiuojama pagal [7] lygtį:

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad \text{[7] lygtis}$$

čia:

m_l – skysčio neorganinės anglies masė (mg);

C_{net} – neorganinės anglies koncentracija bandymo induose, atėmus jos koncentraciją kontroliniuose induose bandymo pabaigoje (mg/l);

V_l – skysčio inde tūris (l).

▼M6

Suminis anglies dujų pavidalu kiekis

47. Suminė anglies dujų pavidalu masė inde apskaičiuojama pagal [8] lygtį:

$$m_t = m_h + m_l \qquad \text{[8] lygtis}$$

čia:

m_t – anglies dujų pavidalu suminė masė (mg);

m_h ir m_l yra apibrėžtos pirmiau.

Bandomosios cheminės medžiagos anglis

48. Bandomosios cheminės medžiagos masė bandymo induose apskaičiuojama pagal [9] lygtį:

$$m_v = C_c \times V_l \qquad \text{[9] lygtis}$$

čia:

m_v – bandomosios cheminės medžiagos anglies masė (mg);

C_c – bandomosios cheminės medžiagos anglies koncentracija bandymo inde (mg/l)

V_l – skysčio bandymo inde tūris (l).

Biologinio skaidymo laipsnis

49. Biologinio skaidymo procentinė dalis pagal viršutinės erdvės dujas apskaičiuojama taikant [10] lygtį, o biologinio skaidymo suminė procentinė dalis – taikant [11] lygtį:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \qquad \text{[10] lygtis}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \qquad \text{[11] lygtis}$$

čia:

D_h – biologinis skaidymas pagal viršutinės erdvės dujas (%);

D_t – suminis biologinis skaidymas (%);

m_h, m_v ir m_t yra apibrėžtos pirmiau.

Pradinio biologinio skaidymo laipsnis apskaičiuojamas pagal bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos matavimus (neprivaloma) inkubavimo pradžioje ir pabaigoje, taikant [12] lygtį:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \qquad \text{[12] lygtis}$$

čia:

D_p – bandomosios cheminės medžiagos pradinis skaidymas (%);

S_i – pradinė bandomosios cheminės medžiagos koncentracija (mg/l);

S_e – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija pabaigoje (mg/l).

Jei analizės metodas rodo didelę bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją neapdorotame anaerobinio dumblo sėjinyje, taikoma [13] lygtis:

▼M6

$$D_p^1 = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_i - S_{ib})] \times 100 \quad [13] \text{ lygtis}$$

čia:

D_p^1 – bandomosios cheminės medžiagos pataisytoji pradinio skaidymo vertė (%);

S_{ib} – pradinė „tariamoji“ bandomosios cheminės medžiagos koncentracija tuščiuose kontroliniuose ėminiuose (mg/l);

S_{eb} – „tariamoji“ bandomosios cheminės medžiagos koncentracija tuščiuose kontroliniuose bandiniuose bandymo pabaigoje (mg/l).

Rezultatų tinkamumas

50. Turėtų būti naudojami tik indų, kurie nenusidažo rausva spalva, slėgio rodmenys (žr. 33 pastraipą). Užteršimas deguonimi kiek įmanoma sumažinamas taikant tinkamus anaerobinio apdorojimo būdus.

51. Reikėtų laikyti, kad bandymas tinkamas, jei etaloninė cheminė medžiaga pasiekia pastoviąją būseną, kuri atitinka didesnį kaip 60 % biologinį skaidymą ([1]).

52. Jei bandymo pabaigoje pH vertė nepatenka į 7 ± 1 intervalą ir biologinis skaidymas vyko nepakankamai, bandymas kartojamas, naudojant didesnės buferinės talpos terpę.

Skaidymo inhibavimas

53. Susidariusių dujų kiekis induose su bandomąja chemine medžiaga ir etalonine chemine medžiaga turėtų būti bent lygus jų kiekiui induose tik su etalonine chemine medžiaga, nes kitaip reikštų, kad vyksta dujų gamybos inhibavimas. Kai kuriais atvejais dujų gamyba induose su bandomąja chemine medžiaga be etaloninės cheminės medžiagos bus mažesnė, palyginti su tuščiaisiais kontroliniais ėminiais, ir tai reiškia, kad bandomoji cheminė medžiaga yra inhibitorius.

Bandymo ataskaita

54. Bandymo ataskaitoje turi būti ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

— bendrinis pavadinimas, cheminis pavadinimas, CAS numeris, struktūrinė formulė ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės;

— bandomosios cheminės medžiagos grynumas (priemaišos).

Bandymų sąlygos:

— praskiesto pūdytuvo skysčio tūriai (V_l) ir bandymo indo viršutinės erdvės tūris (V_h);

— bandymo indų aprašymas, pagrindinės biodujų matavimo (pvz., slėgmačio tipas) ir IC analizatoriaus charakteristikos;

— bandomosios cheminės medžiagos ir etaloninės cheminės medžiagos įterpimas į bandymo sistemą: naudota bandymo koncentracija ir tirpiklių naudojimas;

— naudojamo sėjinio duomenys: nuotekų valymo įrenginio pavadinimas, apdorotų nuotėkų šaltinio aprašymas (pvz., darbinė temperatūra, dumblo išbuvimo trukmė, daugiausia buitinės atliekos ir kt.), koncentracija, visa informacija, skirta šiems duomenims pagrįsti, ir informacija apie sėjinio pradinį apdorojimą (pvz., pradinis pūdymas, pradinė ekspozicija);

— inkubavimo temperatūra;

— kartotinių bandinių skaičius.

([1]) Tai reikėtų įvertinti pakartotinai, jei yra įtrauktos adsorbuojančios ir netirpios etaloninės cheminės medžiagos.

▼M6

Rezultatai:

— pH ir IC vertės bandymo pabaigoje;

— bandomosios cheminės medžiagos koncentracija bandymo pradžioje ir pabaigoje, jei buvo atliekamas specifinis matavimas;

— visi matavimo duomenys, gauti tuščiojo ėminio, etaloninės cheminės medžiagos ir inhibavimo kontrolinio ėminio indams, jei tinka (pvz., slėgis milibarais, neorganinės anglies koncentracija (mg/l)) lentelės pavidalu (viršutinės erdvės ir skysčio matavimo duomenis reikėtų pateikti atskirai);

— statistinis duomenų apdorojimas, bandymo trukmė ir bandomosios cheminės medžiagos, etaloninės cheminės medžiagos ir slopinimo kontrolinio bandinio biologinio skaidymo grafikas;

— bandomosios cheminės medžiagos ir etaloninės cheminės medžiagos biologinio skaidymo procentinė dalis;

— bandymo rezultatų atmetimo priežastys;

— rezultatų aptarimas.

NUORODOS

(1) Šio priedo skyriai:

C.4 Lengvo biologinio skaidumo nustatymas;

C.9 Biologinis skaidymas. Zahn-Wellen bandymas;

C.10 Modeliavimo bandymas. Aerobinis nuotekų apdorojimas.

A. Aktyviojo dumblo aeratoriai, B. Biologinės plėvelės

C.11, Biologinis skaidymas. Aktyviojo dumblo kvėpavimo inhibavimas

(2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Paris

(3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga,U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550. (Also published as ECETOC Technical Report No. 28, June 1988).

(4) Shelton D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Environ. Mircobiology, 47, 850-857.

(5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. and McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Res. 13, 485-492.

(6) Healy, J.B.Jr. and Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. Appl. Environ. Microbiol. 38, 84-89.

(7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.

(8) Battersby, N.S. and Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. Chemosphere, 17, 2441-2460.

(9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.

▼M6

(10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.

(11) International Organization for Standardization (1995) ISO 11 734 Water Quality – Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge – Method by measurement of the biogas production.

(12) International Organization for Standardization (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1 General Test.

(13) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

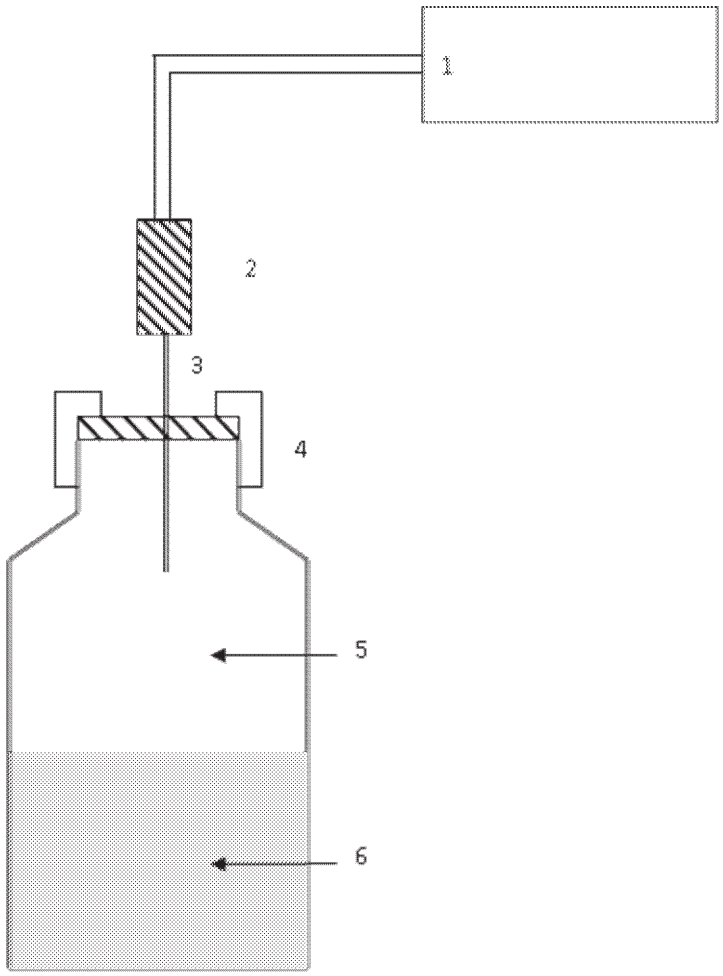
(14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, 1499-1509.

(15) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

1 priedėlis

Biodujų gamybos matavimo pagal dujų slėgį aparato pavyzdys



Paaiškinimas:

1 – slėgmatis;

2 – dujoms sandarus trišakis vožtuvas;

3 – švirkšto adata;

4 – dujoms sandarus kamštis (užspaustas gaubtelis ir membrana);

5 – viršutinė erdvė (V_h);

6 – pūdyto dumblo sėjinys (V_l).

Bandymo indų aplinkos temperatūra 35 °C ± 2 °C

▼M6

2 priedėlis

Slėgmačio rodmenų perskaičiavimas

Slėgmačio rodmenis galima susieti su dujų tūriais taikant standartinę kreivę, gautą įpurškiant žinomus oro tūrius 35 °C ± 2 °C temperatūroje į serumo butelius su vandeniu, kurio tūris yra lygus reakcijos mišinio tūriui V_R:

— Vandens, laikomo 35 °C ± 2 °C temperatūroje, V_R ml alikvotinės dalys įpilamos į penkis serumo butelius. Buteliai užkemšami ir statomi 1 h į vandens vonią 35 °C temperatūroje pusiausvyrai nusistovėti;

— Įjungiamas slėgmatis, paliekamas stabilizuotis ir nustatomas ties nuliu;

— Per vieno iš butelių kamštį įstatoma švirkšto adata, vožtuvas atidaromas tol, kol slėgmatis rodo nulį, ir vėl uždaromas;

— Procedūra kartojama su likusiais buteliais;

— Į kiekvieną butelį įpurškiama po 1 ml oro esant 35 °C ± 2 °C temperatūrai. Adata (slėgmačio) įstatoma per vieno iš butelių kamštį ir palaukiama slėgio rodmens nusistovėjimo. Slėgio rodmuo užrašomas, vožtuvas atidaromas tol, kol slėgmatis rodo nulį, ir vėl uždaromas;

— Procedūra kartojama su likusiais buteliais;

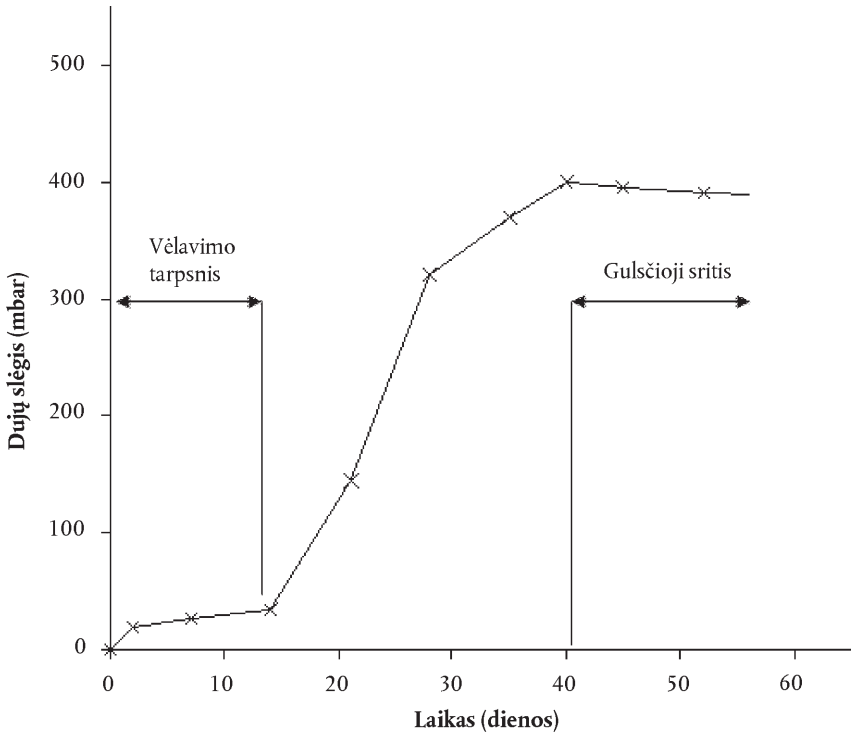
— Visa pirmiau nurodyta procedūra kartojama įpurškiant 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml ir 50 ml oro;

— Brėžiama slėgio (Pa), kaip įpurkšto oro tūrio Vb (ml) funkcijos perskaičiavimo kreivė. Prietaiso atsakas yra tiesinis nuo 0 Pa iki 70 000 Pa ir nuo 0 ml iki 50 ml gautų dujų tūrio intervale.

▼M6

3 priedėlis

Skaidymo kreivės pavyzdys (suminis neto slėgio padidėjimas)



▼M6

4 priedėlis

Anaerobinio biologinio skaidymo specifikacijų pavyzdys. Bandomosios cheminės medžiagos specifikacija

Laboratorija: ..... Bandomoji cheminė medžiaga: ..... Bandymas nr.: .....

Bandymo temperatūra:(°C): ..... Viršutinės erdvės tūris (V_h): ..... (l) Skysčio tūris (V_l): ..... (l)

Bandomosios cheminės medžiagos anglis $C_{c,v}$: ..... (mg/l) m_v ([1]): ..... (mg)

Diena	p_1 (bandomoji) (mbar)	p_2 (bandomoji) (mbar)	p_3 (bandomoji) (mbar)	p (bandomoji) vidurkis (mbar)	p_4 (tuščiasis) (mbar)	p_5 (tuščiasis) (mbar)	p_6 (tuščiasis) (mbar)	p (tuščiasis) vidurkis (mbar)	p (neto) bandomoji – tuščiasis vidurkis (mbar)	Dp (neto) Suminis (mbar)	m_h viršutinė erdvė C ([2]) (mg)	D_h Biologinis skaidymas ([3]) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ bandomoji (mg)	$C_{IC,\ 2}$ bandomoji (mg)	$C_{IC,\ 3}$ bandomoji (mg)	C_{IC} bandomosios vidurkis (mg)	$C_{IC,\ 4}$ tuščiasis (mg)	$C_{IC,\ 5}$ tuščiasis (mg)	$C_{IC,\ 6}$ tuščiasis (mg)	C_{IC} tuščiojo vidurkis (mg)	$C_{IC,\ net}$ bandomoji – tuščiasis vidurkis (mg)	m_l skystyje esanti C ([4]) (mg)	m_t suminė C ([5]) (mg)	D_t Biologinis skaidymas ([6]) (%)
IC (pabaiga)												
pH (pabaiga)												

([1]) Anglis bandymo inde, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

([2]) Viršutinės erdvės anglis m_h (mg) įprastinėje inkubavimo temperatūroje (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$

([3]) Biologinis skaidymas, apskaičiuotas pagal viršutinės erdvės dujas D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

([4]) Skystyje esanti anglis m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$

([5]) Suminė anglis dujų pavidalu, mt (mg): $m_t + m_l$

([6]) Suminis biologinis skaidymas, D_t (%): $D_t = (mt \times 100) / m_v$

02008R0440 — LT — 18.05.2017 — 007.001 — 1991

▼M6

Laboratorija : ..... Etaloninė cheminė medžiaga: ..... Bandymo nr.: .....

Bandymo temperatūra:(°C): ..... Viršutinės erdvės tūris (V_h): ..... (l) Skysčio tūris (V_l) (litrais): .....

Etaloninės cheminės medžiagos anglis $C_{c,v}$ (mg/l): ..... m_v ([1]) (mg):

Diena	p_1 (etal.) (mbar)	p_2 (etal.) (mbar)	p_3 (etal.) (mbar)	p (etal.) vidurkis (mbar)	p_4 (inhib.) (mbar)	p_5 (inhib.) (mbar)	p_6 (inhib.) (mbar)	p (inhib.) vidurkis (mbar)	p (etal.) etal. – tuščiasis (mbar)	Dp (etal.) suminis (mbar)	m_h viršutinė erdvė C ([2]) (mg)	D_h Biologinis skaidymas ([3]) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ etal. (mg)	$C_{IC,\ 2}$ etal. (mg)	$C_{IC,\ 3}$ etal. (mg)	C_{IC} etal. vidurkis (mg)	$C_{IC,\ 4}$ inhib. (mg)	$C_{IC,\ 5}$ inhib. (mg)	$C_{IC,\ 6}$ inhib. (mg)	C_{IC} inhib. vidurkis (mg)	$C_{IC,\ net}$ etal. – inhib. (mg)	m_l skystyje esanti anglis ([4]) (mg)	m_t suminė C ([5]) (mg)	D_t Biologinis skaidymas ([6]) (%)
IC (pabaiga)												
pH (pabaiga)												

([1]) Anglis bandymo inde, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$
([2]) Viršutinės erdvės anglis m_h (mg) įprastinėje inkubavimo temperatūroje (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$
([3]) Biologinis skaidymas, apskaičiuotas pagal viršutinės erdvės dujas D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$
([4]) Skystyje esanti anglis m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$
([5]) Suminė anglis dujų pavidalu, mt (mg): mt + m_l
([6]) Suminis biologinis skaidymas, Dt (%): Dt = (mt × 100) / m_v

02008R0440 — LT — 18.05.2017 — 007.001 — 1992

▼M6

C.44. IŠPLOVIMAS IŠ DIRVOŽEMIO KOLONĖLIŲ

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) Nr. 312 (2004). Sintetinės cheminės medžiagos gali patekti į dirvą tiesiogiai jas specialiai įterpiant (pvz., žemės ūkyje naudojamos cheminės medžiagos) arba netiesioginiu būdu (pvz., nuotekos → nuotekų dumblas → dirvožemis arba oras → šlapios arba sausos nuosėdos). Vertinant šių cheminių medžiagų riziką, svarbu įvertinti jų virsmo dirvožemyje ir judėjimo (išsiplovimo) į gilesnius dirvožemio sluoksnius ir galiausiai į gruntinį vandenį potencialą.

2. Yra keli cheminių medžiagų išplovimo į dirvožemį potencialo matavimo kontroliuojamomis laboratorijos sąlygomis metodai, t. y. dirvožemio plonasluoksnė chromatografija, dirvožemio storasluoksnė chromatografija, dirvožemio kolonėlinė chromatografija ir adsorbcijos-desorbcijos matavimai (1)(2). Nejoninių cheminių medžiagų adsorbcijos ir išplovimo potencialo pradinis įvertis yra n-oktanolio ir vandens pasiskirstymo koeficientas (P_{ow}) (3)(4)(5).

3. Šiame dokumente aprašytas bandymo metodas yra pagrįstas pažeistos struktūros dirvožemio (apibrėžtis pateikta 1 priedėlyje) kolonėline chromatografija. Atliekami dviejų tipų bandymai, kad būtų nustatytas (i) bandomosios cheminės medžiagos išplovimo potencialas ir (ii) virsmo produktų išplovimo potencialas (tyrimas su sendintais likučiais) dirvožemiuose kontroliuojamomis laboratorijos sąlygomis ([1]). Metodas pagrįstas esamais metodais (6)(7)(8)(9)(10)(11).

4. Belgirate, Italijoje 1995 m. vykusiame EBPO seminare dėl dirvožemio ar nuosėdų atrankos (12) sutarta dėl šiame bandymo metode naudojamų dirvožemių skaičiaus ir tipo. Jame taip pat pateiktos rekomendacijos dėl išplovimo bandymams skirto dirvožemio ėminių surinkimo, apdorojimo ir laikymo.

BANDYMO METODO PRINCIPAS

5. Kolonėlės, pagamintos iš tinkamos inertinės medžiagos (pvz., stiklo, nerūdijančiojo plieno, aliuminio, teflono, PVC ir kt.) pripildomos dirvožemio, sotinamos „dirbinio lietaus“ tirpalu (apibrėžtis pateikta 1 priedėlyje), pusiausvirinamos ir paliekamos skysčiui ištekėti. Paskui kiekvienos dirvožemio kolonėlės paviršius apdorojamas bandomąja chemine medžiaga ir (arba) sendintais bandomosios cheminės medžiagos likučiais. Dirvožemio kolonėlės plaunamos dirbtiniu lietumi ir išplovos surenkamos. Pasibaigus išplovimo procesui, dirvožemis išimamas iš kolonėlių ir padalijamas į reikiamą segmentų skaičių, atsižvelgiant į informaciją, kurią reikia gauti atliekant tyrimą. Atliekama kiekviename dirvožemio segmente ir išplovose esančios bandomosios cheminės medžiagos ir, jei tinka, jos virsmo produktų arba kitų tiriamų cheminių medžiagų analizė.

BANDYMO METODO TAIKOMUMAS

6. Bandymo metodas tinka bandomosioms cheminėms medžiagoms (nežymėtoms arba radioaktyviu izotopu žymėtosioms, pvz., ^{14}C), kurioms yra nustatytas reikiamo tikslumo ir jautrio analizės metodas. Bandymo metodas netiktų cheminėms medžiagoms, kurios yra lakios dirvožemyje ar vandenyje, todėl šio bandymo metodo sąlygomis jų nelieka dirvožemyje ir (arba) išplovose.

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

7. Galima naudoti nežymėtąsias ar žymėtąsias bandomąsias chemines medžiagas jų išplovimo iš dirvožemio kolonėlių charakteristikoms nustatyti. Žymėtąsias chemines medžiagas reikia naudoti tiriant virsmo produktų

([1]) Augalų apsaugos priemonių išplovimo iš kolonėlės tyrimai gali pateikti informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos ir jos virsmo produktų judrumą ir gali papildyti adsorbcijos-desorbcijos tyrimus.

▼M6

(bandomosios cheminės medžiagos sendintų likučių) išplovimą ir nustatant masių balansą. Rekomenduojama naudoti ^{14}C žymėtąsias medžiagas, bet gali tikti kiti izotopai, pvz., ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Jei tik įmanoma, žymėtasis atomas turėtų būti molekulės stabiliausioje (-iose) dalyje (-yse). Bandomosios cheminės medžiagos grynumas turėtų būti ne mažesnis kaip 95 %.

8. Daugumą cheminių medžiagų reikėtų naudoti kaip atskirą medžiagą. Tačiau tiriant augalų apsaugos priemonių veikliąsias medžiagas, galima naudoti jų preparatus pradinės bandomosios cheminės medžiagos išplovimui tirti, bet preparatų bandymas yra ypač būtinas, kai mišinys gali turėti įtakos išsiskyrimo spartai (pvz., granulės arba reguliuojamo išskyrimo preparatai). Nagrinėjant specifinius mišinių bandymo schemos reikalavimus, gali būti naudinga prieš atliekant bandymą pasitarti su reguliavimo institucija. Tiriant sendintų likučių išplovimą, reikėtų naudoti gryną pradinę bandomąją cheminę medžiagą.

9. Prieš atliekant išplovimo iš dirvožemio kolonėlių bandymus, pageidautina, kad būtų surinkta ši informacija apie bandomąją cheminę medžiagą:

   (1) tirpumas vandenyje [A.6 bandymo metodas] (13);

   (2) tirpumas organiniuose tirpikliuose;

   (3) garų slėgis [A.4 bandymo metodas] (13) ir Henrio dėsnio konstanta;

   (4) pasiskirstymo tarp n-oktanolio ir vandens koeficientas [A.8 ir A.24 bandymo metodai] (13);

   (5) adsorbcijos koeficientas (K_d, K_f arba K_{oc}) [C.18 ir (arba) C.19 bandymo metodas] (13);

   (6) hidrolizė [C.7 bandymo metodas] (13);

   (7) disociacijos konstanta (pK_a) [EBPO TG 112] (25);

   (8) aerobinis ir anaerobinis virsmas dirvožemyje [C.23 bandymo metodas] (13).

   Pastaba. Atitinkamose bandymo ataskaitose turėtų būti nurodyta temperatūra, kurioje atliekami šie matavimai.

10. Į dirvožemio kolonėles dedamos bandomosios cheminės medžiagos kiekio turėtų pakakti tam, kad bet kuriame atskirame segmente būtų galima aptikti ne mažiau kaip 0,5 % įdėtos dozės. Tiriant augalų apsaugos priemonių veikliąsias medžiagas, įdėtos bandomosios cheminės medžiagos kiekis gali atitikti maksimalią (vienkartinio įterpimo) rekomenduojamą naudojimo normą.

11. Būtina turėti tinkamą žinomo tikslumo, preciziškumo ir jautrio analizės metodą bandomosios cheminės medžiagos ir, jei tinka, virsmo produktų kiekiui dirvožemyje ir išplovose nustatyti. Taip pat reikėtų žinoti bandomosios cheminės medžiagos ir jos reikšmingų virsmo produktų (paprastai bent visų virsmo produktų, kurie sudaro $\geq$ 10 % įdėtos dozės ir kurie stebimi atliekant virsmo kelių tyrimus, bet, pageidautina, visų tyrimui svarbių virsmo produktų) analizės aptikimo ribą (žr. 17 pastraipą).

▼M6

ETALONINĖS CHEMINĖS MEDŽIAGOS

12. Įvertinant santykinį bandomosios cheminės medžiagos judrumą dirvožemyje, reikėtų naudoti žinomų išplovimo charakteristikų etalonines chemines medžiagas, pvz., atraziną ar monuroną, kurias galima laikyti vidutinių išplovimo charakteristikų medžiagomis (1)(8)(11). Siekiant patvirtinti dirvožemio kolonėlės hidrodinamines savybes, gali būti naudingos nesorbuojamos ir neskaidžios polinės etaloninės cheminės medžiagos (pvz., etidžio bromidas, fluoresceinas, eozinas) vandens judėjimui kolonėle sekti.

13. Analizės standartinės cheminės medžiagos taip pat gali būti naudingos dirvožemio segmentuose ir išplovose rastiems virsmo produktams apibūdinti ir (arba) identifikuoti taikant chromatografinius, spektroskopinius arba kitus tinkamus metodus.

APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

14. Žr. 1 priedėlį.

KOKYBĖS KRITERIJAI

Atgavimo laipsnis

15. Dirvožemio segmentuose ir išplovose po išplovimo rastos bandomosios cheminės medžiagos procentinių dalių suma yra išplovimo bandymo atgavimo laipsnis. Žymėtųjų cheminių medžiagų atgavimo laipsnis turėtų būti nuo 90 % iki 110 % (11), o nežymėtųjų cheminių medžiagų – nuo 70 % iki 110 % (8).

Analizės metodo pakartojamumas ir jautris

16. Bandomosios cheminės medžiagos ir jos virsmo produktų analizės metodo pakartojamumas gali būti patikrintas atliekant kartotinę to paties dirvožemio segmento ekstrakto arba išplovų analizę (žr. 11 pastraipa).

17. Kiekviename dirvožemio segmente arba išplovose esančios bandomosios cheminės medžiagos ir jos virsmo produktų analizės metodo aptikimo riba (LOD) turėtų būti ne mažesnė kaip 0,01 mg kg^{-1} (kaip bandomosios cheminės medžiagos) arba 0,5 % į bet kurį segmentą įterptos dozės, jei šis kiekis yra mažesnis. Taip pat reikėtų nurodyti kiekybinio nustatymo ribą (LOQ).

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Bandymo sistema

18. Bandymui atlikti naudojamos išplovimo kolonėlės (ardomos ar neardomos į sekcijas), pagamintos iš tinkamos inertinės medžiagos (pvz., stiklo, nerūdijančiojo plieno, aliuminio, teflono, PVC ir kt.), kurių vidinis skersmuo ne mažesnis kaip 4 cm ir aukštis – ne mažesnis kaip 35 cm. Kolonėlių medžiagą reikėtų tikrinti dėl galimos sąveikos su bandomąja chemine medžiaga ir (arba) jos virsmo produktais. Tinkamų į sekcijas ardomų ir neardomų kolonėlių pavyzdžiai pateikti 2 priedėlyje.

19. Dirvožemio kolonėlėms pripildyti ir tankinti naudojamas šaukštas, stūmoklis ir vibratorius.

20. Dirbtiniam lietui tiekti į dirvožemio kolonėles galima naudoti stūmoklinius arba žarninius siurblius, dušo galvutes, Marioto indus arba paprastus lašinamuosius piltuvus.

▼M6

Laboratorinė įranga ir cheminės medžiagos

21. Naudojama standartinė laboratorinė įranga, konkrečiai ši įranga:

(1) analizės aparatūra, pvz., dujų-skysčių chromatografijos (GLC), efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) ir plonasluoksnės chromatografijos (TLC) įranga, įskaitant reikiamas aptikimo sistemas žymėtųjų arba nežymėtųjų cheminių medžiagų analizei atlikti, arba atvirkštinio izotopų skiedimo metodo aparatūra;

(2) identifikavimo aparatūra (pvz., masių spektrometrijos (MS), GC-MS, HPLC-MS, branduolių magnetinio rezonanso (NMR) ir kt.);

(3) žymėtųjų cheminių medžiagų scintiliacijos skystyje skaitiklis;

(4) oksidavimo įtaisas žymėtosioms cheminėms medžiagos sudeginti;

(5) ekstrahavimo aparatūra (pvz., žematemperatūrio ekstrahavimo centrifugavimo mėgintuvėliai ir Soksleto aparatas nepertraukiamam ekstrahavimui su grįžtamuoju šaldytuvu);

(6) įranga tirpalams ir ekstraktams koncentruoti (pvz., sukamasis garintuvas).

22. Naudojamos šios cheminės medžiagos: organiniai tirpikliai, analiziškai gryni, pvz., acetonas, metanolis ir kt.; scintiliacinis skystis; 0,01 mol/l $CaCl_2$ tirpalas distiliuotame arba dejonizuotame vandenyje (dirbtinis lietus).

Bandomoji cheminė medžiaga

23. Bandomąją cheminę medžiagą reikėtų ištirpinti vandenyje (distiliuotame ar dejonizuotame), kad ją būtų galima įterpti į kolonėlę. Jei bandomoji cheminė medžiaga mažai tirpsta vandenyje, ją galima įterpti kaip preparatą (paruošus vandeninę dispersiją ar emulsiją, jei reikia) arba ištirpintą organiniame tirpiklyje. Jei naudojamas organinis tirpiklis, jo turėtų būti imama kuo mažiau ir prieš pradedant išplovimo procedūrą jis turėtų būti išgarintas nuo dirvožemio kolonėlės paviršiaus. Kietuosius preparatus, pvz., granules, reikėtų įterpti kieto pavidalo nenaudojant vandens; siekiant užtikrinti geresnį pasiskirstymą dirvožemio kolonėlės paviršiuje, prieš įterpiant preparatą jį galima sumaišyti su nedideliu kvarcinio smėlio kiekiu (pvz., 1 g).

24. Į dirvožemio kolonėles įterpiamos bandomosios cheminės medžiagos kiekio turėtų pakakti tam, kad bet kuriame atskirame segmente būtų galima aptikti ne mažiau kaip 0,5 % įterptos dozės. Jei tiriamos augalų apsaugos priemonių veikliosios cheminės medžiagos, jų kiekis gali būti pagrįstas rekomenduojama maksimalia įterpimo norma (vienkartinio įterpimo norma), o pradinės bandomosios cheminės medžiagos ir sendintų cheminių medžiagų išplovimą reikėtų susieti su naudojamos dirvožemio kolonėlės paviršiaus plotu ([1]).

Etaloninė cheminė medžiaga

25. Atliekant išplovimo bandymus, reikėtų naudoti etaloninę cheminę medžiagą (žr. 12 pastraipą). Ja reikėtų padengti dirvožemio kolonėlės paviršių panašiai

([1]) Kiekį, kuris turi būti įterpiamas į cilindro formos kolonėles, galima apskaičiuoti pagal šią formulę:

$$M\ [\mu g] = \frac{A\ [kg/ha] \cdot 10^9 [\mu g/kg] \cdot d^2 [cm^2] \cdot \pi}{10^8 [cm^2/ha] \cdot 4}$$

čia:

M – į kolonėlę įterptas kiekis [μg];

A – įterpimo norma [$kg \cdot ha^{-1}$];

d – dirvožemio kolonėlės skersmuo [cm];

π = 3,14.

▼M6

kaip bandomąja chemine medžiaga ir naudojant reikiamą normą, kad būtų įmanoma tinkamai aptikti kaip vidinį etaloną kartu su bandomąja chemine medžiaga toje pačioje dirvožemio kolonėlėje arba vieną atskiroje dirvožemio kolonėlėje. Būtų geriau abi chemines medžiagas naudoti toje pačioje kolonėlėje, išskyrus atvejus, kai abi cheminės medžiagos turi žymėtuosius atomus panašioje vietoje.

Dirvožemiai

Dirvožemių parinkimas

26. Atliekant išplovimo tyrimus su pradine bandomąja chemine medžiaga, reikėtų naudoti nuo 3 iki 4 dirvožemių, kurių pH vertė, organinės anglies kiekis ir tekstūra (12) būtų skirtingi. Nurodymai dėl išplovimo tyrimams skirtų dirvožemių parinkimo pateikti 1 lentelėje. Jonizuojamoms bandomosioms cheminėms medžiagoms parinkti dirvožemiai turėtų aprėpti platų pH intervalą, kad būtų galima įvertinti jonizuotos ir nejonizuotos formos cheminės medžiagos judrumą; ne mažiau kaip trijų dirvožemių pH vertė turėtų užtikrinti bandomosios cheminės medžiagos judriąją formą.

1 lentelė.

Nurodymai dėl išplovimo tyrimams skirtų dirvožemių parinkimo

Dirvožemio nr.	pH vertė	Organinės anglies kiekis %	Molio kiekis %	Tekstūra (*)
1	> 7,5	3,5–5,0	20–40	sunkus priemolis
2	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	dulkiškas priemolis
3	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	priemolis
4	< 4,0–6,0 (§)	< 0,5–1,5 (§) (‡)	< 10–15 (§)	rišlus smėlis
5	< 4,5	> 10 (#)	< 10	rišlus smėlis arba smėlis

(*) Pagal Maisto ir žemės ūkio organizacijos (FAO – *Food and Agricultural Organization*) ir JAV žemės ūkio departamento (USDA) sistemas (14).

§ Būtų geriau, jei atitinkamų kintamųjų vertės būtų nurodytame intervale. Tačiau, jei sunku rasti tinkamą dirvožemį, priimtinos mažesnės nei nurodytos mažiausios vertės.

‡ Jei dirvožemiai turi mažiau kaip 0,3 % organinės anglies, gali sutrikti koreliacija tarp organinės medžiagos kiekio ir adsorbcijos. Todėl rekomenduojama naudoti dirvožemį, kuriame organinės anglies būtų ne mažiau kaip 0,3 %.

Dirvožemiai, turintys labai daug anglies (pvz., > 10 %) gali būti nepriimtini dėl reguliavimo institucijų reikalavimų, pvz., pesticidų registravimo tikslais.

27. Kartais gali prireikti kitų tipų dirvožemių, kurie reprezentuotų žemesnės temperatūros, vidutinio klimato ir tropikų regionus. Todėl, jei teikiama pirmenybė kitų tipų dirvožemiams, juos reikėtų apibūdinti tais pačiais parametrais, o jų savybių kitimas turėtų atitikti aprašytą nurodymuose dėl išplovimo tyrimams skirtų dirvožemių parinkimo (žr. 1 lentelę), netgi jei jie nevisiškai tiksliai atitinka kriterijus.

28. Atliekant „sendintų likučių“ išplovimo tyrimus, reikėtų naudoti vieną dirvožemį (12). Jų smėlio kiekis turėtų būti > 70 %, o organinės anglies – 0,5–1,5 % (pvz., 1 lentelės dirvožemis nr. 4). Gali tekti naudoti daugiau dirvožemio tipų, jei svarbu gauti duomenis apie virsmo produktus.

29. Visi dirvožemiai turėtų būti apibūdinti, nurodant bent tekstūrą (% smėlio, % dumblo, % molio, pagal FAO ir USDA klasifikaciją (18)), pH, katijonų mainų talpą, organinės anglies kiekį, piltinį tankį (pažeistos struktūros dirvožemio) ir vandens sulaikymo gebą. Reikėtų matuoti mikrobinę biomasę tik tų dirvožemių, kurie naudojami sendinimo ar inkubavimo laikotarpiu prieš

▼M6

sendintų likučių išplovimo bandymą. Informacija apie papildomas dirvožemių savybes (pvz., dirvožemių klasifikavimą, molių mineralogiją, savitąjį paviršiaus plotą) gali būti naudinga aiškinant tyrimo rezultatus. Dirvožemio charakteristikoms nustatyti gali būti taikomi metodai, rekomenduojami (15)(16)(17)(18)(19) nuorodose.

Dirvožemių surinkimas ir laikymas

30. Dirvožemius reikėtų imti iš viršutinio sluoksnio (A horizonto) ir iš ne didesnio kaip 20 cm gylio. Augmenijos likučiai, makrofauna ir akmenys turėtų būti pašalinti. Dirvožemiai (išskyrus naudojamus bandomajai cheminei medžiagai sendinti) džiovinami kambario temperatūros (pageidautina 20–25 °C) ore. Smulkinti reikėtų kuo mažesne jėga, kad pradinės dirvožemio tekstūros pokyčiai būtų kuo mažesni. Dirvožemiai sijojami per ≤ 2 mm akučių sietą. Rekomenduojama dirvožemius kruopščiai homogenizuoti, kad būtų geresnis rezultatų atkuriamumas. Prieš naudojant, išdžiovintus ore dirvožemius galima laikyti kambario temperatūroje (12). Rekomendacijų dėl laikymo trukmės ribų nepateikiama, tačiau, prieš naudojant daugiau kaip trejus metus laikytą dirvožemį, reikėtų pakartotinai atlikti jo analizę organinės anglies kiekiui ir pH nustatyti.

31. Reikėtų turėti išsamią informaciją apie lauko vietų, iš kurių imami bandymo dirvožemiai, istoriją. Duomenis sudaro tiksli vieta (tiksliai apibrėžta pagal Universaliąją skersinę Merkatoriaus projekciją ir (arba) Europos horizontalųjį atskaitos lygį (UTM – *Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum*) ar geografinės koordinates), augalinė danga, apdorojimo augalų apsaugos priemonėmis, organinėmis ir neorganinėmis trąšomis, biologiniais priedais dozės arba atsitiktiniai teršalai (12). Jei per pastaruosius ketverius metus dirvožemiai buvo apdorojami bandomąja chemine medžiaga arba jos struktūriniais analogais, tokie dirvožemiai neturėtų būti naudojami išplovimui tirti.

Bandymo sąlygos

32. Visą bandymo laikotarpį išplovimo kolonėlės turėtų būti laikomos tamsoje ir kambario temperatūroje, jei ši temperatūra užtikrinama ± 2 °C tikslumu. Rekomenduojama temperatūra yra nuo 18 iki 25 °C.

33. Dirbtinis lietus (0,01 mol/l $CaCl_2$) turėtų lyti nepertraukiamai ant kolonėlių paviršiaus esant srautui 200 mm per 48 h ([1]); šis srautas atitinka 251 ml vandens įpylimą į kolonėlę, kurios vidinis skersmuo 4 cm. Jei būtina, atsižvelgiant į bandymo tikslą, gali būti papildomai naudojami kiti dirbtinio lietaus srautai ir ilgesnė jo trukmė.

Bandymo eiga

Pradinės bandomosios cheminės medžiagos išplovimas

34. Ne mažiau kaip dvi kartotinių ėminių išplovimo kolonėlės pripildomos ore išdžiovintu ir sijotu (< 2 mm) neapdorotu dirvožemiu iki maždaug 30 cm aukščio. Siekiant užtikrinti vienodą tankumą, dirvožemis šaukštu dedamas į kolonėles nedideliais kiekiais ir spaudžiamas stūmokliu, vienu metu nestipriai purtant kolonėlę tol, kol dirvožemio stulpelio viršus nustoja slinkti žemyn. Būtina pripildyti tolygiai, kad būtų gauti atkuriami išplovimo kolonėlių rezultatai. Informacija apie kolonėlių pripildymo metodus pateikta

([1]) Toks srautas modeliuoja ypač didelį kritulių kiekį. Vidutinis metinis kritulių kiekis, pvz., Vidurio Europoje, yra 800–1 000 mm.

▼M6

(20)(21) ir (22) nuorodose. Siekiant kontroliuoti pripildymo procedūros atkuriamumą, nustatoma kolonėlei pripildyti naudojamo dirvožemio suminė masė ([1]); kartotinių ėminių kolonėlių masė turėtų būti panaši.

35. Pripildytos kolonėlės iš anksto sudrėkinamos dirbtiniu lietumi (0,01 mol/l $CaCl_2$) iš apačios į viršų, kad vanduo išstumtų dirvožemio porose esantį orą. Palaukiama, kol nusistovi kolonėlių pusiausvyra ir išteka sunkio jėgos veikiamas perteklinis vanduo. Kolonėlių prisotinimo metodų apžvalga pateikta (23) nuorodoje.

36. Į dirvožemio kolonėles įterpiama bandomoji cheminė medžiaga ir (arba) etaloninė cheminė medžiaga (taip pat žr. 23–25 pastraipas). Siekiant užtikrinti vienalytį pasiskirstymą, bandomosios ir (arba) etaloninės cheminės medžiagos tirpalai, suspensijos arba emulsijos turėtų vienodai pasklisti dirvožemio kolonėlių paviršiuje. Jei bandomąją cheminę medžiagą rekomenduojama įterpti kartu su dirvožemiu, ją reikėtų sumaišyti su nedideliu kiekiu (pvz., 20 g) dirvožemio ir užberti ant dirvožemio kolonėlės paviršiaus.

37. Dirvožemio kolonėlių paviršius uždengiamas sukepintojo stiklo disku, stiklo karoliukais, stiklo pluošto filtru arba apskritu filtravimo popieriaus lapu, kad dirbtinis lietus tolygiai pasklistų visu paviršiumi ir lietaus lašai netrikdytų dirvožemio paviršiaus. Kuo didesnis kolonėlės skersmuo, tuo atidžiau ant dirvožemio kolonėlių reikia paskirstyti dirbtinį lietų, kad būtų užtikrintas dirbtinio lietaus tolygus pasklidimas dirvožemio paviršiumi. Dirbtinis lietus į dirvožemio kolonėles pilamas naudojant stūmoklinį ar žarninį siurblį arba lašinamąjį piltuvą. Pageidautina išplovas rinkti į frakcijas, užrašant jų atitinkamą tūrį ([2]).

38. Po išplovimo kolonėlės paliekamos išvarvėti ir dirvožemio kolonėlės dalijamos į reikiamą segmentų skaičių, atsižvelgiant į informaciją, kurią numatyta gauti iš tyrimo; segmentai ekstrahuojami atitinkamais tirpikliais arba jų mišiniais ir analizuojami bandomajai cheminei medžiagai ir, jei tinka, jos virsmo produktams, suminiam radioaktyvumui ir etaloninei cheminei medžiagai nustatyti. Išplovos ar išplovų frakcijos analizuojamos tiesiogiai arba tie patys produktai analizuojami po jų ekstrahavimo. Kai naudojama žymėtoji bandomoji cheminė medžiaga, reikėtų identifikuoti visas frakcijas, kurių radioaktyvumas sudaro ≥ 10 % naudoto radioaktyvumo.

Sendintų likučių išplovimas

39. Šviežias dirvožemis (iš anksto nedžiovintas ore) apdorojamas žymėtąja bandomąja chemine medžiaga, taikant dirvožemio kolonėlių paviršiaus plotą atitinkančią normą (žr. 24 pastraipą), ir inkubuojamas aerobinėmis sąlygomis pagal C.23 bandymo metodą (13). Inkubavimo (sendinimo) laikotarpis turėtų būti gana ilgas, kad galėtų susidaryti reikšmingas virsmo

([1]) Pažeistos struktūros dirvožemio piltinio tankio pavyzdžiai yra tokie:smėlingo dirvožemio 1,66 g · ml^{-1},
rišlaus smėlio dirvožemio 1,58 g · ml^{-1},
priemolio dirvožemio 1,17 g · ml^{-1},
dulkiško priemolio dirvožemio 1,11 g · ml^{-1}.

([2]) Tipinis 230–260 ml išplovų tūris atitinka maždaug 92–104 % viso įpilto dirbtinio lietaus (251 ml), kai naudojamos 4 cm skersmens ir 30 cm ilgio kolonėlės.

▼M6

produktų kiekis; rekomenduojama sendinimo laikotarpio trukmė, lygi bandomosios cheminės medžiagos pusėjimo trukmei ([1]), bet ne didesnė kaip 120 dienų. Prieš išplaunant, sendintas dirvožemis analizuojamas bandomajai cheminei medžiagai ir jos virsmo produktams nustatyti.

40. Išplovimo kolonėlės pripildomos iki 28 cm aukščio tuo pačiu dirvožemiu (tik išdžiovintu ore), kuris buvo naudotas atliekant sendinimo bandymą, kaip aprašyta 34 pastraipoje, ir nustatoma pripildytų dirvožemio kolonėlių suminė masė. Dirvožemio kolonėlės iš anksto sudrėkinamos, kaip aprašyta 35 pastraipoje.

41. Bandomoji cheminė medžiaga ir jos virsmo produktai sendintų dirvožemio likučių pavidalu (žr. 39 pastraipą) užpilami ant dirvožemio kolonėlių paviršiaus kaip 2 cm storio dirvožemio segmentas. Pageidautina, kad suminis dirvožemio kolonėlių aukštis (neapdoroto dirvožemio ir sendinto dirvožemio) nebūtų didesnis kaip 30 cm (žr. 34 pastraipą).

42. Išplaunama, kaip aprašyta 37 pastraipoje.

43. Išplauti dirvožemio segmentai ir išplovos analizuojami kaip nurodyta 38 pastraipoje, nustatant bandomąją cheminę medžiagą, jos virsmo produktus ir neišplautos žymėtosios medžiagos kiekį. Siekiant nustatyti sendinto likučio kiekį, likusį po išplovimo 2 cm sluoksnyje, šį segmentą reikėtų analizuoti atskirai.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

44. Bandomosios cheminės medžiagos, virsmo produktų, neekstrahuojamų produktų ir etaloninės cheminės medžiagos, jei įtraukta, kiekis kiekviename dirvožemio segmente ir išplovų frakcijoje turėtų būti nurodytas % įterptos pradinės dozės. Turėtų būti pateiktas kiekvienai kolonėlei gautas grafikas, kuris rodytų nustatytą procentinę dalį, kaip dirvožemio gylio funkciją.

45. Kai į šiuos išplovimo iš kolonėlės tyrimus įtraukiama etaloninė cheminė medžiaga, cheminės medžiagos išplovimą galima įvertinti pagal santykinę skalę, taikant santykinio judrumo faktorius (RMF; apibrėžtis pateikta 1 priedėlyje) (1)(11), kuriuos turint galima palyginti įvairių cheminių medžiagų išplovimo duomenis, gautus skirtingų tipų dirvožemiams. Įvairių augalų apsaugos priemonių RMF verčių pavyzdžiai pateikti 3 priedėlyje.

46. K_{oc} (pagal organinės anglies kiekį normalizuoto adsorbcijos koeficiento) ir K_{om} (pagal organinės medžiagos kiekį normalizuoto pasiskirstymo koeficiento) įverčius taip pat galima gauti pagal išplovimo iš kolonėlių rezultatus, taikant vidutinį išplovimo atstumą, arba nustatytus santykius tarp RMF ir K_{om} ar K_{oc} (4) arba taikant paprastą chromatografijos teoriją (24). Tačiau pastarąjį metodą reikėtų taikyti atsargiai, ypač, jei daroma prielaida, kad išplovimo procesas nevyksta vien tik sočiojo srauto sąlygomis, bet daugiau yra susijęs su nesočiomis sistemomis.

([1]) Dirvožemyje gali susidaryti daugiau kaip vienas pagrindinis virsmo produktas, kuris taip pat gali atsirasti skirtingais virsmo tyrimo laikotarpio momentais. Tokiais atvejais gali tekti atlikti skirtingo amžiaus sendintų likučių išplovimo tyrimus.

▼M6

Rezultatų aiškinimas

47. Tiriant išplovimą iš kolonėlių, pagal šį metodą galima nustatyti bandomosios cheminės medžiagos (tiriant pradinės medžiagos išplovimą) ir (arba) jos virsmo produktų (tiriant sendinto likučio išplovimą) išplovimo arba judrumo dirvožemyje potencialą. Šiais bandymais negalima kiekybiškai prognozuoti išplovimo elgsenos lauko sąlygomis, bet jie tinka cheminės medžiagos „išplaunamumui“ palyginti su kitomis cheminėmis medžiagomis, kurių išplovimo elgsena gali būti žinoma (24). Be to, kiekybiškai nenustatoma įterptos medžiagos procentinė dalis, kuri gali pasiekti gruntinius vandenis (11). Tačiau išplovimo iš kolonėlių tyrimo rezultatai gali padėti nuspręsti, ar būtina papildomai tirti pusiau lauko ar lauko sąlygomis chemines medžiagas, kurių didelis judrumo potencialas buvo įrodytas laboratoriniais bandymais.

Bandymo ataskaita

48. Ataskaitą turi sudaryti:

Bandomoji cheminė medžiaga ir etaloninė cheminė medžiaga (kai naudojama):

— bendrinis pavadinimas, cheminis pavadinimas (IUPAC ir CAS nomenklatūra), CAS numeris, struktūrinė formulė (nurodant žymėtojo atomo padėtį, kai naudojama žymėtoji medžiaga) ir reikiamos fizikinės ir cheminės savybės;

— bandomosios cheminės medžiagos grynumas (priemaišos);

— žymėtosios cheminės medžiagos radiocheminis grynumas ir savitasis aktyvumas (jei tinka).

Bandymo dirvožemiai:

— ėmimo vietos duomenys;

— dirvožemių savybės, pvz., pH vertė, organinės anglies ir molio kiekis, tekstūra ir piltinis tankis (pažeistos struktūros dirvožemio);

— dirvožemio mikrobinis aktyvumas (tik bandomajai cheminei medžiagai sendinti naudoto dirvožemio);

— laikymo trukmė ir sąlygos.

Bandymo sąlygos:

— tyrimo atlikimo datos;

— išplovimo kolonėlių ilgis ir skersmuo;

— dirvožemio kolonėlės dirvožemio suminė masė;

— įterptos bandomosios medžiagos ir, jei tinka, etaloninės cheminės medžiagos kiekis;

— dirbtinio lietaus kiekis, naudojimo dažnis ir trukmė;

— bandymo įrenginio temperatūra;

— kartotinių ėminių skaičius (ne mažiau kaip du);

— bandomosios cheminės medžiagos, jos virsmo produktų ir, jei tinka, etaloninės cheminės medžiagos analizės įvairiuose dirvožemio segmentuose ir išplovose metodai;

— virsmo produktų dirvožemio segmentuose ir išplovose apibūdinimo ir identifikavimo metodai.

▼M6

Bandymo rezultatai:

— rezultatų, išreikštų koncentracijos vertėmis ir įterptos dozės % dirvožemio segmentuose ir išplovose, lentelės;

— masių balansas, jei tinka;

— išplovų tūriai;

— išplovimo atstumai ir, jei tinka, santykinio judrumo faktoriai;

— % išreikšto segmentuose rasto kiekio kaip segmento gylio funkcijos grafikas;

— rezultatų aptarimas ir aiškinimas.

NUORODOS

(1) Guth, J.A., Burkhard, N. and Eberle, D.O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.

(2) Russel, M.H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals – T.R. Roberts and P.C. Kearney, Eds.). J. Wiley & Sons.

(3) Briggs, G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, 1050-1059.

(4) Chiou, C.T., Porter, P.E. and Schmedding, D.W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227-231.

(5) Guth, J.A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26-33.

(6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(7) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(8) 1995 m. liepos 14 d. Komisijos direktyvos 95/36/EB, iš dalies keičiančios Tarybos direktyvą 91/414/EEB dėl augalų apsaugos produktų pateikimo į rinką, I priedas, OL L 172, 1995 7 22, p.8.

(9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.

(11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(12) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/-Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(13) Šie šio priedo skyriai:

A.4 skyrius. Garų slėgis

A.6 skyrius. Tirpumas vandenyje

▼M6

A.8 skyrius. Pasiskirstymo koeficientas. Kratomos kolbos metodas

A.24 skyrius. Pasiskirstymo koeficientas. HPLC metodas

C.7 skyrius. Skaidymas. Abiotinis skaidymas. Hidrolizė kaip pH funkcija

C.18 skyrius. Adsorbcija/desorbcija taikant statinės pusiausvyros metodą

C.23 skyrius. Aerobinis ir anaerobinis transformavimas dirvožemyje

(14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).

(15) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(16) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(17) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(18) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.

(19) Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(20) Weber, J.B. and Peeper, T.F. (1977). In Research Methods in Weed Science, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73-78.

(21) Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J. and Sartori, J.L. (1986). In Research Methods in Weed Science, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190-200.

(22) Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Amer. J. 60(1): 49-53.

(23) Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. – A review. J. Contam. Hydrol. 7, 177-217.

(24) (Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115-133. Plenum Press, New York.

(25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OECD, Paris

▼M6

1 priedėlis

Apibrėžtys ir vienetai

Sendintas dirvožemio likutis – bandomoji cheminė medžiaga ir jos virsmo produktai, esantys dirvožemyje po įterpimo praėjus pakankamai ilgam laikotarpiui, kad galėtų įvykti pernešimo, adsorbcijos, metabolizmo ir sklaidos procesai, kurie pakeistų dalies įterptos cheminės medžiagos pasiskirstymą ir cheminę prigimtį (1).

Dirbtinis lietus – 0,01 mol/l $CaCl_2$ tirpalas distiliuotame arba dejonizuotame vandenyje.

Vidutinis išplovimo atstumas – dirvožemio segmento apačios atstumas, kuriame suminis atgautos cheminės medžiagos kiekis sudaro 50 % viso atgautos cheminės medžiagos kiekio (įprastinis išplovimo bandymas), arba (dirvožemio segmento apačios atstumas, kuriame atgautas suminis cheminės medžiagos kiekis sudaro 50 % viso atgauto cheminės medžiagos kiekio) – ((likučio sluoksnio storis)/2) (sendinto likučio išplovimo tyrimas)

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Išplova – per dirvožemio kolonėlės dirvožemio sluoksnį prasisunkusi skystoji fazė (1).

Išplovimas – cheminės medžiagos judėjimo žemyn dirvožemio kolonėlės dirvožemio sluoksniu procesas (1).

Išplovimo atstumas – giliausias dirvožemio segmentas, kuriame po išplovimo buvo rasta ≥ 0,5 % įterptos cheminės medžiagos arba sendinto likučio (atitinka skverbties gylį).

Aptikimo riba (LOD) ir **kiekybinio nustatymo riba (LOQ)**: Aptikimo riba (LOD) – mažiausia cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant cheminę medžiagą dar galima atskirti nuo analizės artefaktų. Kiekybinio nustatymo riba (LOQ) – mažiausia cheminės medžiagos koncentracija, kurią dar galima kiekybiškai nustatyti priimtinu tikslumu.

Santykinio judrumo faktorius (RMF – *Relative Mobility Factor*) – bandomosios cheminės medžiagos išplovimo atstumo (cm) ir etaloninės cheminės medžiagos išplovimo atstumo (cm) dalmuo.

Bandomoji cheminė medžiaga – naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

Virsmo produktas – visos cheminės medžiagos, susidarančios vykstant bandomosios medžiagos biotinio arba abiotinio virsmo reakcijoms, įskaitant CO_2 ir su likučiais surištus produktus.

Dirvožemis – mineralinių ir organinių cheminių sudedamųjų dalių mišinys, kurio organinius komponentus sudaro daug anglies ir azoto turintys didelės molekulinės masės junginiai ir kurio pagrindinė populiacijos dalis yra mikroorganizmai. Gali būti bandomi dviejų būsenų dirvožemiai:

— nepažeistos struktūros, koks jis susidaro per tam tikrą laiką tipiškuose įvairių dirvožemio tipų sluoksniuose;

— pažeistos struktūros, koks jis paprastai yra ariamuose laukuose arba kas su juo atsitinka, kai jo ėminiai imami kasant ir naudojami taikant šį bandymo metodą (2).

(1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167-1193.

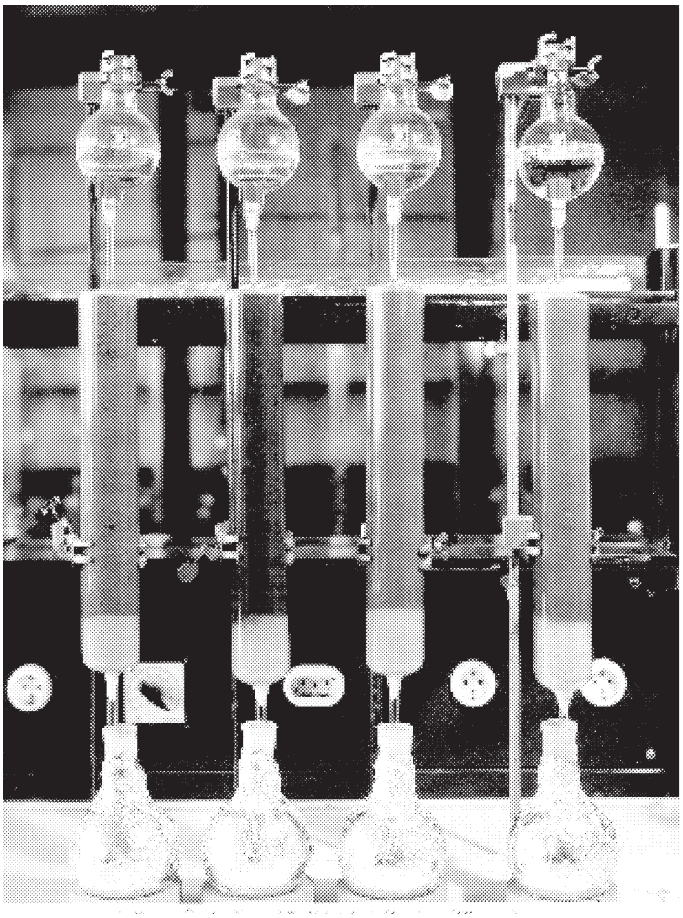
(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

▼M6

2 priedėlis

1 paveikslas.

Neardomų stiklinių išplovimo kolonėlių, kurių ilgis 35 cm, o vidinis skersmuo 5 cm, pavyzdžiai (1)



← Lašinamieji piltuvai dirbtiniam lietui tiekti

← Sukepintojo stiklo diskai, kurie apsaugo dirvožemio paviršių nuo sudrumstimo ir tolygiai paskirsto dirbtinį lietų

← Stiklinė kolonėlė, pripildyta bandymo dirvožemio (kai bandomi šviesai jautrūs produktai, kolonėles būtina apvynioti aliuminio folija)

← Kvarcinio smėlio sluoksnis

← Stiklo vatos kamštis, kad dirvožemis liktų kolonėlėje

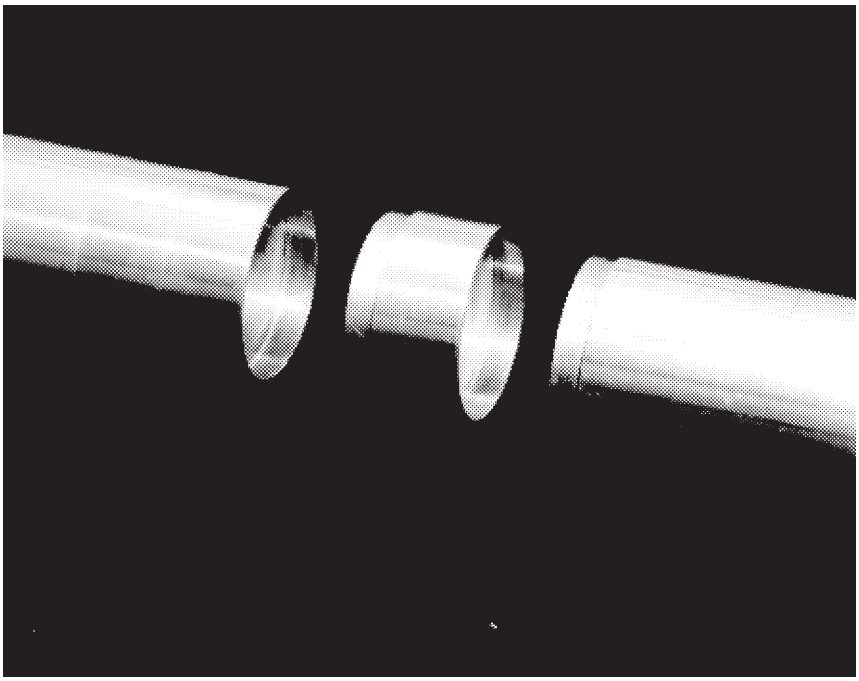
← Apvaliadugnė išplovų surinkimo kolba, apsaugai nuo fotolizės apvyniota aliuminio folija

(1) Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden – 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

▼M6

2 paveikslas.

4 cm skersmens ardomos metalinės išplovimo kolonėlės pavyzdys (1)



(1) Burkhard, N., Eberle D.O. and Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203-213.

▼M6

3 priedėlis

Įvairių augalų apsaugos produktų santykinio judrumo faktorių (*)(RMF) (1)(2) ir atitinkamų judrumo klasių (+) pavyzdžiai

RMF intervalas	Cheminė medžiaga (RMF)	Judrumo klasė
≤ 0,15	parationas (< 0,15), flurodifenas (0.15)	Inejudri
0,15–0,8	profenofosas (0,18), propikonazolas (0,23), diazinonas (0,28), diuronas (0,38), terbutilazinas (0,52), metidationas (0,56), prometrinas (0,59), propazinas (0,64), alachloras (0,66), metolachloras (0,68)	II mažai judri
0,8–1,3	monuronas (**) (1,00), atrazinas (1,03), simazinas (1,04), fluometuronas (1,18)	III vidutiniškai judri
1,3–2,5	prometonas (1,67), cianazinas (1,85), bromacilas (1,91), karbutilatas (1,98)	IV gana judri
2,5–5,0	karbofuranas (3,00), dioksakarbas (4,33)	V judri
> 5,0	monokrotofosas (> 5,0), dikrotofosas (> 5,0)	VI Labai judri

(*) Santykinio judrumo faktorius gaunamas taip (3):

$$\text{RMF} = \frac{\text{bandomosios cheminės medžiagos išplovimo atstumas(cm)}}{\text{etaloninės cheminės medžiagos išplovimo atstumas(cm)}}$$

(**) Etaloninė cheminė medžiaga.

\+ Kitos cheminės medžiagos judrumo dirvožemyje klasifikavimo sistemos pagrįstos plonasluoksnės chromatografijos metodu gautomis R_f vertėmis (4) ir K_{oc} vertėmis (5)(6).

(1) Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium „Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment.“ Canterbury, UK, 1-3 July 1985.

(2) Guth, J.A. and Hörmann, W.D. (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr.Reihe Verein WaBoLu, 68, 91-106.

(3) Harris, C.I. (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214-216.

(4) Helling, C.S. (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, 743-748.

(5) McCall, P.J., Laskowski, D.A., Swann, R.L. and Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.

(6) Hollis, J.M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, 165-174.

▼M6

C.45. **IŠMETALŲ PATEKIMO Į APLINKĄ IŠ KONSERVANTAIS APDOROTOS MEDIENOS ĮVERTINIMAS. LABORATORINIS METODAS, TAIKOMAS NEAPDENGTIEMS MEDIENOS GAMINIAMS, KURIE LIEČIASI SU GĖLU IR JŪROS VANDENIU**

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) Nr. 313 (2007). Būtina nustatyti iš konservantais apdorotos medienos į aplinką patenkančių išmetalų kiekį, kad būtų įvertinta apdorotos medienos poveikio aplinkai rizika. Aprašytas išmetalų iš konservantais apdorotos medienos įvertinimo laboratorinis metodas, kai yra dvi išmetalų patekimo į aplinką situacijos:

— išmetalai iš apdorotos medienos, kai ji liečiasi su gėlu vandeniu. Išmetalai nuo apdorotos medienos paviršiaus galėtų patekti į vandenį;

— išmetalai iš apdorotos medienos, kai ji liečiasi su jūros vandeniu. Išmetalai nuo apdorotos medienos paviršiaus galėtų patekti į jūros vandenį.

2. Šis bandymo metodas skirtas bandyti išmetalams iš apdorotos medienos ir medienos gaminių, kurie yra neapdengti ir liečiasi su gėlu arba jūros vandeniu. Apdoroto gaminio keliamas biologinis pavojus klasifikuojamas naudojimo klasėmis, kurios taikomos tarptautiniu mastu. Naudojimo klasės taip pat nustato apdoroto gaminio naudojimo sąlygas ir aplinkos terpes (oras, vanduo, dirvožemis), kurioms konservantais apdorota mediena gali kelti riziką.

3. Bandymo metodas yra vandens, į kurį buvo pamerkta apdorota mediena (sugėrimo terpės), ėminių ėmimo, didinant pamerkimo trukmę laboratorinė procedūra. Išmetalų kiekis sugėrimo terpėje susiejamas su medienos paviršiaus plotu ir pamerkimo trukme, kad srautas būtų įvertintas mg/m^2/dienai. Todėl galima įvertinti srautą (išplovimo spartą) esant didėjančiai pamerkimo trukmei.

4. Išmetalų kiekis gali būti naudojamas įvertinant apdorotos medienos poveikio aplinkai riziką.

ĮŽANGINĖS PASTABOS

5. Manoma, kad išplovimo gėlu vandeniu nuo medienos paviršiaus pobūdis ir smarkumas skiriasi nuo išplovimo jūros vandeniu. Todėl būtina ištirti medienos konservavimo produktų arba mišinių, kuriais apdorojama jūros aplinkoje naudojama mediena, išplovimą iš medienos jūros vandeniu.

6. Medienos konservantais apdorojama mediena turėtų atitikti prekyboje esančią medieną. Ji turėtų būti apdorojama pagal konservantų gamintojo instrukcijas ir atsižvelgiant į atitinkamus standartus bei specifikacijas. Turėtų būti nurodyti apdorotos medienos kondicionavimo prieš bandymo pradžią parametrai.

7. Naudojami medienos bandiniai turėtų atitikti gaminius (pvz., medienos rūšis, tankis ir kitos charakteristikos).

▼M6

8. Bandyti galima medieną, kuriai apdoroti taikomas įmirkomasis arba paviršiaus dengimo procesas, arba apdorotą medieną, kurios paviršius papildomai apdorojamas privalomu būdu (pvz., dažais, kuriais dengiama atsižvelgiant į komercinio naudojimo reikalavimą).

9. Nustatant išmetalų iš medienos kiekį, sudėtį ir prigimtį, svarbi vandens sudėtis, kiekis, pH ir fizinė būsena.

BANDYMO METODO PRINCIPAS

10. Konservantais apdoroti medienos bandiniai įmerkiami į vandenį. Ekspozicijos (pamerkimo) laikotarpiu, kurio pakaktų statistiniams skaičiavimams atlikti, daug kartų imami ir chemiškai analizuojami vandens (sugėrimo terpės) ėminiai. Pagal analizės rezultatus apskaičiuojama išmetalų išsiskyrimo sparta mg/m^2/dienai. Reikėtų užrašyti ėminių ėmimo laikotarpius. Neapdorotų bandinių bandymus galima nutraukti, jei fonas neaptinkamas pirmiems trims duomenų taškams.

11. Įtraukus neapdorotos medienos bandinius, galima nustatyti kitų nei naudojamas konservantas išmetalų sugėrimo terpių foninę koncentraciją.

KOKYBĖS KRITERIJAI

Tikslumas

12. Išmetalų kiekiui įvertinti taikomo bandymo metodo tikslumas priklauso nuo bandinių atitikties pramoniniu būdu apdorotai medienai, nuo vandens atitikties tikrajam vandeniui ir nuo ekspozicijos režimo atitikties natūralioms sąlygoms.

13. Analizės metodo tikslumas, preciziškumas ir pakartojamumas turėtų būti nustatyti prieš bandymo pradžią.

Atkuriamumas

14. Imami ir analizuojami trys vandens ėminiai ir jų vidutinė vertė imama kaip išmetalų išsiskyrimo vertė. Vienoje laboratorijoje ir skirtingose laboratorijose gautų rezultatų atkuriamumas priklauso nuo mirkymo režimo ir bandinių medienos.

Priimtinas rezultatų intervalas

15. Priimtinas šio bandymo rezultatų intervalas, kurio apatinė ir viršutinė vertės skiriasi mažiau nei viena dydžio eile.

BANDYMO SĄLYGOS

Vanduo

16. Išplovimo gėlu vandeniu scenarijai: išplovimo bandymui atlikti rekomenduojamas dejonizuotas vanduo (pvz., ASTM D 1193 II tipo), kai turi būti įvertinta gėlu vandeniu veikiama mediena. Vandens temperatūra turi būti 20 °C +/– 2 °C, o išmatuota vandens pH vertė ir temperatūra turi būti įtraukta į bandymo ataskaitą. Analizuojant vandens ėminius, paimtus prieš apdorotų bandinių įmerkimą, galima įvertinti vandenyje esančias analizuojamas chemines medžiagas. Tai yra kontroliniai ėminiai, pagal kuriuos būtų galima nustatyti vėliau analizuojamų cheminių medžiagų foninę koncentraciją.

▼M6

17. Išplovimo jūros vandeniu scenarijai: išplovimo bandymui atlikti rekomenduojamas sintetinis jūros vanduo (pvz., ASTM D 1141 *Jūros vandens pakaitalas, neturintis sunkiųjų metalų*), kai turi būti įvertinta jūros vandeniu veikiama mediena. Vandens temperatūra turi būti 20 °C +/– 2 °C, o išmatuota vandens pH vertė ir temperatūra turi būti įtraukta į bandymo ataskaitą. Analizuojant vandens ėminius, paimtus prieš apdorotų bandinių įmerkimą, galima įvertinti vandenyje esančias analizuojamas chemines medžiagas. Tai yra kontroliniai ėminiai, pagal kuriuos būtų galima nustatyti svarbių cheminių medžiagų foninę koncentraciją.

Medienos bandiniai

18. Medienos rūšys turėtų būti tipinės medienos konservantų efektyvumui bandyti naudojamos medienos rūšys. Rekomenduojamos rūšys yra *Pinus sylvestris L.* (paprastoji pušis), *Pinus resinosa Ait*. (sakingoji pušis) arba *Pinus spp* (pietinė pušis). Galima atlikti papildomus bandymus naudojant kitas rūšis.

19. Reikėtų naudoti tiesaus pluošto medieną be šakų. Reikėtų vengti naudoti sakingos išvaizdos medžiagą. Mediena turėtų būti tipinė parduotuvėse esanti mediena. Reikėtų užrašyti šaltinį, tankį ir metinių rievių skaičių kas 10 mm.

20. Rekomenduojamus medienos bandinius turėtų sudaryti rinkinys iš penkių blokų, kurių dydis atitinka EN 113 (matmenys 25 mm × 50 mm × 15 mm) ir kurių išilginiai paviršiai eina lygiagrečiai su medienos pluoštu, nors galima naudoti kitus matmenis, pvz., 50 mm × 150 mm × 10 mm. Bandinys turėtų būti visiškai panardintas į vandenį. Bandinius turi sudaryti 100 % balana. Kiekvienas bandinys unikaliai ženklinamas, kad jį būtų galima identifikuoti visą bandymą.

21. Visi bandiniai turėtų būti obliuoti arba išilgai išpjauti, o jų paviršius turėtų būti nešlifuotas.

22. Analizei naudojami ne mažiau kaip penki medienos bandinių rinkiniai: trys bandinių rinkiniai apdorojami konservantu, vienas neapdorojamas ir vienas rinkinys naudojamas apdorojamų bandinių drėgmės kiekiui nustatyti, juos išdžiovinus džiovinimo kameroje. Paruošiama pakankamai bandinių, kad būtų galima pasirinkti tris rinkinius, kurių bandinių konservanto įgėris būtų lygus visų bandinių atsargų vidutiniam įgėriui 5 % tikslumu.

23. Visų bandinių galai sandarinami chemine medžiaga, kuri apsaugo nuo konservanto skverbimosi į bandinių galus arba nuo konservanto išplovimo per galus. Dengiant galų sandarinimo priemone, būtina atskirti bandinius, kurių dengiamas paviršius, ir bandinius, kuriems taikomas įmirkomasis apdorojimas. Galų sandarinimo priemone reikia dengti prieš apdorojimą tik tais atvejais, kai dengiamas paviršius.

24. Taikant įmirkomojo apdorojimo procesus, galinis paviršius turi būti atviras. Todėl bandinių galai turi būti sandarinami kondicionavimo laikotarpio pabaigoje. Turi būti įvertinamas tik išmetalų išsiskyrimas iš išilginės paviršiaus zonos. Sandarinimo priemones reikėtų patikrinti ir prireikus padengti jomis iš naujo prieš išplovimo pradžią, bet jomis nereikėtų dengti pradėjus išplovimą.

▼M6

Mirkymo indas

25. Indas pagamintas iš inertiškos medžiagos ir yra pakankamai didelis, kad 5 medienos bandiniai pagal EN 113 tilptų 500 ml vandens ir būtų gautas paviršiaus ploto bei vandens tūrio santykis 0,4 cm^2/ml.

Bandinio bandymo sąranka

26. Bandiniai tvirtinami sąrankoje, kuri užtikrina visų bandinio veikiamų paviršių sąlytį su vandeniu.

APDOROJIMO KONSERVANTAIS PROCEDŪRA

Apdorotų bandinių paruošimas

27. Bandinys apdorojamas bandomuoju konservantu nurodytu būdu, kuris gali būti įmirkomojo apdorojimo procesas arba paviršiaus dengimo procesas, atliekamas panardinant, purškiant ar užtepant šepečiu.

Konservantai, kurie būtų naudojami įmirkomojo apdorojimo būdu

28. Reikėtų paruošti konservanto tirpalą, kuris pasiektų nurodytą sugertį arba įgėrį, tirpalą naudojant įmirkomojo apdorojimo būdu. Medienos bandinys pasveriamas ir išmatuojami jo matmenys. Įmirkomojo apdorojimo procesas turėtų atitikti 4 ar 5 naudojimo klasei nurodytą medienos konservanto naudojimo būdą. Bandinys dar kartą pasveriamas po apdorojimo ir įgėris (kg/m^3) apskaičiuojamas pagal lygtį:

$$\frac{\text{masė po apdorojimo (kg)} - \text{masė prieš apdorojimą (kg)}}{\text{bandinio tūris } (m^3)} \times \frac{\text{tirpalo koncentracjia (\% masės/masė)}}{100}.$$

29. Atkreipiamas dėmesys į tai, kad šiam bandymui atlikti galima naudoti pramoniniu būdu (pvz., impregnuojant vakuume) apdorotą medieną. Turėtų būti užrašytos taikytos procedūros ir turi būti analizuojamas bei užrašomas taip apdorotos medžiagos įgėris.

Konservantai, kurie būtų naudojami jais dengiant paviršių

30. Apdorojimo būdas dengiant paviršių yra medienos bandinių dengimas panardinant, purškiant ar užtepant šepečiu. Procesas ir dengimo norma (pvz., litrais/m^2) turėtų atitikti nurodytą konservantui jį taikant paviršiaus dengimo būdu.

31. Be to, atkreipiamas dėmesys į tai, kad šiam bandymui atlikti galima naudoti pramoniniu būdu apdorotą medieną. Turėtų būti užrašytos taikytos procedūros ir turi būti analizuojamas bei užrašomas taip apdorotos medžiagos įgėris.

Apdorotų bandinių kondicionavimas

32. Apdorotus bandinius reikėtų kondicionuoti pagal bandomojo konservanto tiekėjo rekomendacijas, atsižvelgiant į konservanto etiketėje nurodytus reikalavimus arba į pramoninio apdorojimo metodus ar į EN 252 standartą.

▼M6

Bandinių paruošimas ir atranka

33. Atlikus kondicionavimą po apdorojimo, apskaičiuojamas bandinių grupės vidutinis įgėris ir trys reprezentatyvūs rinkiniai, kurių bandinių įgėris atitinka vidutinį grupės įgėrį 5 % tikslumu, kurie atsitiktinai parenkami išplovimo matavimams.

KONSERVANTŲ IŠMETALŲ IŠSISKYRIMO MATAVIMO PROCEDŪRA

Mirkymo metodas

34. Bandiniai pasveriami ir visiškai panardinami į vandenį, užrašant įmerkimo datą bei laiką. Garavimui sumažinti indas uždengiamas.

35. Vanduo keičiamas tokiais laiko tarpais: 6 h, 1 diena, 2 dienos, 4 dienos, 8 dienos, 15 dienų, 22 dienos, 29 dienos (Pastaba: tai yra visas laikas, o ne intervalo trukmė). Reikėtų užrašyti vandens keitimo datą bei laiką ir iš indo išpilto vandens masę.

36. Po kiekvieno vandens, kuriame buvo mirkomas bandinių rinkinys, keitimo imamas jo ėminys, kad vėliau būtų galima atlikti cheminę analizę.

37. Taikant tokią ėminių ėmimo procedūrą, galima apskaičiuoti išmetalų kiekio kaip laiko funkcijos kreivę. Ėminius reikėtų laikyti sąlygomis, kuriomis analitė būtų išsaugota, pvz., šaldytuve ir tamsoje, kad juose prieš analizę augtų mažiau mikrobų.

IŠMETALŲ IŠSISKYRIMO MATAVIMAI

Apdoroti bandiniai

38. Atliekama paimtų vandens ėminių cheminė analizė veikliajai cheminei medžiagai ir (arba), jei tinka, jos skaidymo ar virsmo produktams nustatyti.

Neapdoroti bandiniai

39. Imant šios sistemos vandens (sugerties terpės) ėminius ir vėliau atliekant iš neapdorotos medienos išplautų cheminių medžiagų cheminę analizę, galima įvertinti galimą konservanto išmetalų išsiskyrimo iš neapdoroto ėminio spartą. Vis didesniais ekspozicijos tarpais imant sugerties terpės ėminius ir juos analizuojant, galima įvertinti išmetalų išsiskyrimo spartos kitimą kaip laiko funkciją. Ši analizė yra kontrolės procedūra, kurią taikant būtų galima nustatyti bandomosios cheminės medžiagos foninę koncentraciją neapdorotoje medienoje, siekiant patvirtinti, kad bandiniams naudojama mediena prieš tai nebuvo apdorota konservantu.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Cheminė analizė

40. Paimti vandens ėminiai chemiškai analizuojami ir vandens analizės rezultatai išreiškiami atitinkamais vienetais, pvz., µg/l.

Duomenų pateikimas

41. Visi rezultatai užrašomi. Priedėlyje pateiktas siūlomos vieno apdorotų bandinių rinkinio duomenų užrašymo formos pavyzdys ir suvestinė lentelė vidutinėms kiekvieno ėminių ėmimo intervalo išmetalų išsiskyrimo vertėms skaičiuoti.

42. Dienos išmetalų išsiskyrimo srautas mg/m^2/dienai skaičiuojamas trijų kartotinių ėminių matavimų vidutinę vertę dalijant iš mirkymo dienų skaičiaus.

▼M6

Bandymo ataskaita

43. Bandymo ataskaitoje turi būti bent ši informacija:

— bandomojo konservanto tiekėjo pavadinimas;

— bandomojo konservanto specialus ir unikalus pavadinimas arba kodas;

— veikliojo (-ų) komponento (-ų) prekinis ar bendrinis pavadinimas, preparato sudedamųjų dalių (pvz., bendrojo tirpiklio, dervos) apibendrintas aprašymas ir komponentų sudėtis % masės;

— sąlyčiui su vandeniu naudojamos medienos nurodytas atitinkamas įgėris ar dengimo norma (kg/m^3 ar l/m^2);

— naudotos medienos rūšys, medienos tankis ir augimo sparta, išreikšta rievių skaičiumi kas 10 mm;

— bandyto konservanto dengimo norma ar įgėris, išreikšti l/m^2 ar kg/m^3, ir jiems apskaičiuoti taikoma formulė;

— konservanto naudojimo būdas, nurodant įmirkomojo apdorojimo grafiką, ir dengimo būdas, jei atliekamas paviršiaus apdorojimas;

— konservanto naudojimo data ir bandinių drėgmės kiekio, išreikšto procentine dalimi, įvertis;

— taikytos kondicionavimo procedūros, nurodant tipą, sąlygas ir trukmę;

— naudojamos galų sandarinimo priemonės specifikacija ir dengimo kartų skaičius;

— bet kokio vėlesnio medienos apdorojimo būdo specifikacija, pvz., dažų tiekėjo, tipo, charakteristikų ir dengimo normos specifikacija;

— kiekvieno mirkymo atvejo laikas ir data, bandiniams pamerkti naudoto vandens kiekis kiekvienu atveju ir mirkant medieną sugerto vandens kiekis;

— visi nukrypimai nuo aprašyto metodo ir visi veiksniai, kurie galėjo daryti įtaką rezultatams.

NUORODOS

(1) European Standard, EN 84 – 1997. Wood preservatives. Accelerated ageing of treated wood prior to biological testing. Leaching procedure.

(2) European Standard, EN 113/A1 – 2004. Wood preservatives. Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes. Determination of the toxic values.

(3) European Standard, EN 252 – 1989. Field test method for testing the relative protective effectiveness of a wood preservative in ground contact.

(4) European Standard, EN 335 – Part 1: 2006. Durability of wood and wood-based products – Definition of use classes – Part1: General.

(5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 – 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.

(6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II – 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.

▼M6

1 priedėlis

Bandymo metodo užrašymo forma

Išmetalų į aplinką iš konservantais apdorotos medienos įvertinimas. Laboratorinis metodas, taikomas neapdengtiems medienos gaminiams, kurie liečiasi su gėlu ir jūros vandeniu

Bandymo įstaiga	

Medienos konservantas

Konservanto tiekėjas	
Konservanto specialus ir unikalus pavadinimas ar kodas	
Konservanto prekinis ar bendrinis pavadinimas	
Kitos preparato sudedamosios dalys	
Įgėris, atitinkantis sąlyčiui su vandeniu naudojamą medieną	

Naudojimas

Naudojimo būdas	
Naudojimo data	
Įgėrio apskaičiavimo formulė:	
Kondicionavimo procedūra	
Kondicionavimo trukmė	
Galų sandarinimo priemonė / jos naudojimo kartų skaičius	
Paskesnis apdorojimas	jei tinka

Bandiniai

Medienos rūšis	
Medienos tankis	(minimalus … vidutinė vertė … maksimalus)
Augimo sparta (rievių skaičius kas 10 mm)	(minimalus … vidutinė vertė … maksimalus)
Drėgmės kiekis	

▼M6

Bandymo sąrankos (*)	**Įgėris (pvz., kg/m^3)**
Apdorotas „x“	5 bandinių vidutinė vertė ir standartinis nuokrypis arba intervalas
Apdorotas „y“	5 bandinių vidutinė vertė ir standartinis nuokrypis arba intervalas
Apdorotas „z“	5 bandinių vidutinė vertė ir standartinis nuokrypis arba intervalas
Neapdorotas	
Bandymo metodo parametrų kitimas	pvz., vandens kokybės, bandinių matmenų ir kt.

(*) x, y, z atitinka tris kartotinius bandinius.

▼M6

Laikas	Vandens keitimas	Bandinio masė		Vandens sugertis		Vandens ėminys				
		Apdorotas (vidurkis)	Neapdorotas	Apdorotas (vidurkis)	Neapdorotas		Bandymo vanduo	x	y	z
	Data	g	g	g	g	no.	pH	pH	pH	pH
pradžia										
6 h						1				
24 h						2				
2 d						3				
4 d						4				
8 d						5				
15 d						6				
22 d						7				
29 d						8				

▼M6

Būtina paruošti kiekvieno veikliojo komponento atskiras lenteles

Laikas	Vandens keitimas	Analizės rezultatai															
		Neapdoroti bandiniai			Apdoroti bandiniai												
		Analitės koncentracija vandenyje mg/l	Išsiskyręs kiekis mg/m^2	Išmetalų išsiskyrimo sparta $mg/m^2/d$	Analitės koncentracija vandenyje				Išsiskyręs kiekis				Išmetalų išsiskyrimo sparta			
					x	y	z	Vidurkis	x	y	z	Vidurkis	x	y	z	Vidurkis
	Data				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$
6 h																
24 h																
2 d																
4 d																
8 d																
15 d																
22 d																
29 d																

Pastaba: Kadangi neapdorotų bandinių rezultatai gali būti naudojami apdorotų bandinių išmetalų išsiskyrimo spartos pataisoms daryti, neapdorotų bandinių rezultatai turi būti užrašomi pradžioje ir visos apdorotų bandinių vertės būtų „pataisytos vertės“. Taip pat gali būti padaryta pataisa dėl pradinės vandens analizės.

▼**M6**

2 priedėlis

Apibrėžtys

Cheminė medžiaga– medžiaga arba mišinys.

Bandomoji cheminė medžiaga– naudojant šį bandymo metodą tiriama cheminė medžiaga arba mišinys.

▼M6

C.46. BIOLOGINIS KAUPIMASIS NUOSĖDOSE GYVENANČIOSE DUGNO MAŽAŠERĖSE ŽIEDUOTOSIOSIOSE KIRMĖLĖSE

ĮVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) Nr. 315 (2008). Nuosėdas ryjančius dugno gyvūnus gali veikti nuosėdų surištos cheminės medžiagos (1). Tarp šių nuosėdas ryjančių gyvūnų vandens mažašerės žieduotosios kirmėlės vaidina svarbų vaidmenį vandens sistemų dugne. Jos gyvena nuosėdose ir dažnai reprezentuoja gausiausią rūšį, ypač buveinėse, kurių aplinkos sąlygos yra nepalankios kitiems gyvūnams. Dėl nuosėdų bioturbacijos ir būdami grobiu šie gyvūnai gali daryti didelę įtaką kitų organizmų, pvz., dugno plėšriųjų žuvų, tokių cheminių medžiagų biologiniam įsisavinamumui. Kitaip nei priedugnio organizmai, dugno vandens mažašerės žieduotosios kirmėlės įsirausia į nuosėdas ir ryja jų daleles nuosėdų viduje. Todėl yra daug kelių, kuriais cheminės medžiagos gali veikti šiuos organizmus, įskaitant tiesioginį sąlytį, užterštų nuosėdų dalelių, porų vandens ir virš nuosėdų esančio vandens rijimą. Kai kurios dugno mažašerių žieduotųjų kirmėlių rūšys, šiuo metu naudojamos atliekant ekotoksikologinius bandymus, yra aprašytos 6 priedėlyje.

2. Cheminės medžiagos biologinio kaupimosi apibūdinimo parametrus sudaro, visų pirma, biologinio kaupimosi faktorius (BAF), nuosėdų sugerties greičio konstanta (k_s) ir šalinimo greičio konstanta (k_e). Išsamios šių parametrų apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

3. Norint apskritai įvertinti cheminių medžiagų biologinio kaupimosi potencialą ir ištirti cheminių medžiagų, kurios linkusios pasiskirstyti į nuosėdas ir ant jų, biologinį kaupimąsi, reikia turėti su aplinkos komponentais susijusį bandymo metodą (1)(2)(3)(4).

4. Šis bandymo metodas yra su nuosėdomis susijusių cheminių medžiagų biologinio kaupimosi dugno mažašerėse žieduotosiose kirmėlėse vertinimo metodas. Nuosėdos sodrinamos bandomąja chemine medžiaga. Sodrintų nuosėdų naudojimo tikslas yra modeliuoti užterštas nuosėdas.

5. Šis metodas pagrįstas esamais nuosėdų toksiškumo ir biologinio kaupimosi bandymo metodais (1)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Kiti naudingi dokumentai yra: tarptautinio seminaro diskusijos ir rezultatų svarstymas (11) ir tarptautinio tarplaboratorinio tyrimo rezultatai (12).

6. Šis bandymas taikomas stabilioms, neutralioms organinėms cheminėms medžiagoms, kurios yra linkusios jungtis su nuosėdomis. Šiuo metodu taip pat galima matuoti su nuosėdomis sujungtus stabilius metaloorganinius junginius (12). Jis netinka metalams ir kitiems mikroelementams (11), nepakeitus bandymo schemos atsižvelgiant į substratą bei vandens tūrius ir, galbūt, audinio bandinio matmenis.

BŪTINOS SĄLYGOS IR INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

7. Šiuo metu yra tik kelios tinkamai nustatytos sandaros ir aktyvumo kiekybinės priklausomybės (QSAR), susijusios su biologinio kaupimosi procesais (14). Plačiausiai taikomas santykis yra koreliacija tarp stabilių organinių cheminių medžiagų biologinio kaupimosi bei biologinio koncentravimo ir jų lipofiliškumo (išreikšto kaip oktanolio ir vandens pasiskirstymo koeficiento logaritmas (log K_{ow}); dėl apibrėžties žr. 1 priedėlį), kuri buvo sukurta siekiant aprašyti cheminės medžiagos pasiskirstymą tarp vandens ir žuvų. Taikant šią priklausomybę taip pat buvo nustatytos nuosėdų terpės koreliacijos (15)(16)(17)(18). log K_{ow} ir log BCF koreliacija, kaip pagrindinė QSAR, gali būti naudinga atliekant su nuosėdomis sujungtų cheminių medžiagų biologinio kaupimosi potencialo parengiamąjį įvertinimą. Tačiau BAF gali turėti įtaką bandymo organizmo lipidų kiekis ir nuosėdų organinės anglies kiekis. Todėl organinės anglies ir vandens pasiskirstymo koeficientas

▼M6

(K_{oc}) taip pat gali būti naudojamas kaip pagrindinis su nuosėdomis sujungtų cheminių medžiagų biologinio kaupimosi lemiamas veiksnys.

8. Šis bandymas tai pat tinka:

— stabilioms organinėms cheminėms medžiagoms, kurių log K_{ow} vertės yra nuo 3,0 iki 6,0 (5)(19) ir ypač lipofilinėms cheminėms medžiagoms, kurių log K_{ow} yra didesnis kaip 6,0 (5);

— cheminėms medžiagoms, kurios priklauso organinių medžiagų, žinomų dėl jų biologinio kaupimosi gyvuose organizmuose potencialo, klasei, pvz., paviršinio aktyvumo medžiagų arba stipriai adsorbuojamų cheminių medžiagų (pvz., didelis K_{oc}).

9. Prieš tyrimo pradžią reikėtų gauti informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą, pvz., apie saugos priemones, tinkamas laikymo sąlygas bei stabilumą ir analizės metodus. Cheminių medžiagų, kurių fizikinės ir cheminės savybės apsunkina jų tyrimą, bandymo rekomendacijos pateiktos (20) ir (21). Prieš atliekant biologinio kaupimosi bandymą su vandens mažašerėmis žieduotosiomis kirmėlėmis, reikėtų žinoti šią informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą:

— bendrinis pavadinimas, cheminis pavadinimas (pageidautina, IUPAC pavadinimas), CAS registracijos numeris, grynumas;

— tirpumas vandenyje [A.6 bandymo metodas (22)];

— oktanolio ir vandens pasiskirstymo koeficientas, K_{ow} [A.8, A.24 bandymo metodai (22)];

— pasiskirstymo tarp nuosėdų ir vandens koeficientas, išreikštas kaip K_d ar K_{oc} [C.19 bandymo metodas (22)];

— hidrolizė [C.7 bandymo metodas (22)];

— fotocheminis virsmas vandenyje (23);

— garų slėgis [A.4 bandymo metodas (22)];

— lengvas biologinis skaidumas [C.4 ir C.29 bandymo metodai (22)];

— paviršiaus įtemptis [A.5 bandymo metodas (22)];

— kritinė micelių susidarymo koncentracija (24).

Be to, būtų svarbi ši informacija, jei yra:

— biologinis skaidumas vandeninėje aplinkoje [C.24 ir C.25 bandymo metodai (22)];

— Henrio dėsnio konstanta.

10. Radioaktyviaisiais izotopais žymėtosios bandomosios cheminės medžiagos gali palengvinti vandens, nuosėdų ir biologinių ėminių analizę, ir gali būti naudojamos tam, kad būtų nustatyta, ar reikėtų atlikti skaidymo produktų

▼M6

identifikavimą ir kiekybinį nustatymą. Šiame dokumente aprašyto metodo tinkamumas buvo patvirtintas atliekant tarptautinį tarplaboratorinį ^{14}C žymėtųjų cheminių medžiagų tyrimą (12). Jei matuojamas suminis radioaktyviųjų likučių kiekis, biologinio kaupimosi faktorius (BAF) yra pagrįstas pradine chemine medžiaga, įskaitant visus išlikusius skaidymo produktus. Taip pat galima sujungti metabolizmo tyrimą su biologinio kaupimosi tyrimu atliekant pradinės cheminės medžiagos ir jos skaidymo produktų analizę ir kiekybinį procentinės dalies nustatymą ėminiuose, paimtuose sugėrimo tarpsnio pabaigoje arba esant didžiausiam biologinio kaupimosi lygiui. Visais atvejais rekomenduojama, kad BAF skaičiavimas būtų pagrįstas pradinės cheminės medžiagos koncentracija organizmuose, bet ne tik suminiu radioaktyviųjų likučių kiekiu.

11. Be bandomosios cheminės medžiagos savybių, kita reikiama informacija yra toksiškumas bandymams naudojamų mažašerių žieduotųjų kirmėlių rūšims, pvz., medianinė mirtina koncentracija (LC_{50}) esant būtinai sugėrimo tarpsnio trukmei, siekiant užtikrinti, kad parinktos ekspozicijos koncentracijos vertės yra gerokai mažesnės nei toksiniai lygiai. Pirmenybė turėtų būti teikiama toksiškumo vertėms, gautoms atliekant subletalių vertinamųjų baigčių (EC_{50}) ilgalaikius tyrimus, jei yra. Jei tokių duomenų nėra, naudingos informacijos gali suteikti ūmaus toksiškumo bandymas, atliekamas biologinio kaupimosi bandymą atitinkančiomis sąlygomis, arba kitoms pakaitinėms rūšims gauti toksiškumo duomenys.

12. Būtina turėti tinkamą žinomo tikslumo, preciziškumo ir jautrio analizės metodą bandomosios medžiagos koncentracijai bandymo tirpaluose, nuosėdose ir biologinėje medžiagoje nustatyti, ėminių ruošimo ir laikymo duomenis ir medžiagų saugos duomenų lapus. Taip pat reikėtų žinoti bandomosios cheminės medžiagos analizinio aptikimo vandenyje, nuosėdose ir kirmėlių audinyje ribas. Jei naudojama žymėtoji cheminė medžiaga, turi būti žinomas jos savitasis aktyvumas (t. y. $Bq \cdot mol^{-1}$), žymėtojo atomo padėtis ir su priemaišomis susijusio radioaktyvumo procentinė dalis. Bandomosios cheminės medžiagos savitasis aktyvumas turėtų būti kuo didesnis, kad būtų galima nustatyti kuo mažesnę koncentraciją (11).

13. Reikėtų turėti informacijos apie naudojamų nuosėdų charakteristikas (pvz., nuosėdų arba jų sudedamųjų dalių kilmę, porų vandens pH ir amoniako koncentraciją (natūralių nuosėdų), organinės anglies kiekį (TOC), dalelių dydžio pasiskirstymą (smėlio, dumblo ir molio procentinę dalį) ir sausos medžiagos masės procentinę dalį (6).

BANDYMO PRINCIPAS

14. Bandymą sudaro du tarpsniai; sugerties (ekspozicijos) tarpsnio ir pašalinimo (poekspozicinio) tarpsnio. Sugerties tarpsniu kirmėlės veikiamos bandomąja chemine medžiaga sodrintomis nuosėdomis, ant kurių užpilta atkurtojo vandens ir pasiekta reikiama pusiausvyra (11). Kontrolinių kirmėlių grupės laikomos vienodomis sąlygomis, bet be bandomosios cheminės medžiagos.

15. Šalinimo tarpsniu kirmėlės pernešamos į nuosėdų ir vandens sistemą be bandomosios cheminės medžiagos. Šalinimo tarpsnis yra būtinas tam, kad būtų gauta informacija apie greitį, kuriuo bandomoji cheminė medžiaga pasišalina iš bandymo organizmų (19)(25). Šalinimo tarpsnis yra būtinas visuomet, išskyrus atvejus, kai bandomosios cheminės medžiagos sugertis ekspozicijos tarpsniu buvo nereikšminga (pvz., nėra statistinio skirtumo tarp bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos bandymo ir jos koncentracijos kontrolinėse kirmėlėse). Jei sugerties tarpsniu pastovioji būsena nepasiekiama, kinetinius duomenis, BAF_k, sugerties ir šalinimo greičio konstantą (-as), galima nustatyti pagal šalinimo tarpsnio rezultatus. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kitimas kirmėlėse ir ant jų stebimas abiem bandymo tarpsniais.

16. Sugerties tarpsniu matuojama tol, kol BAF pasiekia pastoviąją būseną. Numatytoji sugerties tarpsnio trukmė turėtų būti 28 dienos. Praktinė patirtis parodė, kad kelioms stabilioms neutralioms organinėms cheminėms medžiagoms pakanka nuo 12 iki 14 dienų sugerties tarpsnio pastoviajai būsenai pasiekti (6)(8)(9).

▼M6

17. Tačiau, jei pastovioji būsena nepasiekiama per 28 dienas, pradedamas šalinimo tarpsnis, veiktas mažašeres žieduotąsias kirmėles pernešant į indus su ta pačia terpe be bandomosios cheminės medžiagos. Šalinimo tarpsnis baigiamas, kai koncentracija pasiekia 10 % koncentracijos, išmatuotos kirmėlėse sugerties tarpsnio 28 dieną, arba ne vėliau kaip po 10 dienų. Liekamoji koncentracija kirmėlėse šalinimo tarpsnio pabaigoje ataskaitoje nurodoma kaip papildoma vertinamoji baigtis, pvz., kaip nepašalintieji likučiai (NER). Pageidautina biologinio kaupimosi faktorių (BAF_{ss}) apskaičiuoti kaip tariamosios pastoviosios būsenos koncentracijos kirmėlėse (C_a) ir nuosėdose (C_s) santykį ir kaip kinetinį biologinio kaupimosi faktorių BAF_K' kaip sugerties iš nuosėdų greičio konstantos (k_s) ir šalinimo greičio konstantos (k_e) santykį, darant prielaidą dėl pirmojo laipsnio kinetikos. Jei pastovioji būsena nepasiekiama per 28 dienas, BAF_K skaičiuojamas pagal sugerties greičio ir šalinimo greičio konstantą (-as). Dėl skaičiavimo žr. 2 priedėlį. Jei pirmojo laipsnio kinetika netinka, reikėtų taikyti sudėtingesnius modelius (2 priedėlis ir (25) nuoroda).

18. Jei pastovioji būsena nepasiekiama per 28 dienas, sugerties tarpsnį pasirinktinai galima pratęsti, toliau matuojant veikiamų kirmėlių grupes, jei yra, tol, kol pasiekiama pastovioji būsena; tačiau 28 dieną nuo sugerties tarpsnio pradžios lygiagrečiai reikėtų pradėti šalinimo tarpsnį.

19. Sugerties greičio konstanta, šalinimo greičio konstanta (arba konstantos, jei įtraukti sudėtingesni modeliai), kinetinis biologinio kaupimosi faktorius (BAF_K) ir, jei įmanoma, kiekvieno iš šių parametrų pasikliovimo ribos skaičiuojamos pagal kompiuterizuoto modelio lygtis (dėl modelių žr. 2 priedėlį). Visų modelių sutapties laipsnis gali būti nustatytas pagal koreliacijos koeficientą arba determinacijos koeficientą (sutaptis gera, jei koeficientai yra arti 1).

20. Siekiant sumažinti ypač lipofilinių organinių cheminių medžiagų rezultatų kintamumą, biologinio kaupimosi faktorius papildomai reikėtų išreikšti bandymo organizmų lipidų kiekio ir nuosėdų organinės anglies kiekio (TOC) atžvilgiu (biotos-nuosėdų kaupimosi faktorius arba BSAF kg nuosėdų TOC kg^{-1} kirmėlių lipidų kiekio). Šis būdas pagrįstas patirtimi ir teorinėmis koreliacijomis, nustatytomis vandeninei terpei, kurioje kai kurios cheminių junginių klasės rodo aiškų ryšį tarp cheminės medžiagos biologinio kaupimosi potencialo ir jos lipofiliškumo, kuris tinkamai nustatytas žuvims kaip modeliniams organizmams (14)(25)(27). Taip pat yra ryšys tarp bandymo žuvies lipidų kiekio ir stebimo tokių cheminių medžiagų biologinio kaupimosi. Dugno organizmams buvo nustatytos panašios koreliacijos (15)(16)(17)(18). Jei pakanka turimo kirmėlių audinio, bandymo gyvūnų lipidų kiekį galima nustatyti naudojant bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatyti naudotą biologinę medžiagą. Tačiau lipidų kiekiui nustatyti patogu naudoti aklimatizuotus kontrolinius gyvūnus, bent jau sugerties tarpsnio pradžioje arba, pageidautina, sugerties tarpsnio pabaigoje, tada šį kiekį galima naudoti BAF vertėms normalizuoti.

BANDYMO TINKAMUMAS

21. Taikomos šios bandymo tinkamumo sąlygos:

— suminis kirmėlių gaištamumas (kontrolinių ir bandomųjų ėminių) iki bandymo pabaigos neturėtų būti didesnis kaip 20 % pradinio skaičiaus.

— Be to, reikėtų įrodyti, kad kirmėlės įsirausia į nuosėdas, kad būtų įmanoma maksimali ekspozicija. Išsamesnė informacija pateikta 28 pastraipoje.

▼M6

METODO APRAŠYMAS

Bandomųjų gyvūnų rūšys

22. Bandymui galima naudoti kelias vandens mažašerių žieduotųjų kirmėlių rūšis. Dažniausiai naudojamos rūšys išvardytos 6 priedėlyje.

23. Reguliariai (pvz., kas mėnesį) reikėtų atlikti toksiškumo bandymus (96 h, tik vandenyje), naudojant etaloninę toksinę cheminę medžiagą, pvz., kalio chloridą (KCl) ar vario sulfatą ($CuSO_4$) (1), kad būtų įrodyta bandymo gyvūnų sveikatos būklė (1)(6). Jei etaloniniai toksiškumo bandymai neatliekami reguliariai, etalonine chemine medžiaga reikėtų patikrinti organizmų partiją, skirtą nuosėdų biologinio kaupimosi bandymui. Lipidų kiekio matavimas taip pat galėtų suteikti naudingos informacijos apie gyvūnų būklę.

Bandymo organizmų kultūra

24. Siekiant turėti kirmėlių skaičių, kurio pakaktų biologinio kaupimosi bandymams, jas gali tekti laikyti nuolatinėje vienos rūšies laboratorijos kultūroje. Parinktų bandomųjų gyvūnų rūšių laboratoriniai auginimo metodai apibendrinti 6 priedėlyje. Išsamesnė informacija pateikta (8)(9)(10)(18)(28)(29)(30)(31)(32) nuorodose.

Aparatūra

25. Reikėtų imtis priemonių, kad visoms įrangos dalims nebūtų naudojamos medžiagos, kurios gali ištirpti, absorbuoti bandomąsias chemines medžiagas arba išplauti kitas chemines medžiagas ir neigiamai paveikti bandymo gyvūnus. Galima naudoti standartines stačiakampio arba ritinio formos kameras, pagamintas iš chemiškai inertinės medžiagos ir reikiamos talpos, kuri atitiktų įkrovos dydį, t. y. galimą bandymo kirmėlių skaičių. Nereikėtų naudoti minkštų plastikinių vamzdžių vandeniui arba orui tiekti. Įranga, kuri liečiasi su bandymo terpe, turėtų būti pagaminta iš nerūdijančiojo plieno ir (arba) stiklo. Medžiagoms, kurios turi didelį adsorbcijos koeficientą, pvz., sintetiniams piretroidams, gali būti reikalingas silanizuotas stiklas. Šiomis sąlygomis įranga po naudojimo turėtų būti išmesta (5). Reikėtų imtis priemonių, kad žymėtosios ir lakiosios bandomosios cheminės medžiagos negalėtų pasišalinti arba būtų sugaudytos. Reikėtų naudoti gaudykles (pvz., stiklines dujų plovimo kolbas) su tinkamais absorbentais, kurie sulaikytų visus iš bandymo kamerų garuojančius likučius (11).

Vanduo

26. Vanduo virš nuosėdų turi būti tokios kokybės, kad bandomieji gyvūnai galėtų išgyventi visą aklimatizavimo ir bandymo laikotarpių trukmę ir nebūtų matyti jokios jų nenormalios išvaizdos ar elgesio. Kaip vandenį virš nuosėdų, kuris būtų naudojamas bandymams atlikti ir laboratorinėms kirmėlių kultūroms auginti, rekomenduojama naudoti atkurtąjį vandenį pagal bandymo metodą C.1 (25). Įrodyta, kad šiame vandenyje gali išgyventi, augti ir daugintis kelios rūšys (8) ir užtikrinamas maksimalus bandymo ir auginimo sąlygų standartizavimas. Vandenį reikėtų apibūdinti, nurodant bent pH, laidį ir kietumą. Naudingos informacijos būtų galima gauti atliekant vandens mikroteršalų analizę, prieš jį naudojant (4 priedėlis).

27. Vanduo turėtų būti pastovios kokybės visą bandymo laikotarpį. Vandens virš nuosėdų pH turėtų būti nuo 6 iki 9. Suminis kietumas bandymo pradžioje turėtų būti nuo 90 iki 400 mg $CaCO_3$ litrui (7). Pirmiau nurodyto atkurtojo vandens pH ir kietumo intervalas pateiktas bandymo metode C.1 (25). Jei

▼M6

manoma, kad gali būti sąveika tarp kietumo jonų ir bandomosios cheminės medžiagos, reikėtų naudoti mažesnio kietumo vandenį. 4 priedėlyje apibendrinami papildomi priimtino skiedimo vandens kriterijai pagal EBPO TG 210 (34).

Nuosėdos

28. Nuosėdos turi būti tokios kokybės, kad bandymo organizmai galėtų išgyventi ir, pageidautina, daugintis visą aklimatizavimo ir bandymo laikotarpių trukmę ir nebūtų matyti jokios jų nenormalios išvaizdos arba elgesio. Kirmėlės turėtų įsirausti į nuosėdas. Įsirausimo elgesys gali turėti įtakos ekspozicijai, taigi ir BAF. Todėl reikėtų užrašyti bandymo organizmų vengimą raustis į nuosėdas arba jų įsirausimo elgesį, jei vandens virš nuosėdų drumstumas sudaro sąlygas tokiems stebėjimams atlikti. Kirmėlės (kontrolinių ir apdorotų ėminių) turėtų įsirausti į nuosėdas per 24 h jas suleidus į indus. Stebimas nuolatinis nenoras įsirausti arba nuosėdų vengimas (pvz., daugiau kaip 20 % ilgiau kaip pusę sugerties tarpsnio trukmės) rodo, kad yra netinkamos bandymo sąlygos arba bandymo organizmai nesveiki, arba šią reakciją sukelia bandomosios cheminės medžiagos koncentracija. Tokiu atveju bandymas turėtų būti stabdomas ir kartojamas geresnėmis sąlygomis. Papildomos informacijos apie nuosėdų rijimą galima gauti taikant metodus, aprašytus (35)(36), kurie apibūdina nuosėdų rijimą arba dalelių atranką atliekant bandymus su bandymo organizmais. Jei nuosėdų paviršiuje stebimos išmatų granulės, kurios rodo, kad kirmėlės ryja nuosėdas, arba jei išmatų nėra, tai reikėtų užrašyti ir atsižvelgti, aiškinant bandymo rezultatus, susijusius su ekspozicijos keliais.

29. Bandymams ir kirmėlių laboratorijų kultūroms rekomenduojama naudoti dirbtines nuosėdas, kurių pagrindinė dalis yra dirbtinis dirvožemis, aprašytas bandymo metode C.8 (40) (5 priedėlis), nes reikiamos kokybės natūralių nuosėdų gali būti neįmanoma gauti ištisus metus. Be to, įtaką bandymui galėtų daryti natūralių nuosėdų vietiniai organizmai, taip pat galimi mikroteršalai. Dirbtinėse nuosėdose gali išgyventi, augti ir daugintis kelių rūšių bandomieji gyvūnai (8).

30. Dirbtines nuosėdas turėtų apibūdinti bent sudedamųjų dalių kilmė, dalelių dydžio pasiskirstymas (smėlio, dumblo ir molio procentinė dalis), organinės anglies kiekis (TOC), vandens kiekis ir pH. Galima išmatuoti oksidacijos-redukcijos potencialą. Tačiau, kaip bandymo ir (arba) kultūros nuosėdas galima naudoti natūralias nuosėdas iš neužterštų vietų (1). Natūralias nuosėdas turėtų apibūdinti kilmė (surinkimo vieta), porų vandens pH ir amoniako kiekis, organinės anglies kiekis (TOC), dalelių dydžio pasiskirstymas (smėlio, dumblo ir molio procentinė dalis) ir vandens kiekio procentinė dalis (6). Jei manoma, kad gali susidaryti amoniakas, natūralias nuosėdas rekomenduojama prieš sodrinant bandomąja chemine medžiaga kondicionuoti septynias dienas tomis pačiomis sąlygomis, kurios vyrautų vėliau atliekant bandymą. Pasibaigus šiam kondicionavimo laikotarpiui, vanduo virš nuosėdų turėtų būti pašalintas ir išpiltas. Naudingos informacijos būtų galima gauti atliekant nuosėdų arba jų sudedamųjų dalių mikroteršalų analizę prieš jas naudojant.

Ruošimas

31. Natūralių nuosėdų apdorojimas prieš jas naudojant laboratorijoje aprašytas (1)(6)(44). Dirbtinių nuosėdų ruošimas aprašytas 5 priedėlyje.

▼M6

Laikymas

32. Natūralias nuosėdas reikėtų laikyti laboratorijoje kuo trumpiau. JAV EPA (6) rekomenduoja laikyti ne ilgiau kaip 8 savaites tamsoje ir 4 °C ± 2 °C temperatūroje. Laikymo talpyklose virš nuosėdų neturėtų būti viršutinės erdvės. Rekomendacijos dėl dirbtinių nuosėdų laikymo pateiktos 5 priedėlyje.

Bandomosios cheminės medžiagos įterpimas

33. Nuosėdos sodrinamos bandomąja chemine medžiaga. Sodrinimo procedūrą sudaro vieno arba kelių nuosėdų sudedamųjų dalių padengimas bandomąja chemine medžiaga. Pavyzdžiui, kvarcinis smėlis arba jo dalis (pvz., 10 g kvarcinio smėlio vienam bandymo indui) gali būti mirkomas bandomosios cheminės medžiagos tirpalu tinkamame tirpiklyje, kuris paskui lėtai išgarinamas iki sauso likučio. Paskui padengtą frakciją galima sumaišyti su šlapiomis nuosėdomis. Į smėlio kiekį, gautą su bandomosios cheminės medžiagos ir smėlio mišiniu, turi būti atsižvelgta ruošiant nuosėdas, t. y. jas reikėtų ruošti imant mažiau smėlio (6).

34. Bandomąją cheminę medžiagą galima įterpti į natūralias nuosėdas, sodrinant sausą nuosėdų dalį, kaip aprašyta pirmiau kalbant apie dirbtines nuosėdas, arba įmaišant bandomąją cheminę medžiagą į šlapias nuosėdas ir vėliau išgarinant naudotą soliubilizavimo priemonę. Tinkami tirpikliai šlapioms nuosėdoms sodrinti – etanolis, metanolis, 2-metoksietanolis, etilenglikolio dimetileteris, dimetilformamidas ir trietilenglikolis (5)(34). Tirpiklio toksiškumas ir lakumas bei bandomosios cheminės medžiagos tirpumas pasirinktame tirpiklyje turėtų būti pagrindiniai soliubilizavimo priemonės pasirinkimo kriterijai. Papildomos rekomendacijos dėl sodrinimo procedūrų pateiktos *Environment Canada* (1995)(41). Reikėtų imtis priemonių užtikrinti, kad į nuosėdas įterpta bandomoji cheminė medžiaga būtų visiškai ir tolygiai paskirstyta nuosėdose. Reikėtų analizuoti kartotinius sodrintų nuosėdų poėminius, kad būtų patikrinta bandomosios cheminės medžiagos koncentracija nuosėdose ir nustatytas bandomosios cheminės medžiagos paskirstymo vienalytiškumo laipsnis.

35. Pageidautina, kad paruoštas sodrintas nuosėdas užpylus vandeniu, būtų palikta laiko bandomajai cheminei medžiagai pasiskirstyti tarp nuosėdų ir vandeninės fazės. Būtų gerai, jei tai būtų daroma bandymo temperatūros ir aeravimo sąlygomis. Reikiama pusiausvirinimo trukmė priklauso nuo nuosėdų ir cheminės medžiagos savybių ir gali būti nuo kelių valandų iki kelių dienų, o retais atvejais – iki kelių savaičių (4–5 savaičių) (28)(42). Atliekant šį bandymą, pusiausvyros nelaukiama, bet rekomenduojamas pusiausvirinimo laikotarpis nuo 48 h iki 7 dienų. Atsižvelgiant į tyrimo tikslą, pvz., kai reikia modeliuoti aplinkos sąlygas, sodrintos nuosėdos gali būti pusiausvirinamos arba sendinamos ilgesnį laiko tarpą (11).

BANDYMO EIGA

Parengiamasis bandymas

36. Gali būti naudinga atlikti parengiamąjį bandymą, kad būtų galima optimizuoti galutinio bandymo sąlygas, pvz., pasirinkti bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertę (-es) ir sugerties bei šalinimo tarpsnių trukmę. Atliekant parengiamąjį bandymą, reikėtų stebėti ir užrašyti kirmėlių elgesį, pvz., kad jos vengia nuosėdų, t. y. kirmėlės išsikapsto iš nuosėdų gal būt dėl bandomosios cheminės medžiagos ir (arba) dėl pačių nuosėdų. Nuosėdų vengimą taip pat galima naudoti kaip parengiamojo bandymo

▼M6

subletalų parametrą, kad būtų galima įvertinti bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertę (-es), naudojamą (-as) atliekant biologinio kaupimosi bandymą.

Ekspozicijos sąlygos

Sugerties tarpsnio trukmė

37. Bandymo organizmai veikiami bandomąja medžiaga sugerties tarpsniu. Pirmąjį ėminį reikėtų paimti nuo 4 h iki 24 h nuo sugerties tarpsnio pradžios. Sugerties tarpsnis turėtų trukti iki 28 dienų (1)(6)(11), išskyrus atvejus, kai galima įrodyti, kad pusiausvyra pasiekiama anksčiau. Pastovioji būsena yra tada, kai: (i) biologinio kaupimosi faktorių kaip laiko funkcijos grafikas kiekvienu ėminių ėmimo laikotarpiu yra lygiagretus laiko ašiai; (ii) trijų nuoseklių, ne mažiau kaip kas dvi dienas paimtų ėminių BAF analizės duomenys skiriasi ne daugiau kaip ± 20 %; ir (iii) nėra reikšmingų skirtumų tarp trijų ėminių ėmimo laikotarpių (pagrįstų statistiniu palyginimu, pvz., dispersine analize ir regresine analize). Jei pastovioji būsena nepasiekiama per 28 dienas, sugerties tarpsnį galima baigti pradedant šalinimo tarpsnį, o BAF_K galima apskaičiuoti pagal sugerties ir šalinimo greičių konstantas (taip pat žr. 16–18 pastraipas).

Šalinimo tarpsnio trukmė

38. Pirmąjį ėminį reikėtų paimti nuo 4 h iki 24 h nuo šalinimo tarpsnio pradžios, nes pradiniu laikotarpiu gali įvykti staigūs pokyčiai audinių likučiuose. Šalinimo tarpsnį rekomenduojama baigti, kai bandomosios cheminės medžiagos koncentracija yra mažesnė kaip 10 % pastoviosios būsenos koncentracijos arba ne vėliau kaip po 10 dienų. Likučių koncentracija kirmėlėse šalinimo tarpsnio pabaigoje pateikiama ataskaitoje kaip antrinė vertinamoji baigtis. Tačiau laikotarpio trukmę gali reguliuoti laikotarpis, kurį bandomosios cheminės medžiagos koncentracija kirmėlėse yra didesnė nei analizės aptikimo riba.

Bandymo organizmai

Bandymo kirmėlių skaičius

39. Vienam ėminiui tenkantis kirmėlių skaičius turi užtikrinti tokią kirmėlių audinio masę, kad ėminiui tenkanti bandomosios cheminės medžiagos masė sugerties tarpsnio pradžioje ir šalinimo tarpsnio pabaigoje būtų gerokai didesnė nei bandomosios cheminės medžiagos aptikimo biologinėje medžiagoje riba. Išvardytų sugerties ir šalinimo tarpsnių stadijų metu koncentracija bandymo gyvūnuose paprastai yra palyginti maža (6)(8)(18). Kadangi daugelio rūšių vienos vandens mažašerės žieduotosios kirmėlės masė yra labai maža (*Lumbriculus variegatus* ir *Tubifex tubifex*vienos kirmėlės šlapio kūno masė yra 5–10 mg), tam tikros kartotinių bandinių bandymo kameros visos kirmėlės gali būti sujungtos jas sveriant ir atliekant bandomosios cheminės medžiagos analizę. Jei rūšies atskiro gyvūno masė yra didesnė (pvz., *Branchiura sowerbyi*), galima naudoti kartotinius bandinius su vienu gyvūnu, bet tokiu atveju kartotinių bandinių skaičių reikėtų padidinti iki penkių vienam ėminių ėmimo taškui (11). Tačiau reikėtų pastebėti, kad *B. sowerbyi* nebuvo įtraukta į tarplaboratorinį tyrimą (12), todėl nerekomenduojama kaip šio metodo pageidautina rūšis.

40. Reikėtų naudoti panašaus dydžio kirmėles (apie *L. variegatus* žr. 6 priedėlį). Jos turėtų būti iš vieno šaltinio suaugę arba dideli gyvūnai tos pačios amžiaus klasės (žr. 6 priedėlį). Gyvūno masė ir amžius gali daryti didelę įtaką BAF vertėms (pvz., dėl skirtingo lipidų kiekio ir (arba) kiaušinėlių buvimo); šiuos parametrus reikėtų tiksliai užrašyti. Norint išmatuoti vidutinę šlapio ir sauso kūno masę, prieš bandymą reikėtų pasverti kirmėlių imties dalį.

▼M6

41. Manoma, kad *Tubifex tubifex* ir *Lumbriculus variegatus* bandymo laikotarpiu gali daugintis. Jei atliekant biologinio kaupimosi bandymą reprodukcija nevyksta, tai reikėtų užrašyti ir atsižvelgti aiškinant bandymo rezultatus.

Įkrova

42. Reikėtų naudoti didelius nuosėdų ir kirmėlių bei vandens ir kirmėlių santykius, kad sugerties tarpsniu kuo mažiau sumažėtų bandomosios cheminės medžiagos koncentracija ir būtų išvengta ištirpusio deguonies koncentracijos mažėjimo. Pasirinktas įkrovos dydis taip pat turėtų atitikti pasirinktų rūšių natūralių populiacijų tankius (43). Pavyzdžiui *Tubifex tubifex* rekomenduojamas įkrovos dydis yra 1–4 mg (šlapio) kirmėlės audinio masės vienam gramui šlapių nuosėdų (8)(11). Nuorodose (1) ir (6) rekomenduojamas *L. variegatus* įkrovos dydis – ≤ 1 g sauso kirmėlių audinio masės 50 g nuosėdų organinės anglies.

43. Bandymui atlikti naudojamos kirmėlės išimamos iš auginimo kultūros sijojant kultūros nuosėdas. Gyvūnai (suaugusios arba didelės kirmėlės, neturinčios neseniai įvykusio dalijimosi požymių) pernešami į stiklines lėkšteles (pvz., Petri lėkšteles) su švariu vandeniu. Jei bandymo sąlygos skiriasi nuo auginimo kultūros sąlygų, turėtų pakakti 24 h aklimatizavimo tarpsnio. Prieš sveriant, nuo kirmėlių reikėtų pašalinti vandens perteklių. Tai galima atlikti atsargiai padedant kirmėles ant prieš tai suvilgytos popierinės servetėlės. Nerekomenduojama naudoti sugeriamąjį popierių kirmėlėms nusausinti, nes taip galima sukelti stresą arba kirmėles sužaloti. Brunson ir kt. (1998) rekomenduoja naudoti nesausintas kirmėles, kurių masė būtų maždaug 1,33 karto didesnė nei tikslinė biomasė. Šie papildomi 33 % atitinka skirtumą tarp nesausintų ir sausintų kirmėlių (28).

44. Sugerties tarpsnio pradžioje (bandymo 0 diena) bandymo organizmai išimami iš aklimatizavimo kameros ir atsitiktinai paskirstomi į indus (pvz., Petri lėkšteles) su atkurtuoju vandeniu, į kiekvieną indą dedant po dvi kirmėles tol, kol kiekviename inde bus dešimt kirmėlių. Tada kiekviena tokia grupė atsitiktinai pernešama į atskirus bandymo indus, pvz., minkštu plieniniu pincetu. Bandymo indai inkubuojami bandymo sąlygomis.

Maitinimas

45. Atsižvelgiant į mažą dirbtinių nuosėdų mitybinių medžiagų kiekį, nuosėdas reikėtų papildyti maisto šaltiniu. Bandymo organizmams daugintis ir augti būtiną maistą reikėtų įdėti į nuosėdas per vieną kartą prieš bandomosios cheminės medžiagos įterpimą arba ją įterpiant, kad bandymo organizmų ekspozicija nebūtų per mažai įvertinta, pvz., atrankiai maitinant neužterštu maistu (žr. 5 priedėlį).

Nuosėdų ir vandens santykis

46. Rekomenduojamas nuosėdų ir vandens santykis yra 1:4 (45). Laikoma, kad šis santykis tinka užtikrinti reikiamų lygių deguonies koncentraciją vandenyje virš nuosėdų ir išvengti amoniako kaupimosi. Reikėtų užtikrinti, kad deguonies kiekis vandenyje virš nuosėdų būtų ≥ 40 % soties. Vandenį virš nuosėdų bandymo induose reikėtų nestipriai aeruoti (pvz., 2–4 burbuliukai per sekundę) per Pastero pipetę, įstatytą maždaug 2 cm virš nuosėdų paviršiaus, kad jos būtų trikdomos kiek įmanoma mažiau.

▼M6

Šviesa ir temperatūra

47. Auginimo kultūros ir bandymo dienos šviesos trukmė – 16 h (1)(6). Bandymo zonos apšvieta turėtų būti maždaug 500–1 000 lx. Temperatūra turėtų būti 20 °C ± 2 °C visą bandymą.

Bandymo koncentracijos vertės

48. Viena bandymo koncentracijos vertė (kuo mažesnė) naudojama sugerties kinetikai nustatyti, bet gali būti naudojama antroji (didesnė) koncentracija (pvz., (46)). Šiuo atveju ėminiai imami ir analizuojami esant pastoviajai būsenai arba po 28 dienų, kad būtų patvirtintas BAF, išmatuotas mažesnei koncentracijai (11). Didesnę koncentraciją reikėtų pasirinkti taip, kad būtų galima išvengti neigiamų poveikių (pvz., pasirenkant maždaug 1 % mažiausios žinomos lėtinio poveikio koncentracijos EC_x, gautos atliekant atitinkamus lėtinio toksiškumo tyrimus). Mažesnioji bandymo koncentracija turėtų būti gerokai didesnė nei taikomo nuosėdų ir biologinių ėminių analizės metodo aptikimo riba. Jei bandomosios cheminės medžiagos poveikio koncentracija yra arti analizės metodo aptikimo ribos, rekomenduojama naudoti didelio savitojo aktyvumo žymėtąją bandomąją cheminę medžiagą.

Apdoroti ir kontroliniai kartotiniai bandiniai

49. Reikia ne mažiau kaip trijų apdorotų kartotinių bandinių vienam ėminių ėmimo taškui (11) visam sugerties ir šalinimo tarpsniui, kad būtų galima atlikti kinetinius matavimus. Reikėtų turėti papildomus kartotinius bandinius, pvz., neprivalomoms papildomoms ėminių ėmimo datoms. Šalinimo tarpsniui ruošiamas atitinkamas skaičius kartotinių bandinių su nesodrintomis nuosėdomis ir vandeniu virš nuosėdų, kad sugerties tarpsnio pabaigoje apdorotos kirmėlės galėtų būti perneštos iš skirtųjų apdorotų indų į neapdorotus indus. Suminio apdorotų kartotinių bandinių skaičiaus turėtų pakakti sugerties ir šalinimo tarpsniams.

50. Arba kirmėlės, kurias numatyta imti šalinimo tarpsniui, gali būti veikiamos viename dideliame inde su sodrintomis nuosėdomis iš tos pačios partijos, kuri naudojama sugerties kinetikai. Reikėtų įrodyti, kad bandymo sąlygos (pvz., nuosėdų gylis, nuosėdų ir vandens santykis, įkrova, temperatūra, vandens kokybė) yra palyginamos su sugerties tarpsniui skirtų kartotinių bandinių sąlygomis. Sugerties tarpsnio pabaigoje iš šio indo turėtų būti paimti vandens, nuosėdų ir kirmėlių ėminiai analizei atlikti ir pakankamas skaičius didelių kirmėlių, kurios neturi neseniai įvykusio dalijimosi požymių, turėtų būti atsargiai paimtas ir perneštas į kartotinių bandinių indus, paruoštus šalinimo tarpsniui (pvz., dešimt organizmų vienam kartotinio bandinio indui).

51. Jei nenaudojamas joks tirpiklis, išskyrus vandenį, biologinei ir fono analizei reikėtų turėti ne mažiau kaip 9 kartotinius neigiamus kontrolinius bandinius (ne mažiau kaip 3, paimtus pradžioje, 3 – sugerties tarpsnio pabaigoje ir 3 – šalinimo tarpsnio pabaigoje). Jei bandomajai cheminei medžiagai įterpti naudojama soliubilizavimo priemonė, reikėtų turėti tirpiklio kontrolinius ėminius (ne mažiau kaip 3, paimtus pradžioje, 3 – sugerties tarpsnio pabaigoje ir 3 – šalinimo tarpsnio pabaigoje). Šiuo atveju reikėtų turėti ne mažiau kaip 4 kartotinius neigiamus kontrolinius bandinius (be tirpiklio) ėminiams imti sugerties tarpsnio pabaigoje. Šiuos kartotinius bandinius biologiškai galima palyginti su tirpiklio kontroliniais ėminiais, kad būtų gauta informacija apie galimą tirpiklio įtaką bandymo organizmams. Išsami informacija pateikta 3 priedėlyje.

▼M6

Vandens kokybės matavimo dažnumas

52. Sugerties ir šalinimo tarpsniu reikėtų matuoti bent šiuos vandens virš nuosėdų kokybės parametrus:

Temperatūra	viename kiekvienos apdorojimo koncentracijos inde ėminių ėmimo dieną ir viename kontrolinio ėminio inde kartą per savaitę ir sugerties bei šalinimo tarpsnių pradžioje bei pabaigoje; taip pat galima užrašyti aplinkos terpės temperatūrą (aplinkos oro ar vandens vonios) arba reprezentacinio bandymo indo, pvz., nepertraukiamai arba kas valandą;
Ištirpusio deguonies kiekis	viename kiekvienos apdorojimo koncentracijos inde ir viename kontrolinio ėminio inde ėminių ėmimo dieną; išreiškiamas mg/l ir % ASV (oro soties vertės);
Tiekiamo oro kiekis	tikrinamas bent kartą per dieną (darbo dienomis) ir prireikus reguliuojamas;
pH	viename kiekvienos apdorojimo koncentracijos inde ėminių ėmimo dieną ir viename kontrolinio ėminio inde kartą per savaitę ir sugerties bei šalinimo tarpsnių pradžioje bei pabaigoje;
Suminis vandens kietumas	mažiausiai viename apdorotame inde ir viename kontrolinio ėminio inde sugerties ir šalinimo tarpsnių pradžioje bei pabaigoje; išreiškiamas mg/l $CaCO_3$;
Suminis amoniako kiekis	mažiausiai viename apdorotame inde ir viename kontrolinio ėminio inde sugerties ir šalinimo tarpsnių pradžioje bei pabaigoje; išreiškiamas mg/l NH_4^+, arba NH_3 arba suminio amoniako N.

Kirmėlių, nuosėdų ir vandens ėminių ėmimas ir analizė

Ėminių ėmimo grafikas

53. Ėminių ėmimo 28 dienų sugerties tarpsniu ir 10 dienų šalinimo tarpsniu grafikų pavyzdžiai pateikti 3 priedėlyje.

54. Vandens ir nuosėdų ėminiai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatyti imami iš bandymo kamerų prieš dedant kirmėles ir sugerties bei šalinimo tarpsniais. Bandymo metu bandomosios cheminės medžiagos koncentracija nustatoma kirmėlėse, nuosėdose ir vandenyje, kad būtų galima stebėti bandomosios cheminės medžiagos pasiskirstymą bandymo sistemos terpėse.

55. Kirmėlių, nuosėdų ir vandens ėminiai imami mažiausiai šešis kartus sugerties, taip pat šalinimo tarpsnio metu.

56. Ėminiai imami tol, kol nustatoma pastovioji būsena (stabilizavimasis) (žr. 1 priedėlį) arba 28 dienas. Jei pastovioji būsena nepasiekiama per 28 dienas, pradedamas šalinimo tarpsnis. Pradedant šalinimo tarpsnį, numatytosios kirmėlės pernešamos į kartotinių bandinių kameras su neapdorotomis nuosėdomis ir vandeniu (taip pat žr. 17 ir 18 pastraipas).

Ėminių ėmimas ir paruošimas

57. Vandens ėminiai gaunami dekantuojant, siurbiant arba pipete paimant tūrį, kurio pakaktų bandomosios cheminės medžiagos kiekiui ėminyje nustatyti.

58. Likęs vanduo virš nuosėdų atsargiai dekantuojamas arba išsiurbiamas iš bandymo kameros (-ų). Nuosėdų ėminius reikėtų imti atsargiai, kuo mažiau trikdant kirmėles.

▼M6

59. Imant nuosėdų ėminį, iš kartotinio bandinio indo pašalinamos visos kirmėlės, pvz., nuosėdos suspenduojamos virš jų esančiame vandenyje, kiekvieno kartotinio bandinio indo turinys išpilamas į negilų padėklą ir kirmėlės surenkamos minkštu plieniniu pincetu. Kirmėlės nedelsiant plaunamos vandeniu negiliame stikliniame arba plieniniame padėkle. Vandens perteklius pašalinamas. Kirmėlės atsargiai pernešamos į prieš tai pasvertą indą ir pasveriamos. Kirmėlės numarinamos užšaldant (pvz., ≤ – 18 °C). Reikėtų užrašyti kokonų ir (arba) jauniklių buvimą ir skaičių.

60. Paprastai kirmėles reikėtų pasverti ir numarinti iš karto paėmus ėminį be virškinimo trakto turinio plovimo tarpsnio, kad būtų gauta padidinta BAF vertė, į kurią būtų įtrauktas užterštas virškinimo trakto turinys, ir būtų išvengta kūno likučių nuostolių virškinimo trakto turinį plaunant tik vandeniu (8). Nemanoma, kad cheminės medžiagos, kurių log K_{ow} yra didesnis nei 5, gerokai išsiplautų virškinimo trakto turinio plovimo tik vandeniu tarpsniu, bet cheminių medžiagų, kurių log K_{ow} yra mažesnis kaip 4, nuostoliai gali būti gerokai didesni (47).

61. Šalinimo tarpsniu kirmėlės išleidžia savo virškinimo trakto turinį į švarias nuosėdas. Tai reiškia, kad matuojant prieš pat šalinimo tarpsnį, įtraukiamos užterštos virškinimo trakto nuosėdos, o praėjus 4–24 h nuo šalinimo tarpsnio pradžios, didesnioji užteršto virškinimo trakto turinio dalis, kaip manoma, būtų pakeista švariomis nuosėdomis (11)(47). Tokiu atveju galima laikyti, kad koncentracija šio ėminio kirmėlėse yra koncentracija audiniuose po virškinimo trakto turinio išleidimo. Siekiant atsižvelgti į bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos sumažėjimą šalinimo tarpsniu dėl praskiedimo neužterštomis nuosėdomis, virškinimo trakto turinio masę galima įvertinti pagal šlapių kirmėlių masės ir kirmėlių pelenų masės santykį arba sausų kirmėlių masės ir kirmėlių pelenų masės santykį.

62. Jei specifinio tyrimo tikslas yra išmatuoti biologinį įsisavinamumą ir tikruosius bandymo organizmų audiniuose esančius likučius, reikėtų paimti bent vieną apdorotų gyvūnų poėminį (pvz., iš trijų papildomų kartotinių bandinių indų), kurį geriau imti esant pastoviajai būsenai, jį plauti švariame vandenyje 6 h (47) ir prieš analizę dar kartą pasverti. Tuomet šio poėminio kirmėlių masės ir koncentracijos kūne duomenis galima palyginti su vertėmis, gautomis neplautoms kirmėlėms. Pašalinimui matuoti skirtų kirmėlių nereikėtų plauti prieš jas pernešant į švarias nuosėdas, kad gyvūnams sukeliamas papildomas stresas būtų kuo mažesnis.

63. Vandens, nuosėdų ir kirmėlių ėminius pageidautina analizuoti iš karto po paėmimo (t. y. per 1–2 dienas), kad būtų išvengta skaidymo ar kitų nuostolių ir būtų galima apskaičiuoti apytikrius sugerties bei šalinimo greičius bandymo eigoje. Be to, atliekant analizę iškart, nepavėluojama nustatyti, kad pasiekta pastovioji būsena.

64. Jei analizuoti iš karto neįmanoma, ėminius reikėtų laikyti reikiamomis sąlygomis. Prieš tyrimo pradžią reikia gauti informaciją apie konkrečios bandomosios cheminės medžiagos stabilumą ir tinkamas laikymo sąlygas (pvz., laikymo trukmę ir temperatūrą, ekstrahavimo procedūras ir kt.). Jei tokios informacijos nėra ir manoma, kad ji yra būtina, lygiagrečiai galima bandyti kontrolinius sodrintų audinių ėminius stabilumui laikymo sąlygomis nustatyti.

Analizės metodo kokybė

65. Kadangi visa procedūra iš esmės priklauso nuo bandomajai cheminei medžiagai nustatyti taikomo analizės metodo tikslumo, preciziškumo ir jautrio, bandymo keliu tikrinama, ar tam tikram metodui pakanka cheminės analizės preciziškumo ir atkuriamumo, taip pat bandomosios cheminės

▼M6

medžiagos atgavimo iš vandens, nuosėdų ir kirmėlių ėminių. Taip pat patikrinama, ar kontrolinių ėminių kamerose bandomoji cheminė medžiaga neaptinkama didesnės nei foninė koncentracijos. Prireikus daromos C_w, C_s ir C_a verčių pataisos dėl atgavimo laipsnio ir kontrolinių ėminių foninių verčių. Visą bandymą ėminiai apdorojami taip, kad būtų kuo mažesnis užteršimas ir nuostoliai (pvz., dėl bandomosios cheminės medžiagos adsorbcijos ant ėminių ėmimo įtaiso).

66. Reikėtų užrašyti ir ataskaitoje pateikti bandomosios cheminės medžiagos suminį atgavimo laipsnį ir jos atgavimo iš kirmėlių, nuosėdų, vandens ir iš gaudyklių su absorbentais, jei naudojamos išgaravusiai bandomajai cheminei medžiagai sulaikyti, laipsnį.

67. Kadangi rekomenduojama naudoti žymėtąsias chemines medžiagas, galima atlikti jų suminio aktyvumo (t. y. pradinės medžiagos ir skaidymo produktų) analizę. Tačiau, jei analizė įmanoma, naudingos informacijos gali suteikti pradinės medžiagos ir jos skaidymo produktų kiekybinis nustatymas esant pastoviajai būsenai arba sugerties tarpsnio pabaigoje. Jei numatoma atlikti tokius matavimus, ėminiams turėtų būti taikomos tinkamos ekstrahavimo procedūros, kad būtų galima atskirai nustatyti pradinės medžiagos kiekį. Jei aptiktų skaidymo produktų aktyvumo, išmatuoto esant pastoviajai būsenai arba sugerties tarpsnio pabaigoje, procentinė dalis yra didelė (pvz., > 10 %), tokius skaidymo produktus rekomenduojama identifikuoti (5).

68. Dėl mažos atskiro gyvūno biomasės dažnai neįmanoma nustatyti bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kiekvienoje atskiroje kirmėlėje, išskyrus atvejus, kai kaip bandomųjų gyvūnų rūšis naudojama *Branchiura sowerbyi* (vienos kirmėlės šlapio kūno masė yra 40–50 mg) (11). Todėl priimtinas atskirų gyvūnų, paimtų iš tam tikro bandymo indo, sujungimas į vieną grupę, bet jis neriboja statistinių procedūrų, kurias galima taikyti duomenims. Jei tam tikra statistinė procedūra ir galia yra svarbūs veiksniai, į bandymą reikėtų įtraukti reikiamą bandymo gyvūnų ir (arba) kartotinių bandinių kamerų skaičių, kad būtų įmanoma suderinti su norimu jungimu į grupes, procedūra ir galia.

69. BAF rekomenduojama išreikšti kaip suminės šlapio kūno masės, suminės sauso kūno masės funkciją ir, jei reikia (pvz., ypač lipofilinių cheminių medžiagų), kaip lipidų kiekio ir nuosėdų TOC funkciją. Reikėtų taikyti tinkamus lipidų kiekio nustatymo metodus (48)(49). Kaip standartinį metodą (48) galima rekomenduoti ekstrahavimo chloroformu ir (arba) metanoliu būdą (50). Tačiau siekiant išvengti chlorintųjų tirpiklių, būtų galima taikyti tarplaboratoriniame tyrime patikrintą Bligh & Dyer metodo (50) modifikaciją, aprašytą (51). Kadangi skirtingais metodais gaunamos nevienodos vertės (48), būtina išsamiai aprašyti taikytą metodą. Jei įmanoma, t. y., jei yra pakankamai kirmėlių audinio, lipidų kiekis nustatomas tame pačiame ėminyje arba ekstrakte, kuris buvo gautas bandomosios cheminės medžiagos analizei, nes lipidus dažnai tenka pašalinti iš ekstrakto prieš jo analizę chromatografiniu metodu (5). Tačiau patogu naudoti aklimatizuotus kontrolinius gyvūnus lipidų kiekiui nustatyti bent sugerties tarpsnio pradžioje arba, pageidautina, jo pabaigoje, pvz., trijuose ėminiuose.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

70. Bandomosios cheminės medžiagos sugerties kreivė gaunama bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją, sugerties tarpsniu nustatytą kirmėlėse ir

▼M6

ant jų, brėžiant aritmetinėje skalėje kaip laiko funkciją. Jei kreivė pasiekia pastoviąją būseną, apskaičiuojamas pastoviosios būsenos BAF_{ss}:

$$\frac{C_a \text{ pastaviosios būsenos arba 28 dieną (virdurkis)}}{C_a \text{ pastaviosios būsenos arba 28 dieną (virdurkis)}}$$

71. Nustatomas kinetinis biologinio kaupimosi faktorius (BAFK) kaip k_s/k_e santykis. Pašalinimo konstanta (k_e) paprastai nustatoma pagal šalinimo kreivę (t. y. bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kirmėlėse šalinimo tarpsniu grafiką). Tada pagal sugerties kreivės kinetiką apskaičiuojama sugerties greičio konstanta k_s. Pageidautinas BAFK bei greičio konstantų k_s ir k_e, nustatymo metodas yra kompiuteriniai netiesiniai parametrų įvertinimo metodai (žr. 2 priedėlį). Jei šalinimas yra akivaizdžiai ne pirmosios eilės, reikėtų taikyti sudėtingesnius modelius (25)(27)(52).

72. Biotos-nuosėdų kaupimosi faktorius (BSAF) nustatomas BAFK normalizuojant pagal kirmėlių lipidų kiekį ir nuosėdų suminį organinės anglies kiekį.

Rezultatų aiškinimas

73. Rezultatus reikėtų aiškinti atsargiai, jei išmatuos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertės yra arti taikomo analizės metodo aptikimo ribos.

74. Aiškiai apibrėžtos sugerties ir šalinimo kreivės yra biologinio kaupimosi duomenų geros kokybės rodiklis. Paprastai tinkamai suplanuotų tyrimų BAF verčių pasikliovimo ribos turėtų būti ne didesnės kaip 25 % (5).

Bandymo ataskaita

75. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija.

Bandomoji cheminė medžiaga

— fizikinė būsena ir fizikinės cheminės savybės, pvz., log K_{ow}, tirpumas vandenyje;

— cheminio identifikavimo duomenys; bandomosios cheminės medžiagos šaltinis, naudojamo tirpiklio identifikavimo duomenys ir koncentracija;

— jei naudojama žymėtoji cheminė medžiaga, nurodoma tiksli žymėtųjų atomų padėtis, savitasis aktyvumas ir su priemaišomis susijęs aktyvumas.

Bandomųjų gyvūnų rūšis

— mokslinis pavadinimas, veislė, šaltinis, galimas pradinis apdorojimas, aklimatizavimas, amžius, dydžio intervalas ir kt.

Bandymo sąlygos

— taikytos bandymo procedūros (pvz., statinės, pusiau statinės arba pratekamosios);

— naudojamo apšvietimo tipas bei charakteristikos ir dienos šviesos trukmė (-ės);

— bandymo schema (pvz., bandymo indų skaičius, medžiaga ir matmenys, vandens tūris, nuosėdų masė ir tūris, vandens tūrio pasikeitimo sparta (pratekamųjų arba pusiau statinių procedūrų, naudotas aeravimas prieš bandymą ir jo metu, kartotinių bandinių skaičius, vieno kartotinio bandinio kirmėlių skaičius, bandymo koncentracijos verčių skaičius, sugerties ir šalinimo tarpsnių trukmė, ėminių ėmimo dažnumas);

▼M6

— bandomosios cheminės medžiagos paruošimo ir įterpimo metodas, taip pat konkretaus metodo pasirinkimo priežastys;

— nominaliosios bandymo koncentracijos vertės;

— dirbtinio vandens ir nuosėdų sudedamųjų dalių šaltinis arba, jei naudojama natūrali terpė, vandens ir nuosėdų kilmė, pradinio apdorojimo aprašymas, bandymo gyvūnų išgyventi ir (arba) daugintis naudojamoje terpėje gebos įrodymo rezultatai, nuosėdų charakteristikos (porų vandens pH ir amoniako koncentracija (natūralios nuosėdos), organinės anglies kiekis (TOC), dalelių dydžio pasiskirstymas (smėlio, dumblo ir molio procentinė dalis), vandens procentinė dalis ir kiti atlikti matavimai) ir vandens charakteristikos (pH, kietumas, laidis, temperatūra, ištirpusio deguonies koncentracija, liekamojo chloro koncentracija (jei matuojama) ir visi kiti atlikti matavimai);

— dirbtinių nuosėdų nominalioji masė ir sausos medžiagos masė, išmatuota kaip % šlapios medžiagos masės (arba sausosios ir šlapiosios medžiagos masių santykis); natūralių nuosėdų sausos medžiagos masė, išmatuota kaip % šlapios medžiagos masės (arba sausosios ir šlapiosios medžiagos masių santykis);

— bandymo kamerų vandens kokybė, kurią apibūdina temperatūra, pH, amoniako koncentracija, suminis kietumas ir ištirpusio deguonies koncentracija;

— išsami informacija apie vandens, nuosėdų ir kirmėlių ėminių apdorojimą, įskaitant bandomosios cheminės medžiagos ruošimo, laikymo, sodrinimo, ekstrahavimo procedūrų duomenis, ir bandomosios cheminės medžiagos bei lipidų kiekio analizės procedūras (ir preciziškumą) ir atgavimo laipsnius.

Rezultatai

— kontrolinių kirmėlių ir kirmėlių kiekvienoje bandymo kameroje gaištamumas ir visi kiti pastebėti subletalūs veiksniai, įskaitant nenormalų elgesį (pvz., nuosėdų vengimas, išmatų granulių buvimas ar nebuvimas, reprodukcijos nebuvimas);

— nuosėdų ir bandymo organizmų (naudingų normalizavimui) sausos medžiagos masė, išmatuota kaip % šlapios medžiagos masės (arba sausosios ir šlapiosios medžiagos masių santykis);

— kirmėlių lipidų kiekis;

— kreivės, kurios rodo bandomosios cheminės medžiagos kirmėlėse sugerties ir šalinimo kinetiką, ir pastoviosios būsenos pasiekimo trukmė;

— visų ėminių ėmimo dienų C_a, C_s ir C_w (nurodant standartinį nuokrypį ir intervalą, jei tinka) (C_a, išreikštą g kg^{-1} viso sauso ir šlapio kūno masės, C_s, išreikštą g kg^{-1} sausų ir šlapių nuosėdų masės, ir C_w, išreikštą mg l^{-1}). Jei reikia žinoti biotos-nuosėdų kaupimosi faktorių (BSAF; apibrėžtis pateikta 1 priedėlyje) (pvz., kad būtų galima palyginti dviejų arba kelių bandymų su skirtingą lipidų kiekį turinčiais gyvūnais rezultatus), C_a reikėtų papildomai išreikšti g kg^{-1} organizmo lipidų kiekio, o C_s reikėtų išreikšti g kg^{-1} nuosėdų organinės anglies (OC);

— papildomai ataskaitoje galima pateikti BAF (išreikštą kg šlapių nuosėdų kg^{-1} šlapių kirmėlių), nuosėdų sugerties greičio konstantą k_s (išreikštą g šlapių nuosėdų kg^{-1} šlapių kirmėlių d^{-1}) ir šalinimo greičio konstantą k_e (išreikštą d^{-1}); BSAF (išreikštą kg nuosėdų OC kg^{-1} kirmėlių lipidų kiekio);

▼**M6**

— nepašalintieji likučiai (NER) šalinimo tarpsnio pabaigoje;

— jei matuojama: bandymo gyvūnuose aptiktos pradinės cheminės medžiagos, skaidymo produktų ir surištų likučių procentinė dalis (t. y. bandomosios cheminės medžiagos, kurios negalima pašalinti įprastiniais ekstrahavimo metodais, procentinė dalis);

— duomenų statistinei analizei taikyti metodai.

Rezultatų įvertinimas

— rezultatų atitiktis tinkamumo kriterijams, išvardytiems 21 pastraipoje;

— netikėti ar neįprasti rezultatai, pvz., nevisiškas bandomosios cheminės medžiagos pašalinimas iš bandymo gyvūnų; tokiais atvejais naudingos informacijos gali suteikti kokio nors parengiamojo tyrimo rezultatai.

▼M6

1 priedėlis

Apibrėžtys ir vienetai

Dirbtinės nuosėdos, arba sukurtosios, atkurtosios ar sintetinės nuosėdos – tai mišinys medžiagų, naudojamų natūralių nuosėdų fiziniams komponentams modeliuoti.

Biologinis kaupimasis yra cheminės medžiagos koncentracijos padidėjimas organizme arba jo paviršiuje palyginti su bandomosios cheminės medžiagos koncentracija supančioje terpėje. Biologinis kaupimasis vyksta dėl biologinio koncentravimo ir biologinio amplifikavimo procesų (žr. toliau).

Biologinio kaupimosi faktorius (BAF) bet kuriuo sugerties tarpsnio momentu, atliekant šį biologinio kaupimosi bandymą, yra bandomosios cheminės medžiagos koncentracija bandymo organizme arba ant jo (C_a, išreikšta g kg^{-1} sauso arba šlapio kūno masės), padalyta iš cheminės medžiagos koncentracijos supančioje terpėje (C_s išreikšta g kg^{-1} sausų arba šlapių nuosėdų masės). Susiejant su C_a ir C_s vienetais, BAF vienetai yra kg nuosėdų kg^{-1} kirmėlių (15).

Biologinio kaupimosi faktoriai, apskaičiuoti tiesiogiai, kaip kinetinės nuosėdų sugerties greičio konstantos ir šalinimo greičio konstantos (k_s ir k_e, žr. toliau) santykis, vadinami kinetiniais biologinio kaupimosi faktoriais (BAF_K).

Biologinis koncentravimas yra cheminės medžiagos koncentracijos padidėjimas organizme arba jo paviršiuje vien tik dėl jos sugerties per kūno paviršių palyginti su bandomosios cheminės medžiagos koncentracija supančioje terpėje.

Biologinis amplifikavimas yra cheminės medžiagos koncentracijos padidėjimas organizme arba jo paviršiuje palyginti su bandomosios cheminės medžiagos koncentracija maiste arba grobyje iš esmės tik dėl jos sugerties iš užteršto maisto arba grobio. Dėl biologinio amplifikavimo bandomoji cheminė medžiaga gali būti pernešama arba gali kauptis mitybos tinkluose.

Biotos-nuosėdų kaupimosi faktorius (BSAF) – tai pagal lipidus normalizuota bandomosios cheminės medžiagos pastovioji koncentracija bandymo organizme arba ant jo, padalyta iš pagal organinę anglį normalizuotos cheminės medžiagos pastoviosios koncentracijos nuosėdose. Tada C_a išreiškiamas g kg^{-1} organizmo lipidų kiekio, o C_s – g kg^{-1} nuosėdų organinės anglies kiekio.

Kondicionavimo laikotarpis skirtas tam, kad būtų stabilizuotas nuosėdų mikroorganizmų komponentas ir pašalintas, pvz., iš nuosėdų komponentų susidaręs amoniakas; jis vykdomas prieš nuosėdų sodrinimą bandomąja chemine medžiaga. Po kondicionavimo vanduo virš nuosėdų paprastai išpilamas lauk.

Bandomosios cheminės medžiagos **šalinimas** – jos netektis bandymo organizme dėl aktyvių arba pasyvių procesų, kurie vyksta neatsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos buvimą ar nebuvimą supančioje terpėje.

Šalinimo tarpsnis – laikotarpis po bandymo organizmų pernešimo iš užterštos terpės į bandomosios cheminės medžiagos neturinčią terpę, per kurį tiriamas cheminės medžiagos šalinimas iš bandymo organizmų (ar netektis).

Šalinimo greičio konstanta (k_e) – skaitinė vertė, kuri apibrėžia bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos mažėjimo bandymo organizme ir (arba) ant jo greitį po bandymo organizmų pernešimo iš terpės su bandomąja chemine medžiaga į jos neturinčią terpę; k_e išreiškiama d^{-1}.

▼M6

Pusiausvirinimo laikotarpis naudojamas bandomajai cheminei medžiagai pasiskirstyti tarp kietosios fazės, porų vandens ir vandens virš nuosėdų; jis tęsiasi nuo nuosėdų sodrinimo bandomąja chemine medžiaga iki bandymo organizmų įdėjimo.

Oktanolio ir vandens pasiskirstymo koeficientas (K_{ow}) – cheminės medžiagos tirpumo n-oktanolyje ir vandenyje pusiausvyrasis santykis, kartais išreiškiamas kaip P_{ow}. K_{ow} logaritmas (log K_{ow}) naudojamas kaip cheminės medžiagos biologinio kaupimosi vandens organizmuose potencialo rodiklis.

Organinės anglies ir vandens pasiskirstymo koeficientas (K_{oc}) – cheminės medžiagos koncentracijos nuosėdų organinės anglies frakcijoje ir (arba) ant jos ir cheminės medžiagos koncentracijos vandenyje pusiausvyrasis santykis.

Vanduo virš nuosėdų – vanduo, užpiltas ant nuosėdų bandymo inde.

Pastovioji būsena (stabilizavimasis) – pusiausvyra tarp sugerties ir šalinimo procesų, vykstančių vienu metu ekspozicijos tarpsnio metu. BAF, gauto kiekvienai ėminių ėmimo dienai, kaip laiko funkcijos grafike pastovioji būsena pasiekiama, kai kreivė tampa lygiagreti laiko ašiai, trijų nuoseklių, ne mažiau kaip kas dvi dienas paimtų ėminių BAF analizės duomenys skiriasi ne daugiau kaip ± 20 % ir nėra reikšmingų statistinių skirtumų tarp trijų ėminių ėmimo laikotarpių. Jei bandomosios cheminės medžiagos sugeriamos lėtai, tinkamesnis intervalas būtų septynios dienos (5).

Porų vanduo arba intersticinis vanduo yra vanduo, užimantis erdvę tarp nuosėdų arba dirvožemio dalelių.

Nuosėdų sugerties greičio konstanta (k_s) – skaitinė vertė, kuri apibrėžia bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos didėjimo bandymo organizme ir (arba) ant jo greitį dėl sugerties iš nuosėdų fazės. k_s išreiškiamas g nuosėdų kg^{-1} kirmėlių d^{-1}.

Sodrintos nuosėdos – nuosėdos, į kurias įdėta bandomoji cheminė medžiaga.

Pastoviosios būsenos biologinio kaupimosi faktorius (BAF_{ss}) yra BAF, gautas pastoviajai būsenai, kuris reikšmingai nekinta ilgą laiko tarpą, kai bandomosios cheminės medžiagos koncentracija supančioje terpėje (C_s, išreikšta g kg^{-1} šlapių arba sausų nuosėdų) šiuo laikotarpiu yra pastovi.

Sugerties arba ekspozicijos tarpsnis – laikotarpis, kai bandymo organizmai veikiami bandomąja chemine medžiaga.

▼M6

2 priedėlis

Sugerties ir šalinimo parametrų skaičiavimas

Pagrindinė biologinio kaupimosi bandymo vertinamoji baigtis yra biologinio kaupimosi faktorius BAF. BAF galima apskaičiuoti dalijant bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją bandymo organizme C_a iš bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos nuosėdose C_s, esant pastoviajai būsenai. Jei sugerties tarpsniu pastovioji būsena nepasiekiama, tokiu pat būdu skaičiuojamas 28 dienos BAF. Tačiau reikėtų pažymėti, ar BAF pagrįstas ar ne pastoviosios būsenos koncentracijos vertėmis.

Tinkamiausias kinetinio biologinio kaupimosi faktoriaus (BAF_K), nuosėdų sugerties greičio konstantos (k_s) ir šalinimo greičio konstantos (k_e) gavimo būdas yra kompiuteriniai netiesiniai parametrų įvertinimo metodai. Jei yra sugerties tarpsnio vidutinių kaupimosi faktorių laikinė seka (AF = kiekvienos ėminių ėmimo datos C_a vidutinės vertės/kiekvienos ėminių ėmimo datos C_s vidutinės vertės), pagrįsta šlapių kirmėlių ir nuosėdų mase, modelio lygtis yra:

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[1 lygtis]}$$

čia AF(t) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos kirmėlėse ir jos koncentracijos nuosėdose santykis tam tikrame sugerties tarpsnio laiko taške (t), šios kompiuterinės programos apskaičiuoja BAF_K, k_s ir k_e vertes.

Kai pastovioji būsena pasiekiama sugerties tarpsniu (t. y. $t = \infty$), 1 lygtį galima supaprastinti į:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[2 lygtis]}$$

čia

k_s = sugerties audiniu greičio konstanta [g nuosėdų kg^{-1} kirmėlių d^{-1}]

k_e = šalinimo greičio konstanta [d^{-1}]

Tada $k_s/k_e \times C_s$ yra apytikrė bandomosios cheminės medžiagos koncentracija kirmėlių audinyje esant pastoviajai būsenai ($C_{a,ss}$).

Biotos-nuosėdų kaupimosi faktorių (BSAF) reikėtų skaičiuoti taip:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

čia f_{oc} – nuosėdų organinės anglies dalis, pagrįsta sausų nuosėdų mase, o f_{lip} – kirmėlių lipidų dalis, abi vertės pagrįstos sausos arba šlapios medžiagos mase.

Jei yra koncentracijos verčių laikinė seka, šalinimo kinetiką galima modeliuoti naudojant tokias modelio lygtis ir kompiuterinį skaičiavimą, pagrįstą netiesinio parametrų įvertinimo metodu.

Numatytuoju pradžios tašku rekomenduojama naudoti išmatuotą kūno likučio vidutinę vertę sugerties tarpsnio pabaigoje. Sugerties tarpsniui sumodeliuotą ar įvertintą vertę reikėtų naudoti tik tada, kai, pvz., apskaičiuota vertė reikšmingai skiriasi nuo sumodeliuoto kūno likučio. Taip pat žr. 50 pastraipą apie šalinimo tarpsniui skirtų kirmėlių alternatyvią pradinę ekspoziciją; manoma, kad taikant šį būdą kirmėlių po pradinės ekspozicijos ėminiai 0 šalinimo tarpsnio dieną yra tikrasis kūno likutis, kad būtų galima pradėti šalinimo kinetikos tyrimą.

▼M6

Jei duomenų taškai nubrėžti laiko atžvilgiu rodo pastovų eksponentinį bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos gyvūnuose mažėjimą, šalinimo laikinei eigai aprašyti galima naudoti vieno skyriaus modelį (3 lygtis):

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad [3 \text{ lygtis}]$$

Kartais šalinimo procesai vyksta dviem tarpsniais, kai iš pradžių C_a mažėja staigiai, vėliau bandomųjų cheminių medžiagų netektis šalinimo tarpsniu lėtėja (8)(19)(25)). Dviejų tarpsnių buvimą galima paaiškinti darant prielaidą, kad organizmą sudaro du skyriai, iš kurių bandomoji cheminė medžiaga šalinama skirtingu greičiu. Tokiais atvejais reikėtų nagrinėti specialiąją literatūrą (15)(16)(17)(25).

Dviejų skyrių šalinimas aprašomas, pvz., šia lygtimi (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad [4 \text{ lygtis}]$$

A ir B atitinka skyrių dydį (suminio audinio likučio procentais) ir A yra greitos cheminės medžiagos netekties skyrius, o B – lėtos bandomosios cheminės medžiagos netekties skyrius. A ir B suma yra lygi 100 % viso gyvūno skyriaus tūrio esant pastoviajai būsenai. k_a ir k_b yra atitinkamos šalinimo greičio konstantos [d^{-1}]. Jei dviejų skyrių modelis atitinka šalinimo duomenis, sugerties greičio konstantą k_s galima nustatyti taip (53)(54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \qquad [5 \text{ lygtis}]$$

Vis dėlto šias modelių lygtis reikėtų taikyti atsargiai, ypač, kai atliekant bandymą vyksta bandomosios cheminės medžiagos biologinio įsisavinamumo pokyčiai (42).

Kitaip nei pagal pirmiau aprašytas modelių lygtis, kinetika (k_s ir k_e) taip pat gali būti skaičiuojama vienu veiksmu, taikant pirmojo laipsnio kinetikos modelį kartu visiems sugerties ir šalinimo tarpsnių duomenims. Metodas, kuriuo būtu galima atlikti jungtinį sugerties ir šalinimo tarpsnių greičio konstantų skaičiavimą, aprašytas (55), (56) ir (57) nuorodose.

Nepašalintuosius likučius (NER) reikėtų skaičiuoti kaip antrinę vertinamąją baigtį, vidutinės koncentracijos kirmėlėse (C_a) šalinimo tarpsnio 10 dieną ir pastoviosios būsenos (sugerties tarpsnio 28 dieną) vidutinės koncentracijos kirmėlėse (C_a) santykį dauginant iš 100:

$$\boldsymbol{NER_{10d}[\%] = \frac{C_a\text{šalinimo pabaigoje}(\text{vidurkis}) \times 100}{C_a\text{pastoviosios būsenos}(\text{vidurkis})}}$$

▼M6

3 priedėlis

28 dienų biologinio kaupimosi bandymo ėminių ėmimo grafiko pavyzdys

a) **Sugerties tarpsnis (įskaitant 4 dienų pusiausvirinimo tarpsnį)**

Diena	Veiksmai
– 6	Ruošiama durpių suspensija nuosėdoms; suspensija kondicionuojama 48 h;
– 4	Nuosėdos arba jų frakcija sodrinama; sumaišomos visos nuosėdų sudedamosios dalys; imami apdorotų ir tirpiklio kontroliniai nuosėdų ėminiai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatyti; virš nuosėdų įpilama vandens; inkubuojama bandymo sąlygomis (pusiausvirinimo tarpsnis);
–3/–2	Bandymo organizmai atskiriami nuo kultūros ir aklimatizuojami;
0	Matuojama vandens kokybė (žr. 52 pastraipą); išimami kartotinių bandinių indai, iš kurių paimami vandens ir nuosėdų ėminiai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatyti; kirmėlės atsitiktinai paskirstomos į bandymo kameras; paliekama pakankamai kirmėlių poėminių analizės foninėms vertėms nustatyti; tikrinamas oro tiekimas, jei naudojama uždaroji bandymo sistema;
1	Išimami kartotinių bandinių indai ėminiams paimti; tikrinamas oro tiekimas, kirmėlių elgesys, vandens kokybė (žr. 56 pastraipą); imami vandens, nuosėdų ir kirmėlių ėminiai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatyti;
2	Tikrinamas oro tiekimas, kirmėlių elgesys ir temperatūra;
3	Kaip 1 dieną;
4–6	Kaip 2 dieną;
7	Kaip 1 dieną; prireikus kompensuojamas išgaravusio vandens tūris;
8–13	Kaip 2 dieną;
14	Kaip 1 dieną; prireikus kompensuojamas išgaravusio vandens tūris;
15–20	Kaip 2 dieną;
21	Kaip 1 dieną; prireikus kompensuojamas išgaravusio vandens tūris;
22–27	Kaip 2 dieną;
28	Kaip 1 dieną; matuojama vandens kokybė (žr. 52 pastraipą); sugerties tarpsnio pabaiga; paliekama pakankamai kirmėlių poėminių analizės foninėms vertėms, šlapio ir sauso kūno masei bei lipidų kiekiui nustatyti; šalinimo tarpsniui skirtos kirmėlės pernešamos (be virškinimo trakto turinio plovimo) iš po ekspozicijos likusių kartotinių bandinių indų į indus su švariomis nuosėdomis; iš tirpiklio kontrolinių indų imami vandens, nuosėdų ir kirmėlių ėminiai; imami gaudyklių, jei įrengtos, tirpalų ėminiai.
	Veiksmų prieš ekspoziciją (pusiausvirinimo tarpsnio) grafiką reikėtų sudaryti atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos savybes. Prireikus paruoštos nuosėdos 7 dienas kondicionuojamos kartu su vandeniu virš nuosėdų 20 °C ± 2 °C temperatūroje; šiuo atveju nuosėdos ruošiamos anksčiau!
	Aprašytus 2 dienos veiksmus reikėtų atlikti kasdien (bent darbo dienomis).

▼**M6**

b) **Šalinimo tarpsnis**

Diena	Veiksmai
– 6	Ruošiama durpių suspensija nuosėdoms; suspensija kondicionuojama 48 h;
– 4	Sumaišomos visos nuosėdų sudedamosios dalys; imami apdorotų ir tirpiklio kontroliniai nuosėdų ėminiai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatyti; virš nuosėdų įpilama vandens; inkubuojama bandymo sąlygomis;
0 (28 sugerties tarpsnio diena)	Matuojama vandens kokybė (žr. 52 pastraipą); kirmėlės iš po ekspozicijos likusių kartotinių bandinių indų pernešamos į indus su švariomis nuosėdomis; po **4–6 h** kartotinių bandinių indai išimami ir paimami vandens, nuosėdų bei kirmėlių ėminiai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatyti; kirmėlės atsitiktinai paskirstomos į bandymo kameras;
1	Išimami kartotinių bandinių indai ėminiams paimti; tikrinamas oro tiekimas, kirmėlių elgesys, vandens kokybė (žr. 52 pastraipą); imami vandens, nuosėdų ir kirmėlių ėminiai bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai nustatyti;
2	Tikrinamas oro tiekimas, kirmėlių elgesys ir temperatūra;
3	Kaip 1 dieną;
4	Kaip 2 dieną;
5	Kaip 1 dieną;
6	Kaip 2 dieną;
7	Kaip 1 dieną; prireikus kompensuojamas išgaravusio vandens tūris;
8–9	Kaip 2 dieną;
10	Kaip 1 dieną; šalinimo tarpsnio pabaiga; matuojama vandens kokybė (žr. 52 pastraipą); iš tirpiklio kontrolinių indų imami vandens, nuosėdų ir kirmėlių ėminiai; imami gaudyklių, jei įrengtos, tirpalų ėminiai.
	Nuosėdos prieš šalinimo tarpsnio pradžią turėtų būti ruošiamos taip pat, kaip prieš sugerties tarpsnį.
	Aprašytus 2 dienos veiksmus reikėtų atlikti kasdien (bent darbo dienomis).

▼M6

4 priedėlis

Kai kurios tinkamo skiedimo vandens fizikinės ir cheminės charakteristikos

SUDEDAMOJI DALIS	KONCENTRACIJA
Kietosios dalelės	< 20 mg/l
Suminė organinė anglis	< 2 μg/l
Nejonizuotas amoniakas	< 1 μg/l
Liekamasis chloras	< 10 μg/l
Suminis fosforo organinių pesticidų kiekis	< 50 ng/l
Suminis chloro organinių pesticidų ir polichlorintųjų bifenilų kiekis	< 50 ng/l
Suminis organinio chloro kiekis	< 25 ng/l

REKOMENDUOTO ATKURTOJO VANDENS SUDĖTIS

(a) Kalcio chlorido tirpalas

11,76 g $CaCl_2 \times 2H_2O$ ištirpinama dejonizuotame vandenyje; skiedžiama iki 1 litro dejonizuotu vandeniu

(b) Magnio sulfato tirpalas

4,93 g $MgSO_4 \times 7H_2O$ ištirpinama dejonizuotame vandenyje; skiedžiama iki 1 litro dejonizuotu vandeniu

(c) Natrio hidrokarbonato tirpalas

2,59 g $NaHCO_3$ ištirpinama dejonizuotame vandenyje; skiedžiama iki 1 litro dejonizuotu vandeniu

(d) Kalio chlorido tirpalas

0,23 g KCl ištirpinama dejonizuotame vandenyje; skiedžiama iki 1 litro dejonizuotu vandeniu

Visos cheminės medžiagos turi būti analiziškai grynos.

Distiliuoto ar dejonizuoto vandens savitasis laidis neturėtų būti didesnis kaip 10 $\mu S \cdot cm^{-1}$.

Sumaišoma po 25 ml kiekvieno nuo (a) iki (d) tirpalo ir skiedžiama iki 1 litro dejonizuotu vandeniu. Kalcio ir magnio jonų koncentracijos šiuose tirpaluose suma yra 2,5 mmol/l.

Ca:Mg jonų santykis yra 4:1, o Na:K jonų – 10:1. Šio tirpalo rūgšties neutralizavimo talpa $K_{S4.3}$ yra 0,8 mmol/l.

Skiedimo vanduo aeruojamas tol, kol pasiekiama deguonies soties koncentracija, paskui prieš naudojant vanduo maždaug dvi dienas laikomas ir naudojamas be papildomo aeravimo.

Tinkamo skiedimo vandens pH turėtų būti nuo 6 iki 9.

▼M6

5 priedėlis

Dirbtinės nuosėdos. ruošimo ir laikymo rekomendacijos

Kitaip nei reikalaujama bandymo metode C.8 (40), rekomenduojamas dirbtinių nuosėdų durpių kiekis vietoj 10 % sausos masės turi būti 2 %, siekiant atitikti nuo mažo iki vidutinio natūralių nuosėdų organinės medžiagos kiekį (58).

Dirbtinių nuosėdų sausų sudedamųjų dalių procentinė dalis:

Sudedamoji dalis	Charakteristika	Sausų nuosėdų %
Durpės	Kiminų durpės, suskaidymo laipsnis: „vidutinis“, išdžiovintos ore, jokių matomų augalų liekanų, smulkiai sumaltos (dalelių dydis ≤ 0,5 mm)	2 ± 0.5
Kvarcinis smėlis	Grūdelių dydis: ≤ 2 mm, bet > 50 % dalelių turėtų būti 50–200 μm	76
Kaolinas	Kaolinito kiekis ≥ 30 %	22 ± 1
Maisto šaltinis	*Folia urticae*, *Urtica sp.* (didžiosios dilgelės) lapų milteliai, smulkiai sumalti (dalelių dydis ≤ 0,5 mm), arba *Urtica sp.* lapų miltelių ir alfa celiuliozės mišinys (1:1); pagal farmacijos standartus, skirti žmonių vartojimui; papildo sausas nuosėdas	0,4–0,5 %
Kalcio karbonatas	$CaCO_3$, milteliai, chemiškai grynas, papildo sausas nuosėdas	0,05–1
Dejonizuotas vanduo	Savitasis laidis ≤ 10 μS/cm, papildo sausas nuosėdas	30–50

Jei manoma, kad gali būti didesnė amoniako koncentracija, pvz., jei žinoma, kad bandomoji cheminė medžiaga yra nitrifikavimo inhibitorius, galbūt būtų naudinga 50 % daug azoto turinčių dilgėlių miltelių pakeisti celiulioze (pvz., α-celiuliozės milteliais, chemiškai gryni, dalelių dydis ≤ 0,5 mm).

Paruošimas

Durpės džiovinamos ore ir malamos tol, kol gaunami smulkūs milteliai (grūdelių dydis ≤ 0,5 mm, jokių matomų augalų liekanų). Iš reikiamo durpių miltelių kiekio ruošiama suspensija, ant sausų nuosėdų užpilant reikiamą dejonizuoto vandens tūrį (nustatyta, kad, norint gauti maišomą durpių suspensiją, vandens tūris turi būti 11,5 × sausų durpių masės (8)) ir maišant didelio našumo homogenizavimo įtaisu.

Šios suspensijos pH vertė, lygi 5,5 ± 0,5, nustatoma $CaCO_3$. Švelniai maišoma suspensija kondicionuojama ne trumpiau kaip dvi dienas 20 ± 2 °C temperatūroje, kad nusistovėtų pH ir būtų sukurta stabili mikroorganizmų populiacija. pH matuojamas dar kartą ir prireikus reguliuojamas $CaCO_3$ iki 6,0 ± 0,5. Durpių suspensija maišoma su kitomis sausomis sudedamosiomis dalimis, atsižvelgiant į sodrinimui pasirinktą jų dalį. Įpilamas trūkstamas dejonizuoto vandens tūris, kad būtų gautos homogenizuotos nuosėdos. pH matuojamas dar kartą ir prireikus reguliuojamas $CaCO_3$ nuo 6,5 iki 7,5. Tačiau, jei manoma, kad gali susidaryti amoniakas, galbūt būtų naudinga nuosėdų pH vertę nustatyti mažesnę kaip 7,0 (pvz., nuo 6,0 iki 6,5). Imami nuosėdų ėminiai sausos medžiagos masei ir organinės anglies kiekiui nustatyti. Jei manoma, kad gali susidaryti amoniakas, prieš sodrinant dirbtines nuosėdas bandomąja chemine medžiaga, jas galima kondicionuoti septynias dienas tomis sąlygomis, kurios vyrauja vėliau atliekant bandymą (pvz., nuosėdų ir vandens santykis 1:4, nuosėdų sluoksnio aukštis kaip bandymo induose), t. y. ant jų būtų užpilamas vanduo, kuris būtų aeruojamas. Pasibaigus šiam kondicionavimo laikotarpiui, vanduo virš nuosėdų turėtų būti pašalintas ir išpiltas. Imami nuosėdų ėminiai sausos medžiagos masei ir organinės anglies kiekiui nustatyti (pvz., 3 ėminiai).

▼M6

Toliau sodrintas kvarcinis smėlis maišomas su nuosėdomis, kad būtų gauta kiekviena apdorojimo koncentracija, nuosėdos paskirstomos į kartotinių bandinių indus ir ant jų užpilama bandymo vandens (pvz., nuosėdų ir vandens santykis 1:4, nuosėdų sluoksnio aukštis kaip bandymo induose). Paskui indai inkubuojami tomis pačiomis sąlygomis, kurios vyrauja vėliau atliekant bandymą. Taip pradedamas pusiausvirinimo laikotarpis. Vandenį virš nuosėdų reikėtų aeruoti.

Pasirinktas maisto šaltinis turėtų būti įdėtas prieš nuosėdų sodrinimą bandomąja chemine medžiaga arba jo metu. Jį galima sumaišyti pradžioje su durpių suspensija (žr. pirmiau). Tačiau per didelio maisto šaltinio skaidymo prieš bandymo organizmų įdėjimą, pvz., ilgo pusiausvirinimo laikotarpio atveju, galima išvengti, kuo labiau trumpinant laikotarpį tarp maisto įdėjimo ir ekspozicijos pradžios. Siekiant užtikrinti, kad būtų pakankamas maisto sąlytis su bandomąja chemine medžiaga, maisto šaltinį reikėtų sumaišyti su nuosėdomis ne vėliau nei nuosėdų sodrinimo bandomąja chemine medžiaga dieną. Išimtys gali būti daromos, jei dėl pusiausvirinimo laikotarpio trukmės vyksta per didelis maisto mikrobiologinis skaidymas prieš įdedant bandymo organizmus. Imami nuosėdų ėminiai, kad būtų nustatyta sausa nuosėdų masė ir suminė organinė anglis (pvz., 3 sodrintų arba kontrolinių nuosėdų ėminiai).

Sausų komponentų (durpių, smėlio, kaolino) masė turėtų būti pateikta ataskaitoje g ir visos sausos medžiagos masės procentais.

Vandens, įpilamo į sausus komponentus ruošiant nuosėdas, tūrį taip pat reikėtų pateikti ataskaitoje visos sausos medžiagos masės procentais (pvz., 100 % sausos medžiagos masės + 46 % vandens reiškia, kad į 1 000 g sausos medžiagos įpilama iš viso 460 ml vandens ir gaunama 1 460 g šlapių nuosėdų).

Laikymas

Sausus dirbtinių nuosėdų komponentus galima laikyti sausoje, vėsioje vietoje kambario temperatūroje. Paruoštas šlapias nuosėdas (toliau naudoti tik kultūrai) galima laikyti nuo 2 iki 4 savaičių nuo paruošimo dienos 4 °C ± 2 °C temperatūroje ir tamsoje (8).

Bandomąja chemine medžiaga sodrintas nuosėdas reikia panaudoti iš karto, išskyrus atvejus, kai turima informacija rodo, kad tam tikras nuosėdas galima laikyti, nedarant įtakos bandomosios cheminės medžiagos toksiškumui ir biologiniam įsisavinamumui. Sodrintų nuosėdų ėminius galima laikyti iki analizės ir tomis sąlygomis, kurios rekomenduotos konkrečiai bandomajai cheminei medžiagai.

▼M6

6 priedėlis

Mažašerių žieduotųjų kirmėlių rūšys, rekomenduoajmos biologinio kaupimosi bandymams

***Tubifex tubifex* (MÜLLER), Tubificidae, Oligochaeta**

Mažašerė žieduotoji kirmėlė paprastasis tubifeksas (Tubificidae, Oligochaeta) *Tubifex tubifex* (Müller) gyvena gleivėmis išklotuose gėlo vandens nuosėdų urveliuose. Šiuose vamzdeliuose kirmėlės gyvena galva žemyn, rydamos nuosėdų daleles įsisavinančius susijusius mikroorganizmus ir organinius likučius. Užpakalinė dalis paprastai vingiuoja vandenyje virš nuosėdų, kad galėtų kvėpuoti. Nors ši rūšis gyvena įvairių tipų nuosėdose visame šiaurės pusrutulyje, *Tubifex tubifex* labiau mėgsta palyginti smulkių dalelių nuosėdas (59). Šios rūšies tinkamumas ekotoksikologiniams bandymams aprašytas, pvz., (8)(29)(31)(39)(60)(62)(63).

Kultūros auginimo metodai

Kirmėlės turi būti laikomos pastovioje laboratorijos kultūroje, kad turimo *Tubifex tubifex* kiekio pakaktų biologinio kaupimosi bandymams atlikti. Kaip *T. tubifex* auginimo kultūra rekomenduojama sistema, kurią sudaro dirbtinės nuosėdos iš dirbtinio dirvožemio pagal bandymo metodą C.8 (40) ir atkurtasis vanduo pagal bandymo metodą C.1 (8).

Kultūrai galima naudoti indus iš stiklo arba nerūdijančiojo plieno, kurių aukštis nuo 12 iki 20 cm. Į kiekvieną kultūros indą dedamas sluoksnis šlapių dirbtinių nuosėdų, paruoštų kaip aprašyta 5 priedėlyje. Nuosėdų sluoksnio gylis turėtų būti toks, kad kirmėlės galėtų natūraliai įsirausti į jį (*T. tubifex* būtinas minimalus gylis – 2 cm). Į sistemą įpilama atkurtojo vandens. Reikia imtis priemonių, kad nuosėdos būtų drumsčiamos kuo mažiau. Vandens sluoksnį reikėtų nestipriai aeruoti (pvz., 2 burbuliukai per sekundę oro, filtruoto per 0,45 μm filtrą) per Pastero pipetę, įstatytą 2 cm virš nuosėdų paviršiaus. Rekomenduojama kultūros temperatūra 20 °C ± 2 °C.

Kirmėlės dedamos į kultūros sistemą esant maksimaliai įkrovai 20 000 gyvūnų/m^2 nuosėdų paviršiaus. Esant didesnei įkrovai, gali sumažėti augimo sparta ir reprodukcijos laipsnis (43).

Dirbtinių nuosėdų kultūroje auginamas kirmėles reikia maitinti. Papildomai galima maitinti smulkiai sumaltu žuvų maistu, pvz., TetraMin® (8); Klerks 1994, asmeninis pranešimas. Maitinimo dažnumas turėtų užtikrinti pakankamą augimą ir reprodukciją ir kuo mažesnį amoniako kaupimąsi ir grybelių augimą kultūroje. Maitinti galima du kartus per savaitę (pvz., 0,6–0,8 mg cm^2 nuosėdų paviršiaus). Praktinė patirtis parodė, kad tolygiai paskirstyti maistą nuosėdų paviršiuje būtų lengviau, jei maistas į kultūros auginimo indus būtų duodamas kaip dejonizuotame vandenyje homogenizuota suspensija.

Siekiant, kad nesikauptų amoniakas, reikėtų naudoti pratekamąją sistemą arba vandenį virš nuosėdų keisti rankiniu būdu bent kartą per savaitę. Pradinių kultūrų nuosėdas reikėtų keisti kas tris mėnesius.

Kirmėles iš kultūros galima imti sijojant kultūros nuosėdas per 1 mm sietą, jei bandymui reikia tik suaugusių gyvūnų. Kokonams sulaikyti reikia 0,5 mm akučių, kirmėlių jaunikliams – 0,25 mm akučių sieto. Sietus galima dėti į atkurtąjį vandenį, nusijojus nuosėdas. Kirmėlės iškrenta iš sieto ir jas galima paimti iš vandens minkštu plieniniu pincetu arba pipete su liepsna poliruotais kraštais.

▼M6

Bandymui pradėti arba naujoms kultūros auginti naudojamos sveikos ir aiškiai identifikuotos *Tubifex tubifex* kirmėlės (pvz., (64)). Ligotos arba sužeistos kirmėlės, taip pat grybelių hifais užkrėsti kokonai turi būti išmesti.

Kultūrą auginant sinchronizuotai, galima gauti tam tikro amžiaus kirmėles per tinkamą laiko tarpą, kai jų reikia. Indai su nauja kultūra ruošiami pasirinktais laiko tarpais (pvz., kas dvi savaites), pradedant nuo tam tikro amžiaus gyvūnų (pvz., kokonų). Šiame dokumente aprašytomis sąlygomis kirmėlės išauga per 8–10 savaičių. Kultūrą galima surinkti, kai kirmėlės padeda naujus kokonus, pvz., po dešimties savaičių. Paimti suaugusių kirmėlių ėminiai gali būti naudojami bandymams, o kokonai gali būti naudojami naujai kultūrai auginti.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta**

Lumbriculus variegatus (Lumbriculidae, Oligochaeta) yra taip pat visame pasaulyje paplitęs gėlo vandens nuosėdų gyvūnas, plačiai naudojamas atliekant toksikologinius bandymus. Informacijos apie biologiją, kultūros auginimo sąlygas ir rūšies jautrumą galima gauti iš (1)(6)(9)(36). *Lumbriculus variegatus* taip pat galima auginti dirbtinėse nuosėdose, rekomenduotose *T. tubifex* pagal (8), taikant tam tikrus apribojimus. Kadangi gamtoje *L. variegatus* labiau mėgsta stambesnes nuosėdas nei *T. tubifex* (59), laboratorijos kultūros su *T. tubifex* naudojamomis dirbtinėmis nuosėdomis gali išnykti, praėjus nuo 4 iki 6 mėnesių. Praktinė patirtis parodė, kad *L. variegatus* galima laikyti pratekamosios sistemos smėlio substrate (pvz., kvarcinio smėlio, smulkaus žvyro), kaip mitybos šaltinį naudojant žuvų maistą, ir kelis metus neatnaujinti substrato. Pagrindinis *L. variegatus* privalumas palyginti su kitomis vandens mažašerių žieduotųjų kirmėlių rūšimis – greita reprodukcija, todėl laboratorijose auginamų populiacijų biomasė didėja labai greitai (1)(6)(9)(10).

Kultūros auginimo metodai

Lumbriculus variegatus kultūros auginimo sąlygos išsamiai aprašytos Phipps ir kt. (1993) (10), Brunson ir kt. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Trumpa šių sąlygų santrauka pateikta toliau.

Kirmėles galima auginti dideliuose akvariumuose (57–80 l) 23 °C temperatūroje, esant dienos šviesos trukmės santykiui 16 h šviesos: 8 h tamsos (100–1 000 liuksų) ir naudojant kasdien atnaujinamą gamtinį vandenį (45–50 l vienam akvariumui). Substratas ruošiamas supjaustant nebalintojo rudo popieriaus rankšluosčius į juostas, kurias kelias sekundes galima mirkyti kultūros vandenyje, kad būtų gautas mažų popieriaus gabaliukų substratas. Šį substratą galima tiesiogiai naudoti *Lumbriculus* kultūros akvariumuose, padengiant juo indo dugną, arba laikyti užšaldytą dejonizuotame vandenyje, kad būtų galima naudoti vėliau. Inde paklotas naujas substratas paprastai išsilaiko maždaug du mėnesius.

Kiekviena kirmėlių kultūra pradedama auginti imant 500–1 000 kirmėlių ir 3 kartus per savaitę maitinama 10 ml suspensijos, turinčios 6 g vaivorykštinio upėtakio pradinio maisto, vandens atnaujinimo arba pratekamosios sistemos sąlygomis. Statinės arba pusiau statinės kultūrų maitinimo dažnumas turėtų būti mažesnis, kad neaugtų bakterijos ir grybeliai. Maistą ir popierinį substratą reikėtų analizuoti dėl medžiagų, kurios turi būti naudojamos biologinio kaupimosi bandymuose.

Šiomis sąlygomis kultūros gyvūnų skaičius paprastai padvigubėja per maždaug 10–14 d.

Lumbriculus variegatus galima paimti iš kultūros, pvz., substratą pernešant į atskirą stiklinę tankiu tinklu arba gyvūnus pernešant stikline pipete, turinčia liepsna poliruotą plačią angą (maždaug 5 mm skersmens). Jei substratas pernešamas kartu į šią stiklinę, ji su kirmėlėmis ir substratu paliekama per naktį

▼M6

pratekėjimo sąlygomis, kuriomis substratas pašalinamas iš stiklinės, o kirmėlės pasilieka indo dugne. Kirmėles galima pernešti į naujai paruoštos kultūros indus arba toliau apdoroti prieš bandymus, kaip aprašyta (1) ir (6). Reikėtų vengti sužeisti kirmėles arba sukelti jų autotomiją, pvz., jiems paimti naudojant pipetes su liepsna poliruotais kraštais arba nerūdijančiojo plieno pincetus.

Problema, į kurią reikia ypač atsižvelgti, kai *L. variegatus* naudojamos biologinio kaupimosi nuosėdose bandymams, yra reprodukcijos būdas (architomija su paskesniu morfalaksiu). Vykstant šiai belytei reprodukcijai, gaunami du fragmentai, kurie tam tikrą laikotarpį nesimaitina tol, kol neatauga galva arba uodega (pvz., (36)(37)). Tai reiškia, kad nuosėdų ir teršalų įsisavinimas *L. variegatus* juos ryjant gali vykti ne visą laiką kaip tubifeksų atveju, kurie nesidaugina fragmentacijos būdu.

Todėl reikėtų atlikti sinchronizaciją, kad nevaldoma reprodukcija ir regeneracija, o vėliau didelis bandymo rezultatų svyravimas būtų kuo mažesni. Toks svyravimas gali būti tada, kai kai kurie gyvūnai fragmentavosi, todėl tam tikrą laikotarpį nesimaitina ir yra mažiau veikiami bandomąja chemine medžiaga, palyginti su kitais gyvūnais, kurių fragmentacija bandymo metu nevyksta, pvz., (38). Nuo 10 iki 14 dienų prieš bandymo pradžią kirmėles reikėtų dirbtinai fragmentuoti (sinchronizavimas) (65). Reikėtų naudoti dideles kirmėles, kurios, pageidautina, neturėtų neseniai vykusios fragmentacijos ženklų. Šias kirmėles galima padėti ant stiklinės plokštelės į kultūros vandens lašą ir perpjauti per kūno vidurinę sritį skalpeliu. Reikėtų žiūrėti, kad gautos galinės dalys būtų panašaus dydžio. Galines dalis reikėtų įdėti į kultūros indą su tuo pačiu substratu, kuris naudojamas kirmėlėms auginti, ir atkurtuoju vandeniu, kad būtų regeneruotos jų galvos, ir laikyti iki ekspozicijos pradžios. Naujų galvų regeneravimą rodo sinchronizuotai gautų kirmėlių įsirausimas į substratą (regeneruotų galvų buvimą galima patvirtinti apžiūrint reprezentatyvųjį poėminį po dviejų okuliarų mikroskopu). Manoma, kad tada bandymo organizmai yra panašios fiziologinės būsenos. Tai reiškia, kad, bandymo metu vykstant sinchronizuotų kirmėlių regeneravimui morfalaksio keliu, iš esmės visus gyvūnus, kaip manoma, vienodai veikia sodrintos nuosėdos. Sinchronizuotas kirmėles reikėtų maitinti tada, kai jos pradeda įsirausti į substratą arba 7 dieną po perpjovimo. Maitinimo režimas turėtų būti palyginamas su įprastinėmis kultūromis, bet sinchronizuotas kirmėles patariama maitinti iš to paties šaltinio, kuris turi būti naudojamas atliekant bandymą. Kirmėles reikėtų laikyti 20 °C ± 2 °C bandymo temperatūroje. Bandymams reikėtų naudoti regeneruotas sveikas išaugusias panašaus dydžio kirmėles, kurios aktyviai plaukia arba šliaužia nuo švelnaus mechaninio prisilietimo. Reikėtų vengti sužeisti kirmėles arba sukelti jų autotomiją, pvz., joms paimti naudojant pipetes su liepsna poliruotais kraštais arba nerūdijančiojo plieno pincetus.

Dėl specifinio šios rūšies reprodukcijos būdo kirmėlių *Lumbriculus variegatus* skaičius bandymo metu, jei yra tinkamos sąlygos, turėtų padidėti (6). Reikėtų užrašyti, jei biologinio kaupimosi bandymo metu *L. variegatus* reprodukcija nevyksta, ir į tai turėtų būti atsižvelgta aiškinant bandymo rezultatus.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), *Tubificidae, Oligochaeta* (tinkamumas nepatvirtintas tarplaboratoriniu tyrimu)**

Branchiura sowerbyi gyvena rezervuarų, ežerų, tvenkinių ir upių įvairių tipų nuosėdose, anksčiau – tropikų zonose. Taip pat jų galima rasti šiaurės pusrutulio šilto vandens telkiniuose. Tačiau jų yra daugiau dumblo ir molio nuosėdose, turinčiose didelį organinių medžiagų kiekį. Be to, kirmėlės gyvena nuosėdų sluoksnyje. Netgi užpakalinė kirmėlių dalis yra paprastai įsiraususi į nuosėdas. Šią rūšį lengva identifikuoti pagal žiaunų lapelius užpakalinėje kūno dalyje. Suaugusios kirmėlės gali būti 9–11 cm ilgio ir jų šlapio kūno masė yra 40–50 mg. Kirmėlių reprodukcijos laipsnis yra didelis, populiacija, esant toliau aprašytoms temperatūros ir maitinimo sąlygoms (Aston ir kt., 1982, (65)) padvigubėja

▼M6

mažiau kaip kas 2 savaites. *B. sowerbyi* buvo naudojamos atliekant toksiškumo ir biologinio kaupimosi tyrimus (Marchese & Brinkhurst 1996, (31) Roghair ir kt. 1996, (67)).

Kultūros auginimo metodai

Branchiura sowerbyi auginimo sąlygos apibendrintos toliau (pateikė Mercedes R. Marchese, INALI, Argentina, ir Carla J. Roghair, RIVM, Nyderlandai).

Specialus bandymo organizmų auginimo būdas nebūtinas. Organizmus galima auginti naudojant neužterštas natūralias nuosėdas (31). Praktinė patirtis parodė, kad iš natūralių nuosėdų ir smėlio gauta terpė pagerina kirmėlių būklę palyginti su vien natūraliomis nuosėdomis (32)(67). Kultūrai auginti tinka 3 l stiklinės su 1 500 ml nuosėdų ir vandens terpės, sudarytos iš 375 ml natūralių neužterštų nuosėdų (apie 10 % suminės organinės anglies; apie 17 % dalelių yra ≤ 63 μm), 375 ml švaraus smėlio (M32) ir 750 ml atkurtojo arba vandentiekio vandens, iš kurio pašalintas chloras (31)(32)(67). Taip pat galima naudoti popierinius rankšluosčius kaip auginimo substratą, tačiau tuomet populiacija didėja lėčiau palyginti su natūraliomis nuosėdomis. Pusiau statinių sistemų vandens sluoksnis stiklinėje lėtai aeruojamas, o vandenį virš nuosėdų reikėtų keisti kas savaitę.

Pradedama nuo 25 jaunų kirmėlių kiekvienoje stiklinėje. Po dviejų mėnesių dideli sliekai ištraukiami iš nuosėdų pincetu ir dedami į naują stiklinę su šviežiai pagaminta nuosėdų ir vandens terpe. Pirmiau naudotoje stiklinėje taip pat yra kokonų ir jaunų kirmėlių. Taip iš vienos stiklinės galima gauti 400 jaunų kirmėlių. Suaugusias kirmėles galima naudoti reprodukcijai ne trumpiau kaip vienus metus.

Kultūras reikėtų laikyti nuo 21 iki 25 °C temperatūroje. Temperatūros kitimas turėtų būti mažesnis kaip ± 2 °C. Embrionų vystymosi nuo padėtų kiaušinėlių iki jauniklis palieka kokoną trukmė yra maždaug trys savaitės 25 °C temperatūroje. Buvo nustatyta, kad 25 °C temperatūroje iš vienos išgyvenusios *B. sowerbyi* kirmėlės dumble gaunama nuo 6,36 (31) iki 11,2 (30) kiaušinėlių. Kiaušinėlių skaičius kokone yra nuo 1,8 iki 2,8 (66)(69) arba iki 8 (68).

Ištirpusį deguonį, vandens kietumą, temperatūrą ir pH reikėtų matuoti kas savaitę. Žuvų maistą (pvz., TetraMin®) galima dėti kaip suspensiją du arba tris kartus per savaitę iki soties. Kirmėles iki soties taip pat galima maitinti atšildytomis salotomis.

Pagrindinis šios rūšies privalumas – tai didelė atskiro gyvūno biomasė (šlapio kūno masė yra maždaug 40–50 mg vienam gyvūnui). Todėl šią rūšį galima naudoti atliekant nežymėtų bandomųjų cheminių medžiagų biologinio kaupimosi bandymus. Ją galima veikti *T. tubifex* ar *L. variegatus* naudojamose sistemose, imant po vieną gyvūną vienam kartotinio bandinio indui (11). Tačiau kartotinių bandinių skaičių tokiu atveju reikėtų padidinti, nebent būtų naudojamos didesnės kameros (11). Taip pat turi būti patikslintas su šios rūšies įsirausimo elgesiu susijęs tinkamumo kriterijus.

▼**M6**

NUORODOS

(1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(2) European Commission (EC) (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I – IV. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

(3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.

(4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

(5) Šio priedo C.13 skyrius. Biologinis koncentravimas. Dinaminis bandymas su žuvimis.

(6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(7) Šio priedo C.27 skyrius. Toksiškumo bandymas su chironomidais nuosėdose ir vandenyje, naudojant nuosėdas su įterpta bandomąja medžiaga.

(8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.

(9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, Lumbriculus variegatus. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.

(10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete Lumbriculus variegatus for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes“, 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.

(13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. & Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a Thalassia seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301-310.

▼M6

(14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim

(15) Landrum, P.F., Lee II, H., & Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1709-1725.

(16) Markwell, R.D., Connell, D.W. & Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. Wat. Res. 23, 1443-1450.

(17) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24, 1225-1231.

(18) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. and Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29, 1501-1514.

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

(21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.

(22) Šie šio priedo skyriai:

A.4 skyrius. Garų slėgis

A.5 skyrius. Paviršiaus įtemptis

A.6 skyrius. Tirpumas vandenyje

A.8 skyrius. Pasiskirstymo koeficientas. Kratomos kolbos metodas

A.24 skyrius. Pasiskirstymo koeficientas. HPLC metodas

C.7 skyrius. Skaidymas. Abiotinis skaidymas. Hidrolizė kaip pH funkcija

C.4 A-F skyriai. Lengvo biologinio skaidumo nustatymas

C.19 skyrius. Adsorbcijos koeficiento (K_{oc}) nustatymas dirvožemyje ir nuotekų dumble aukštos skyrimo galios skysčių chromatografija (HPLC)

C.29 skyrius. Lengvas biologinis skaidumas. CO_2 sandariuose induose (viršutinės erdvės tyrimas)

(23) OECD (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OECD, Paris.

(24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. & Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. Microchem. J. 43, 165-172.

▼M6

(25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke & G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(26) Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(27) Hawker, D.W. & Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22, 701-707.

(28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. and Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm Tubifex tubifex. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1061-1072.

(30) Aston, R.J. & Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. Aquaculture 26, 155-160.

(31) Marchese, M.R. & Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. Hydrobiologia 334, 163-168.

(32) Roghair, C.J. & Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719102027.

(33) Šio priedo C.1 skyrius. Ūmus toksiškumas žuvims.

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

(35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of Limnodrilus hoffmeisteri using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

(36) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(37) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(38) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

(39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. Tubifex tubifex (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.

▼M6

(40) Šio priedo C.8 skyrius. Toksiškumas sliekams.

(41) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod Pontoporeia hoyi. Environ. Sci. Toxicol. 23, 588-595.

(43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). In: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (eds.): Aquatic Oligochaeta Biology, 175-184. Plenum Press, New York.

(44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.

(45) Hooftman, R.N., van de Guchte, K. & Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.

(46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. Chemosphere 32, 1897-1905.

(47) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with Lumbriculus variegatus. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

(48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. & Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10, 1431-1436.

(49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography, 30, 1099-1105.

(50) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.

(51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. & Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

(53) Zok, S., Görge, G., Kalsch, W. & Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (Brachydanio rerio). Sci. Total Environment 109/110, 411-421

(54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische – Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.

(55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

(56) Van Brummelen, T.C. & Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod Porcellio scaber. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

▼M6

(57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail Orchesella cincta. Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

(59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. Arch. Hydr. 63, 310-386.

(60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. Environ. Sci. Technol. 21, 785-790.

(61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 47-67.

(62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 69-78.

(63) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete Lumbriculus variegatus by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(66) Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. Aquaculture 29, 137-145.

(67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. & Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge Chironomus riparius and the tubificid oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719101026.

(68) Aston, R.J. (1984). The culture of Branchiura sowerbyi (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. Aquaculture 40, 89-94.

(69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta, Tubificidae). Hydrobiologia, 278, 267-274.

▼M7

C.47. TOKSIŠKUMO ANKSTYVŲJŲ GYVENIMO STADIJŲ ŽUVIMS BANDYMAS

ĮVADAS

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) 210 (2013). Bandymų, naudojant ankstyvųjų gyvenimo stadijų žuvis, tikslas – nustatyti cheminių medžiagų letalų ir subletalų poveikį bandytų stadijų ir bandytų rūšių žuvims. Jie suteikia vertingos informacijos, pagal kurią galima įvertinti cheminės medžiagos lėtinį letalų ir subletalų poveikį kitų rūšių žuvims.

2. Bandymų gairės 210 yra pagrįstos Jungtinės Karalystės pasiūlymu, aptartu EBPO ekspertų susitikime, sušauktame Medmenhame (Jungtinė Karalystė) 1988 m. lapkričio mėn., ir atnaujintu 2013 m., atsižvelgiant į bandymo taikymo patirtį ir į rekomendacijas, pateiktas 2010 m. rugsėjo mėn. vykusiame EBPO seminare dėl toksiškumo žuvims bandymų (1).

BANDYMO PRINCIPAS

3. Ankstyvųjų gyvenimo stadijų žuvys veikiamos vandenyje ištirpinta kelių koncentracijos verčių bandomąja chemine medžiaga. Pirmenybė teikiama dinaminėms sąlygoms, tačiau, jei jų neįmanoma įgyvendinti, priimtinos pusiau statinės sąlygos. Išsamesnės informacijos reikėtų ieškoti EBPO rekomendaciniame dokumente apie probleminių cheminių medžiagų ir mišinių toksiškumo vandens organizmams bandymus (2). Bandymo pradžioje apvaisinti ikrai dedami į bandymų kameras ir bandymas tęsiamas rūšiai būdingą laikotarpį, kuris yra būtinas kontrolinių ėminių žuvims pasiekti mailiaus stadiją. Letalus ir subletalus poveikis vertinamas ir lyginamas su kontrolinėmis vertėmis siekiant nustatyti mažiausiai stebimo poveikio koncentraciją (LOEC) tam, kad būtų galima nustatyti i) nestebimo poveikio koncentraciją (NOEC) ir (arba) ii) EC_x (pvz., EC_{10}, EC_{20}) pritaikant regresijos modelį, norint įvertinti koncentraciją, kuri sukelia matuojamo poveikio x % pokytį. Ataskaitoje pateikiamos poveikio koncentracijos vertės ir parametrai gali priklausyti nuo reglamentavimo sistemos. Reikėtų, kad bandymų koncentracijos vertės aprėptų EC_x, tam, kad EC_x būtų apskaičiuojama interpoliavimo, o ne ekstrapoliavimo būdu (apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje).

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

4. Bandomoji cheminė medžiaga reiškia tai, kas yra bandoma. Turėtų būti žinomas bandomosios cheminės medžiagos tirpumas vandenyje (žr. šio priedo A.6 skyrių) ir garų slėgis (žr. šio priedo A.4 skyrių), be to, reikėtų turėti patikimą analizės metodą medžiagos kiekiui bandymo tirpaluose nustatyti, kurio tikslumas ir kiekybinio nustatymo riba būtų žinomi ir pateikiami ataskaitoje. Nors ūmaus toksiškumo bandymas nėra būtinas, jo rezultatai (žr. šio priedo skyrių C.1 ar C.49), pageidautina gauti būtent šiam bandymui pasirinktoms rūšims, galėtų suteikti naudingos informacijos.

5. Jei šiuo metodu bandomas mišinys, jis turėtų būti kuo išsamiau apibūdintas, pvz., nurodant jo sudedamųjų dalių cheminius pavadinimus, jų kiekius ir toms cheminėms medžiagoms būdingas savybes (tokias kaip nurodytos pirmiau). Prieš taikant bandymų metodą mišiniui reglamentavimo tikslais, reikėtų atsižvelgti į tai, ar jį atlikus bus galima gauti reglamentavimo tikslu priimtinus rezultatus.

6. Naudingą informaciją sudaro struktūrinė formulė, cheminės medžiagos grynumas, tirpumas vandenyje, stabilumas vandenyje ir veikiant šviesai, pK_a, P_{ow} ir lengvo biologinio skaidumo bandymo rezultatai (pvz., šio priedo C.4 ar C.29 skyriai).

▼M7

BANDYMO TINKAMUMAS

7. Taikomos šios bandymo tinkamumo sąlygos:

— ištirpusio deguonies koncentracija turi būti > 60 % oro prisotinimo vertės per visą poveikio laikotarpį;

— kiekvienu bandymo momentu vandens temperatūra bandymo kamerose ar kiekvieną bandymų parą neturėtų skirtis daugiau kaip ± 1,5 °C ir turėtų atitikti bandymų rūšiai nurodytą temperatūros intervalą (2 priedėlis);

— privalomas bandymo koncentracijos verčių analizės matas;

— bendras apvaisintų ikrų ir išsiritusių lervų išgyvenamumas kontroliniuose ir, jei reikia, tirpiklio kontroliniuose induose turėtų būti lygus arba didesnis nei 2 priedėlyje nurodytos ribos;

8. Jei stebimas nedidelis nukrypimas nuo bandymo tinkamumo kriterijų, į padarinius reikėtų atsižvelgti įvertinant bandymo duomenų patikimumą ir šie aspektai turėtų būti įtraukti į ataskaitą. Ataskaitoje turėtų būti pateiktas poveikis išgyvenamumui, išsiritimui ar augimui tirpiklio kontroliniame ėminyje, palyginti su neigiamu kontroliniu ėminiu, ir jį reikėtų aptarti vertinant bandymų duomenų patikimumą.

METODO APRAŠYMAS

Bandymų kameros

9. Galima naudoti stiklo, nerūdijančiojo plieno ar kitos chemiškai inertinės medžiagos kameras. Kadangi yra žinoma, kad polisiloksanas pasižymi didele geba absorbuoti lipofilines medžiagas, reikėtų kiek įmanoma riboti polisiloksano vamzdelių naudojimą atliekant dinaminius tyrimus ir polisiloksano sandariklių naudojimą sąlyčio su vandeniu vietose, pvz., naudojant vientisus stiklinius akvariumus. Indų matmenys turėtų būti pakankamai dideli, tam, kad būtų galima užtikrinti tinkamas augimo sąlygas, išlaikant ištirpusio deguonies koncentraciją kontrolinių ėminių induose (pvz., mažų žuvų rūšims pakaktų 7 l indo talpos šioms sąlygoms užtikrinti) ir atitikti įkrovos dydžio kriterijus, nurodytus 19 pastraipoje. Bandymo kameras pageidautina išdėstyti bandymo plote atsitiktinai. Palyginti su visiško atsitiktinio išdėstymo schema, geriau rinktis atsitiktinai išdėstytų blokų schemą, pagal kurią kiekviename bloke yra kiekvienos dozės ėminys. Bandymo kameros turėtų būti apsaugotos nuo nepageidaujamų trikdžių. Prieš dedant bandymų organizmus, bandymų sistemą pageidautina pakankamai ilgai kondicionuoti esant naudojamoms bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertėms, kad būtų įrodytas koncentracijos stabilumas veikimo sąlygomis.

Rūšių parinkimas

10. Rekomenduotos žuvų rūšys nurodytos 1 lentelėje. Tai netrukdo naudoti kitas rūšis, tačiau tinkamoms bandymo sąlygoms užtikrinti gali tekti keisti bandymų procedūrą. Šiuo atveju ataskaitoje reikėtų pagrįsti rūšies pasirinkimą ir bandymo metodą.

Veislinių žuvų laikymas

11. Išsamius duomenis apie veislinių žuvų laikymą patenkinamomis sąlygomis galima rasti 3 priedėlyje ir nuorodose (3) (4) (5).

Apvaisintų ikrų, embrionų ir lervų veikimas bandomąją medžiaga

12. Iš pradžių apvaisinti ikrai, embrionai ir lervos gali būti veikiami į pagrindinę kamerą įdėtuose mažesniuose stikliniuose ar nerūdijančiojo plieno induose, kurių šoninės ar galinės sienelės pakeistos tinklu, kad bandymo tirpalas

▼M7

galėtų tekėti per indą. Per mažus indus tekantį srautą be sūkurių galima gauti indus pakabinant ant svirties, kuri juos pakeltų ir nuleistų taip, kad visą laiką organizmai būtų po vandeniu. Apvaisintus lašišinių žuvų ikrus galima laikyti ant padėklų ar tinklų su pakankamai didelėmis angomis, kad išsiritusios lervos galėtų per jas iškristi.

13. Jei ikrų talpyklos, grotelės ar tinkleliai buvo naudojami ikrams pagrindiniame bandymų inde laikyti, išsiritus lervoms šias sulaikymo priemones reikėtų pašalinti pagal 3 priedėlio rekomendacijas, tačiau reikia palikti tinklelius, kad lervos negalėtų ištrūkti. Jei lervas reikia pernešti, jų neturėtų veikti oras, o lervoms iš ikrų talpyklų išleisti neturėtų būti naudojami tinklai. Šio pernešimo laikas įvairioms rūšims skirtingas ir jis turėtų būti nurodytas ataskaitoje. Tačiau ne visuomet pernešti yra būtina.

Vanduo

14. Kaip bandymo vandenį galima naudoti bet kokį vandenį, kuriame bandymo rūšis galėtų ilgai gyventi ir augti (žr. 4 priedėlį). Jo kokybė turėtų būti pastovi visą bandymo trukmę. Siekiant užtikrinti, kad skiedimo vanduo neturėtų per daug įtakos bandymo rezultatui (pvz., sudarydamas kompleksus su bandomąja medžiaga) ar nedarytų neigiamo poveikio neršiančių žuvų elgesiui, kartkarčiais reikėtų imti vandens ėminius ir juos analizuoti. Sunkiųjų metalų jonų (pvz., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), pagrindinių anijonų ir katijonų (pvz., Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), amoniako, bendro liekamųjų chloro pesticidų kiekio, bendrosios organinės anglies ir suspenduotų kietųjų dalelių analizę reikėtų atlikti, pvz., du kartus per metus, jei žinoma, kad skiedimo vandens kokybė yra gana pastovi. Jei žinoma, kad vandens kokybė nėra pastovi, jos matavimus reikia atlikti dažniau; dažnumas priklauso nuo kokybės kintamumo. Kai kurios skiedimui tinkamo vandens charakteristikos yra pateiktos 4 priedėlyje.

Bandymo tirpalai

15. Atliekant dinaminius bandymus reikia turėti sistemą, kuri visą laiką dozuotų ir skiestų bandomosios cheminės medžiagos pradinį tirpalą (pvz., dozuojamąjį siurblį, proporcingojo skiedimo sistemą, sotintuvo sistemą), kad į bandymo kameras būtų galima tiekti kelių bandymo koncentracijos verčių tirpalus. Pradinių tirpalų ir skiedimo vandens srautą reikėtų tikrinti tam tikrais laiko tarpais ir per visą bandymą jis neturėtų kisti daugiau kaip 10 %. Nustatyta, kad tinkamas srautas – toks, kuris atitinka bent penkis bandymo kameros tūrius per 24 h (3). Tačiau jei laikomasi 19 pastraipoje nurodyto įkrovos dydžio, galimas mažesnis srautas, pvz., 2–3 bandymų kameros tūriai, kad maistas nebūtų šalinamas per greitai.

16. Pasirinktos koncentracijos bandymo tirpalai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Pradinį tirpalą geriau ruošti tiesiog maišant ar plakant bandomąją cheminę medžiagą skiedimo vandenyje mechaninėmis priemonėmis (pvz., maišykle ir (arba) ultragarsu). Gana koncentruotam pradiniam tirpalui ruošti galima naudoti prisotinimo kolonėles (tirpumo kolonėles) ar pasyvaus dozavimo metodus (6). Nerekomenduojama naudoti tirpiklinio nešiklio. Tačiau jei tirpiklis yra būtinas, lygiagrečiai reikėtų bandyti kontrolinį tirpiklio ėminį, kurio koncentracija atitiktų ėminių su chemine medžiaga tirpiklio koncentraciją; t. y. tirpiklio kiekis turėtų būti vienodas visų koncentracijų tirpaluose, taip pat ir kontroliniame ėminyje. Naudojant kai kurias skiedimo sistemas, tai galėtų būti techniškai sunku įgyvendinti; šiuo atveju tirpiklio koncentracija jo kontroliniame ėminyje turėtų būti lygi didžiausiai tirpiklio koncentracijai apdorotos grupės ėminyje. Informacijos apie sunkiai bandomas chemines medžiagas reikėtų ieškoti EBPO rekomendaciniame dokumente

▼M7

Nr. 23 apie sunkiai apdorojamų cheminių medžiagų ir mišinių toksiškumo vandens organizmams bandymus (2). Jei naudojamas tirpiklis, jo pasirinkimą lems medžiagos cheminės savybės. EBPO rekomendaciniame dokumente Nr. 23 rekomenduojama ne didesnė kaip 100 µl/l koncentracija. Siekiant išvengti galimo tirpiklio poveikio išmatuotoms vertinamosioms baigtims (7), rekomenduojama naudoti kuo mažesnę tirpiklio koncentraciją.

17. Pusiau statinio bandymo atveju galima taikyti dvi skirtingas atnaujinimo procedūras. Nauji bandymo tirpalai ruošiami švariuose induose ir į juos atsargiai pernešami išgyvenę ikrai ir lervos arba bandymo organizmai paliekami bandymo induose, bet dalis (ne mažiau kaip du trečdaliai) bandymo tirpalo ir kontrolinio ėminio tūrio pakeičiama.

PROCEDŪRA

Veikimo sąlygos

Trukmė

18. Bandymą reikėtų pradėti kuo greičiau po ikrų apvaisinimo, pageidautina, kad jie būtų panardinti į bandymo tirpalus prieš blastodisko dalijimosi pradžią arba kuo arčiau šios stadijos pradžios. Bandymo trukmė priklauso nuo naudotos rūšies. Kai kurios rekomenduojamos trukmės vertės pateiktos 2 priedėlyje.

Įkrova

19. Bandymo pradžioje turimų apvaisintų ikrų skaičiaus turėtų pakakti, kad būtų užtikrinta atitiktis statistikos reikalavimams. Jie turėtų būti atsitiktinai paskirstyti tarp apdorotų ėminių ir vienai koncentracijai turėtų tekti ne mažiau kaip 80 ikrų, vienodai padalytų tarp ne mažiau kaip keturių kartotinių ėminių bandymo kamerų. Įkrovos dydis (biomasės kiekis bandymo tirpalo tūriui) turėtų būti pakankamai mažas, kad ikrų ir lervų stadijų metu be aeravimo būtų galima užtikrinti ištirpusio deguonies koncentraciją ne mažesnę kaip 60 % prisotinto oro prisotinimo vertės. Atliekant dinaminius bandymus, rekomenduojama, kad drėgnų ikrų masės įkrova per 24 h būtų ne didesnė kaip 0,5 g/l ir bet kuriuo momentu ne didesnė kaip 5 g/l tirpalo (3).

Šviesa ir temperatūra

20. Šviesiojo laikotarpio trukmė ir vandens temperatūra turėtų būti tinkama bandymo rūšiai (žr. 2priedėlį).

Maitinimas

21. Maistas ir maitinimas yra kritiniai veiksniai, todėl yra svarbu, kad nuo reikiamo momento, atsižvelgiant į kiekvieną gyvenimo stadiją, būtų duodamas tinkamas maistas ir jo kiekio turėtų pakakti normaliam augimui užtikrinti. Maitinimas turėtų būti maždaug vienodas visuose kartotinių ėminių induose, nebent būtų koreguojama atsižvelgiant į gaištamumą. Maisto perteklių ir išmatas prireikus reikėtų pašalinti, kad nesikauptų atliekos. Maitinimo režimai išsamiai aprašyti 3 priedėlyje, bet įgijus patirties, maistas ir maitinimo režimai nuolat tobulinami, kad būtų pagerintas išgyvenamumas ir optimizuotas augimas. Gyvas maistas pagerina aplinką, todėl turėtų būti naudojamas vietoj sauso ar šaldyto maisto arba jį papildyti, jei tai tinka atsižvelgiant į rūšį ir gyvenimo stadiją.

Bandymo koncentracijos vertės

22. Paprastai reikia naudoti ne mažiau kaip penkias bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertes, kurių skirtumo pastovus faktorius būtų ne didesnis kaip 3,2, ir keturis kartotinius vienos koncentracijos ėminius. Nustatant bandymų koncentracijos verčių intervalą, reikėtų atsižvelgti į ūmaus toksiškumo bandymų, jei yra, pageidautina naudojant tą pačią rūšį, ir (arba) intervalo nustatymo bandymo informaciją (1). Tačiau nustatant bandymų koncentracijos verčių intervalą reikėtų atsižvelgti į visus informacijos šaltinius, įskaitant, pvz., kryžminės nuorodas, žuvų embrionų ūmaus

▼M7

toksiškumo duomenis. Jei reikia nustatyti tik empirines NOEC vertes, ribinis bandymas arba išplėstinis ribinis bandymas naudojant mažiau kaip penkias koncentracijos vertes gali būti priimtini kaip galutiniai bandymai. Reikėtų pagrįsti mažesnio nei penkių koncentracijos verčių skaičiaus naudojimą. Bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos verčių, didesnių kaip 96 h LC_{50} ar 10 mg/l, jei ši mažesnė, bandyti nebūtina.

Kontroliniai ėminiai

23. Be bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos verčių serijos reikėtų bandyti tik skiedimo vandens kontrolinius ėminius ir, jei reikia, tirpiklio kontrolinius ėminius su tirpikliniu nešikliu (žr. 16 pastraipą).

Analizinių nustatymų ir matavimų dažnumas

24. Prieš pradedant veikimo laikotarpį, reikėtų patikrinti, ar cheminės medžiagos tiekimo į visus kartotinius ėminius sistema tinkamai veikia (pvz., matuojant bandymų koncentracijos vertes). Reikėtų nustatyti reikiamus analizės metodus, įskaitant reikiamą kiekybinio nustatymo ribą (LOQ) ir pakankamus duomenis apie cheminės medžiagos stabilumą bandymų sistemoje. Atliekant bandymą bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertės nustatomos reguliariais laiko tarpais, kad būtų galima apibūdinti veikimą ja. Koncentracija turi būti nustatoma ne mažiau kaip penkis kartus. Naudojant dinamines sistemas, kiekvienos koncentracijos bandomosios cheminės medžiagos vieno kartotinio ėminio analizė turėtų būti atliekama bent kartą per savaitę, sistemingai pasirenkant kitus kartotinius ėminius. Papildomi analiziniai matavimai dažnai pagerintų bandymų rezultatų kokybę. Siekiant užtikrinti tikrojo tirpalo cheminę analizę, ėminius gali tekti filtruoti (pvz., per 0,45 μm akučių filtrą) arba centrifuguoti, kad būtų pašalintos visos kietosios dalelės. Prieš naudojant, filtrus reikėtų prisotinti, kad būtų mažesnė bandomosios cheminės medžiagos adsorbcija. Kai išmatuotos koncentracijos vertės nepatenka į 80–120 % nominalios koncentracijos intervalą, reikėtų nustatyti poveikio koncentracijos vertes ir dinaminių bandymų atveju jas išreikšti koncentracijos aritmetinio vidurkio atžvilgiu (žr. C.20 bandymų metodo 6 priedėlį dėl aritmetinio vidurkio skaičiavimo (8)), o pusiau statinių bandymų – išmatuotų koncentracijų geometrinio vidurkio atžvilgiu (žr. EBPO rekomendacinio dokumento Nr. 23 apie sunkiai apdorojamų cheminių medžiagų ir mišinių toksiškumo vandens organizmams bandymus (2) 5 skyrių).

25. Ištirpusio deguonies koncentraciją, pH ir temperatūrą reikėtų matuoti visuose induose bent kartą per savaitę visą bandymo trukmę, o druskingumą ir kietumą, jei reikia, – bandymo pradžioje ir pabaigoje. Bent viename bandymų inde temperatūrą reikėtų kontroliuoti nuolat.

Stebėjimai

26. **Embrioninio vystymosi stadija**: prieš veikimo bandomąja chemine medžiaga pradžią reikėtų kuo tiksliau patikrinti embrioninio vystymosi stadiją. Tai galima padaryti naudojant tinkamai konservuotų ir nuvalytų ikrų reprezentatyvų ėminį.

27. **Išsiritimas ir išgyvenamumas**: išsiritimą ir išgyvenamumą reikėtų stebėti bent kartą kasdien, o gautus skaičius registruoti. Jei ankstyvoje embriono vystymosi stadijoje (pvz., pirmąją ar antrąją bandymo parą) ant ikrų pastebimas grybelis, tuos ikrus reikėtų suskaičiuoti ir pašalinti. Negyvus embrionus, lervas ir mailių reikėtų pašalinti iš karto, kai tik pastebimi, nes jie greitai suyra ir gali būti sudraskyti kitų žuvų. Negyvus individus reikėtų šalinti ypač atsargiai, kad nebūtų fiziškai sužaloti šalia esantys ikrai ir (arba) lervos. Žūties požymiai skiriasi atsižvelgiant į rūšį ir gyvenimo stadiją. Pavyzdžiui:

▼M7

— apvaisintų ikrų: ypač ankstyvosiomis stadijomis stipriai sumažėja permatomumas ir pakinta spalva dėl baltymo koaguliacijos ir (arba) nusėdimo, todėl atsiranda baltas matinis atspalvis;

— embrionų, lervų ir mailiaus: nejudrumas ir (arba) kvėpavimo judesių, ir (arba) širdies plakimo nebuvimas ir (arba) reakcijos į mechaninius dirgiklius nebuvimas.

28. **Nenormali išvaizda**: kūno formos anomalijų turinčių lervų arba mailiaus skaičių reikėtų registruoti atitinkamais laiko tarpais, atsižvelgiant į bandymo trukmę, ir aprašyti anomalijų požymius. Reikėtų pažymėti, kad nenormalios lervos ir mailius pasitaiko natūraliai ir kai kurių rūšių gali būti kelių kontrolinio (-ių) ėminio (-ių) procentų eilės. Jei laikoma, kad išsigimimo požymiai ir susijęs nenormalus elgesys yra toks ryškus, kad organizmas patiria dideles kančias ir nėra galimybės atsigauti, jis gali būti pašalintas iš bandymo. Tokius gyvūnus reikėtų numarinti ir vėliau atliekant duomenų analizę priskirti prie nugaišusių. Daugumos šiam bandymų metodui rekomenduotų rūšių normalus embrioninis vystymasis yra aprašytas (9) (10) (11) (12).

29. **Nenormalus elgesys**: anomalijas, pvz., hiperventiliaciją, nekoordinuotą plaukimą, netipišką nejudrumą ir elgesį maitinant reikėtų registruoti atitinkamais laiko tarpais, atsižvelgiant į bandymo trukmę (pvz., šiltųjų vandenų žuvų – kartą per parą). Nors šie reiškiniai yra sunkiai kiekybiškai įvertinami, kartą pastebėti jie gali padėti aiškinti gaištamumo duomenis.

30. **Masė**: pasibaigus bandymui, reikėtų pasverti visas išgyvenusias žuvis bent kartotinio ėminio (ataskaitoje pateikiant kartotinio ėminio gyvūnų skaičių ir vieno gyvūno vidutinę masę); pageidautina nurodyti drėgno kūno (nušluostyto filtravimo popieriumi) masę, tačiau ataskaitoje galima pateikti sauso kūno masės duomenis (13).

31. **Ilgis**: pasibaigus bandymui matuojamas atskirų žuvų ilgis. Rekomenduojama matuoti visą ilgį, tačiau jei supuvo uodegos pelekas ar jis yra išėstas, galima matuoti standartinį ilgį. Visas vieno bandymo žuvis reikėtų matuoti tuo pačiu būdu. Atskirų žuvų ilgį galima matuoti, pvz., slankmačiu, skaitmeniniu fotoaparatu arba kalibruotu okuliaro mikrometru. Tipinis mažiausias ilgis nurodytas 2 priedėlyje.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

32. Rekomenduojama, kad bandymo schema ir pasirinktas statistinis kriterijus užtikrintų pakankamą galią (80 % ar didesnę) vertinamųjų baigčių biologinės svarbos pokyčiams aptikti, jei ataskaitoje reikia pateikti NOEC. Ataskaitoje pateikiamos poveikio koncentracijos vertės ir parametrai gali priklausyti nuo reglamentavimo sistemos. Jei ataskaitoje reikia pateikti EC_x, bandymo schema ir pasirinktas regresijos modelis turėtų užtikrinti galimybę gauti tokį EC_x įvertį, kad i) ataskaitoje pateiktame EC_x 95 % pasikliovimo intervale nebūtų nulio ir jis nebūtų per platus, ii) prognozuojamo EC_x vidurkio pasikliovimo intervale nebūtų kontrolinio ėminio vidurkio ir iii) nebūtų reikšmingo regresijos modelio nesuderinamumo su duomenimis. Pagal kiekvieną iš metodų reikia nustatyti kiekvienos vertinamosios baigties, kurią svarbu aptikti ar įvertinti, procentinį pokytį. Bandymo schema turėtų būti pritaikyta tokiai galimybei užtikrinti. Kai pirmiau nurodytos EC_x nustatymo sąlygos

▼M7

neįvykdytos, reikėtų taikyti NOEC metodą. Maža tikimybė, kad toks pats procentinis pokytis tiktų visoms vertinamosioms baigtims, taip pat mažai tikėtina, kad galima sukurti įgyvendinamą bandymą, kuris atitiktų šiuos kriterijus visoms vertinamosioms baigtims, todėl kuriant tinkamą bandymo schemą yra svarbu sutelkti dėmesį į jam svarbias vertinamąsias baigtis. 5 ir 6 priedėliuose pateiktos statistinės struktūrinės diagramos bei kiekvieno metodo rekomendacijos, kurios padėtų apdoroti duomenis ir pasirinkti tinkamiausią statistinį kriterijų ar modelį. Galima taikyti kitus statistinius metodus, jei jie yra moksliškai pagrįsti.

33. Reikės analizuoti kiekvieno kartotinių ėminių rinkinio kitimus atliekant dispersinės analizės ar faktorinės analizės lentelės procedūras ir šia analize pagrįstus reikiamus statistinės analizės metodus. Rekomenduojamas daugybinio palyginimo mažėjimo tvarka Jonckheere-Terpstra ar Williams kriterijus, kad būtų galima palyginti atskirų koncentracijų ir kontrolinių ėminių rezultatus, jei atsakas yra tolydusis, ir lyginimo mažėjimo tvarka Cochran-Armitage kriterijus, jei atsakai yra dvireikšmiai ir atitinka monotonišką koncentracijos bei atsako priklausomybę, nesant didesnės nei binominio skirstinio dispersijos įrodymų (14). Kai yra didesnės nei binominio skirstinio dispersijos įrodymų, rekomenduojama Cochran-Armitage kriterijaus Rao-Scott modifikacija (15) (16) arba Williams ar Dunnett (po kvadratinės šaknies arksinuso transformacijos) ar Jonckheere-Terpstra kriterijus, taikomas kartotinių ėminių dalims. Jei duomenys neatitinka monotoniškos koncentracijos ir atsako priklausomybės, gali būti naudingas Dunnett ar Dunn arba Mann-Whitney metodas, jei atsakai tolydieji, ir Fisher tikslusis kriterijus, jei atsakai dvireikšmiai (14) (17) (18). Taikant statistinį metodą ar modelį, reikėtų imtis priemonių užtikrinti, kad būtų atitiktis metodo ar modelio reikalavimams (pvz., bandymo schemoje ir naudojant kriterijų ar modelį turi būti atsižvelgta į įvertintą kintamumą tarp kamerų). Reikėtų įvertinti duomenų normalumą, o 5 priedėlyje nurodyta, ką reikėtų daryti su ANOVA liekanomis. 6 priedėlyje aptariami papildomi regresijos metodo taikymo aspektai. Reikėtų atsižvelgti į transformacijas, kad būtų įvykdyti statistinio kriterijaus reikalavimai. Tačiau transformacijas regresijos modeliui priderinti reikia daryti atsargiai, pvz., žinant, kad 25 % netransformuoto atsako pokytis neatitinka 25 % transformuoto atsako pokyčio. Tiek hipotezės tikrinimo kriterijuose, tiek regresijos modelyje reikėtų atsižvelgti į tai, kad, atliekant visas analizes, analizės ir bandymų vienetas yra bandymo kamera, o ne atskira žuvis (3) (14) (19) (20).

Bandymo ataskaita

34. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

Vienakomponentė cheminė medžiaga:

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizinės ir cheminės savybės;

— cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, priemaišų cheminio identifikavimo duomenys, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt. (įskaitant organinės anglies kiekį, jei jos yra).

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

— kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminio identifikavimo duomenis (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.

Bandymo gyvūnų rūšys:

— mokslinis pavadinimas, veislė, šaltinis, apvaisintų ikrų surinkimo metodas ir vėlesnis tvarkymas.

▼M7

Bandymo sąlygos:

— taikyta bandymų procedūra (pusiau statinis ar dinaminis, įkrova),

— šviesiojo laikotarpio trukmė (-ės);

— bandymų schema (pvz., bandymų kamerų ir kartotinių ėminių skaičius, vieno kartotinio ėminio ikrų skaičius, bandymų kameros medžiaga ir matmenys (aukštis, plotis, tūris), vienos kameros vandens tūris);

— pradinių tirpalų paruošimo metodas ir atnaujinimo dažnumas (reikėtų nurodyti tirpumo agentą, jei naudojamas, ir jo koncentraciją);

— bandomosios cheminės medžiagos dozavimo metodas (pvz., siurbliai, skiedimo sistemos);

— metodo atgavimo efektyvumas ir nominalios bandymų koncentracijos vertės, kiekybinio nustatymo riba, išmatuotų verčių vidurkiai bandymo indui ir jų standartiniai nuokrypiai, šių verčių gavimo metodas ir įrodymas, kad matavimai susiję su bandomosios cheminės medžiagos tikrojo tirpalo koncentracija;

— skiedimo vandens charakteristikos: pH, kietumas, temperatūra, ištirpusio deguonies koncentracija, liekamojo chloro koncentracija (jei matuojama), bendroji organinė anglis (jei matuojama), suspenduotos kietosios dalelės (jei matuojamos), bandymo terpės druskingumas (jei matuojamas) ir visi kiti atlikti matavimai,

— bandymų indų vandens kokybė, pH, kietumas, temperatūra ir ištirpusio deguonies koncentracija;

— išsami informacija apie maitinimą (pvz., maisto rūšis (-ys), šaltinis, duodamas kiekis ir maitinimo dažnumas).

Šių vertinamųjų baigčių rezultatai, kurie ataskaitoje pateikiami atskirai (arba kaip kartotinių ėminių rezultatai), jų vidurkis ir variacijos koeficientas, jei reikia:

— įrodymai, kad kontroliniai ėminiai atitinka bandymų rūšies išgyvenamumo priimtinumo standartą (2 priedėlis);

— gaištamumo kiekvienoje stadijoje (embrionas, lervos ir mailius) ir bendri gaištamumo duomenys;

— paros iki išsiritimo, kiekvieną parą išsiritusių lervų skaičius ir išsiritimo pabaiga;

— sveikų žuvų skaičius bandymo pabaigoje;

— išgyvenusių gyvūnų ilgio (nurodyti standartinio ar viso) ir masės duomenys;

— morfologinių anomalijų, jei yra, dažnumas, aprašymas ir skaičius;

— neįprasto elgesio reiškinių, jei pasireiškė, dažnumas, aprašymas ir skaičius;

— statistinės analizės metodas (regresinė analizė ar dispersinė analizė) ir duomenų apdorojimas (taikytas statistinis kriterijus ar modelis);

— kiekvieno vertinto atsako nestebimo poveikio koncentracija (NOEC);

▼M7

— kiekvieno vertinto atsako mažiausia stebimo poveikio koncentracija (kai p = 0,05) (LOEC);

— kiekvieno vertinto atsako EC_x, jei taikoma, ir pasikliovimo intervalai (pvz., 90 % ar 95 %); skaičiavimams naudoto priderinto modelio grafikas, koncentracijos ir atsako priklausomybės kreivės krypties koeficientas, regresijos modelio formulė, įvertinti modelio parametrai ir jų standartinės paklaidos.

Visi nukrypimai nuo bandymų metodo.

Rezultatų aptarimas, įskaitant nukrypimų nuo šio bandymų metodo įtaką bandymų rezultatams.

1 lentelė

Bandyti rekomenduojamų žuvų rūšys

GĖLAVANDENĖS	UPIŲ ŽIOČIŲ ir JŪRŲ
Oncorhynchus mykiss Vaivorykštinis upėtakis	*Cyprinodon variegatus* Margasis dančiakarpis
Pimephales promelas Juodoji drūtagalvė rainė	*Menidia* sp. Priekrančių menidija
Danio rerio Zebrinė danija	
Oryzias latipes Japoninė medaka	

LITERATŪRA

(1) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.171, OECD, Paris.

(2) 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, OECD Paris.

(3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88. 26 pp.

(4) Brauhn, J.L. and R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(5) Brungs, W.A. and B.R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(6) Adolfsson-Erici, *et al*. (2012), A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests, Chemosphere 86, 593-599.

(7) Hutchinson, T.H. *et al*. (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69-92.

(8) Šio priedo C.20 skyrius. Daphnia magna *reprodukcijos bandymas*.

(9) Hansen, D.J. and P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (Cyprindon variegatus) for life-cycle toxicity tests, In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.

(10) Kimmel, H. B.*et al*. (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203:253–310.

▼M7

(11) Gonzalez-Doncel, M. *et al* (2005), A quick reference guide to the normal development of Oryzias latipes (Teleostei, Adrinichthydae) Journal of Applied Ichthyology, 20:1–14.

(12) Devlin, E.W. *et al*. (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, Pimephales promelas Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C..

(13) Oris, J.T., S.C. Belanger, and A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, Environmental Toxicology and Chemistry 31; 2, 370 – 376.

(14) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.

(15) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

(16) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

(17) Dunnett C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of Ameican Statistical Association, 50, 1096-1121.

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

(19) Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (1985), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.

(20) McClave, J.T., J.H. Sullivan and J.G. Pearson (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼M7

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

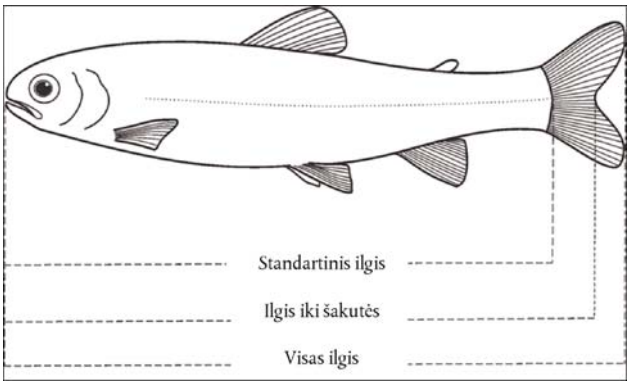
Ilgis iki šakutės (FL) – ilgis nuo snukio galo iki uodeginio peleko vidurinių spindulių galo ir naudojamas toms žuvims, kurioms sunku nustatyti stuburo pabaigą (www.fishbase.org).

Standartinis ilgis (SL) – žuvies ilgis, išmatuotas nuo snukio galo iki paskutiniojo slankstelio užpakalinio galo arba iki stuburo plokštės mediolateralinės dalies užpakalinio galo. Kitaip tariant, į šį matmenį neįtrauktas uodeginio peleko ilgis. (www.fishbase.org).

Visas ilgis (TL) – ilgis nuo snukio galo iki uodeginio peleko ilgesnės mentės galo, paprastai matuojamas mentes prispaudus išilgai vidurio linijos. Tai yra tiesinis matmuo, o ne matuojamas pagal kūno išlinkimą (www.fishbase.org).

1 paveikslas

Įvairių naudojamų ilgių apibūdinimas



Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

EC_x – (x % poveikio koncentracija) – koncentracija, kuriai esant daromas poveikis x % bandymo organizmų, palyginti su kontroliniu ėminiu per tam tikrą veikimo laikotarpį. Pvz., EC_{50} yra įvertinta koncentracija, kuri daro poveikį 50 % veikiamos populiacijos bandymo vertinamajai baigčiai per tam tikrą veikimo laikotarpį.

Mažiausia stebimo poveikio koncentracija (LOEC) – mažiausia bandymo koncentracija, kuriai esant stebimas cheminės medžiagos poveikis yra statistiškai reikšmingas, palyginti su kontroliniu ėminiu ($p < 0,05$). Tačiau esant visoms didesnėms nei LOEC bandymo koncentracijos vertėms, kenksmingas poveikis turėtų būti lygus arba didesnis nei poveikis, kuris būtų esant LOEC. Kai negalima įvykdyti šių dviejų sąlygų, turėtų būti pateiktas išsamus paaiškinimas, kaip buvo pasirinkta LOEC (taigi ir NOEC) vertė. Nurodymai pateikti 5 ir 6 priedėliuose.

Nestebimo poveikio koncentracija (NOEC) – vos mažesnė nei LOEC bandymo koncentracija, kuri per nurodytą veikimo laikotarpį nedaro statistiškai reikšmingo poveikio ($p < 0,05$), palyginti su kontroliniu ėminiu.

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

IUPAC – Tarptautinė teorinės ir taikomosios chemijos sąjunga.

SMILES – supaprastinto molekulių pateikimo linijine forma specifikacija.

▼M7

2 priedėlis

REKOMENDUOJAMŲ RŪŠIŲ BANDYMŲ SĄLYGOS, TRUKMĖ IR IŠGYVENAMUMO KRITERIJAI

RŪŠIS	BANDYMŲ SĄLYGOS			REKOMENDUOJAMA BANDYMŲ TRUKMĖ	Tipinis mažiausias kontrolinių žuvų visas vidutinis ilgis tyrimo pabaigoje (mm) ([1])	KONTROLINIŲ ĖMINIŲ ŽUVŲ IŠGYVENAMUMAS (ne mažesnis)	
	Temperatūra (°C)	Druskingumas ($^0/_{00}$)	Šviesiojo laikotarpio trukmė (h)			Išsiritimo procentinė dalis	Išsiritusių lervų išgyvenamumas
Gėlasis vanduo							
Oncorhynchus mykiss Vaivorykštinis upėtakis	10 ± 1,5 ([2])		12–16 ([3])	2 savaitės po kontrolinių ėminių žuvų maitinimo iki soties pradžios (arba 60 parų po išsiritimo)	40	75 %	75 %
Pimephales promelas Juodoji drūtagalvė rainė	25 ± 1,5		16	32 paros nuo bandymo pradžios (arba 28 paros po išsiritimo)	18	70 %	75 %
Danio rerio Zebrinė danija	26 ± 1,5		12–16 ([4])	30 parų po išsiritimo	11	70 %	75 %
Oryzias latipes Japoninė medaka	25 ± 2		12–16 ([4])	30 parų po išsiritimo	17	80 %	80 %
Upių žiočių ir jūrų:							
Cyprinodon variegatus Margasis dančiakarpis	25 ± 1,5	15–35 ([5])	12–16 ([4])	32 paros nuo bandymo pradžios (arba 28 paros po išsiritimo)	17	75 %	80 %
Menidia sp. Priekrančių menidija	22–25	15–35 ([5])	13	28 paros	20	80 %	60 %

Paaiškinimas:

([1]) Tipinis mažiausias visas vidutinis ilgis nėra tinkamumo kriterijus, bet didesnius nei nurodyti skaičiai nukrypimus reikėtų atidžiai ištirti atsižvelgiant į bandymo jautrį. Mažiausias visas vidutinis ilgis yra gautas pagal šiuo metu turimus atrinktus duomenis.

([2]) Tam tikras bandomų vaivorykštinių upėtakių veisles gali tekti laikyti kitoje temperatūroje. Neršiančios žuvys turi būti laikomos toje pačioje temperatūroje, kurioje buvo laikomi ikrai. Gavus ikrus iš komercinio veisėjo, po atvykimo yra būtinas trumpas (pvz., 1–2 h) aklimatizavimas bandymo temperatūroje.

([3]) Lervos vieną savaitę po išsiritimo laikomos tamsoje, išskyrus apžiūros metą, vėliau – prislopintoje šviesoje visą bandymo trukmę (12–16 h šviesiojo laikotarpio trukmė) ([4]).

([4]) Esant tam tikroms bandymų sąlygoms, apšvietimo režimas turėtų būti pastovus.

([5]) Atliekant visus bandymus tai turi būti nustatyta ± $2^0/_{00}$ tikslumu.

02008R0440 — LT — 18.05.2017 — 007.001 — 2064

▼M7

3 priedėlis

REKOMENDUOJAMŲ RŪŠIŲ NERŠIANČIŲ IR BANDYMŲ GYVŪNŲ MAITINIMO BEI PRIEŽIŪROS REKOMENDACIJOS

RŪŠIS	MAISTAS (*)				PERNEŠIMO PO IŠSIRITIMO LAIKAS	PIRMOJO MAITINIMO LAIKAS
	Neršianti žuvis	Tik ką išsiritusios lervos	Mailius			
			Tipas	Dažnumas		
Gėlasis vanduo						
Oncorhynchus mykiss Vaivorykštinis upėtakis	upėtakių maistas	Jokio ([a])	upėtakių mailiaus maistas BSN	2–4 kartus per parą	14–16 parų po išsiritimo ar nuo plaukimo pradžios (pasirinktinai)	19 parų po išsiritimo ar nuo plaukimo pradžios
Pimephales promelas Juodoji drūtagalvė rainė	BSN, maisto dribsniai FBS	BSN	BSN 48, maisto dribsniai	2–3 kartus per parą	kai išsirita 90 %	2 paros po išsiritimo
Danio rerio Zebrinė danija	BSN, maisto dribsniai	Pirktinis lervų maistas, pirmuonys ([b]), baltymai ([c])	BSN48, maisto dribsniai,	BSN kartą per parą; maisto dribsniai du kartus per parą	kai išsirita 90 %	2 paros po išsiritimo
Oryzias latipes Japoninė medaka	maisto dribsniai	BSN, maisto dribsniai (arba pirmuonys ar verpetės)	BSN48, maisto dribsniai (arba verpetės)	BSN kartą per parą; maisto dribsniai du kartus per parą arba maisto dribsniai ir verpetės kartą per parą	Netaikoma	6–7 paros po neršto
Upių žiočių ir jūrų:						
Cyprinodon varieqatus Margasis dančiakarpis	BSN, maisto dribsniai, FBS	BSN	BSN48	2–3 kartus per parą	Netaikoma	1 para po išsiritimo ar nuo plaukimo pradžios
Menidia sp. Priekrančių menidija	BSN 48, maisto dribsniai	BSN	BSN48	2–3 kartus per parą	Netaikoma	1 para po išsiritimo ar nuo plaukimo pradžios

Paaiškinimas:

(*) Reikėtų maitinti iki soties. Jei būtina, maisto perteklių ir išmatas reikėtų pašalinti, kad nesikauptų atliekos.
FBS – šaldytos sūriavandenės krevetės; suaugusios *Artemia* sp;
BSN – sūriavandenių krevečių nauplijai; tik ką išsiritę;
BSN48 – sūriavandenių krevečių nauplijai; 48 h amžiaus;
([a]) lervų su trynio maišeliu maitinti nereikia;
([b]) filtruoti iš kultūros mišinio;
([c]) fermentavimo proceso granulės.

▼M7

4 priedėlis

KAI KURIOS TINKAMO SKIEDIMO VANDENS CHEMINĖS CHARAKTERISTIKOS

Komponentas	Ribinė koncentracija
Kietosios dalelės	5 mg/l
Bendroji organinė anglis	2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	1 µg/l
Liekamasis chloras	10 µg/l
Bendras fosforo organinių pesticidų kiekis	50 ng/l
Bendras chloro organinių pesticidų ir polichlorintųjų bifenilų kiekis	50 ng/l
Bendras organinio chloro kiekis	25 ng/l
Aliuminis	1 µg/l
Arsenas	1 µg/l
Chromas	1 µg/l
Kobaltas	1 µg/l
Varis	1 µg/l
Geležis	1 µg/l
Švinas	1 µg/l
Nikelis	1 µg/l
Cinkas	1 µg/l
Kadmis	100 ng/l
Gyvsidabris	100 ng/l
Sidabras	100 ng/l

▼M7

5 priedėlis

NOEC NUSTATYMO STATISTINĖS ANALIZĖS REKOMENDACIJOS

Bendrosios nuostatos

Analizės vienetas yra kartotinio ėminio indas. Todėl, atliekant nuolatinius matavimus, pvz., dydžio, reikėtų apskaičiuoti kartotinio ėminio vidurkį arba medianą ir šios kartotinio ėminio vertės yra analizės duomenys. Reikėtų įrodyti taikomų kriterijų galią, pageidautina pagrįstą atitinkama kiekvienos laboratorijos istorinių duomenų baze. Kiekvienai vertinamajai baigčiai reikėtų gauti poveikio dydį, kuris, taikant statistinius kriterijus, gali būti aptiktas esant 75–80 % galiai.

Šio bandymų metodo kūrimo metu turimos duomenų bazės nustato galią, kuri yra įmanoma taikant rekomenduojamas statistines procedūras. Atskira laboratorija turėtų įrodyti savo sugebėjimą atitikti šį galios reikalavimą, atlikdama savo galios analizę arba įrodydama, kad kiekvieno atsako variacijos koeficientas (VK) nėra didesnis nei rengiant šias bandymo gaires naudoto VK 90-oji procentilė. Šios VK vertės pateiktos 1 lentelėje. Jei yra tik kartotinių ėminių vidurkiai ar medianos, į kartotinių ėminių VK galima neatsižvelgti.

1 lentelė

90-osios procentilės VK vertės, gautos pasirinktoms gėlavandenėms rūšims

Rūšis	Atsakas	VK tarp kartotinių ėminių	Kartotinių ėminių VK
Vaivorykštinis upėtakis	Ilgis	17,4	9,8
	Masė	10,1	28
Juodoji drūtagalvė rainė	Ilgis	16,9	13,5
	Masė	11,7	38,7
Zebrinė danija	Ilgis	43,7	11,7
	Masė	11,9	32,8

Beveik visi statistiniai kriterijai, taikyti įvertinant laboratorijos toksikologinius tyrimus, yra skirti apdorotos grupės ir kontrolinių ėminių tiriamiems palyginimams. Dėl šios priežasties negalima reikalauti tikrinti pagal reikšmingą ANOVA F kriterijų prieš taikant Dunnett ar Williams kriterijų arba pagal reikšmingą Kruskal-Wallis kriterijų prieš taikant Jonckheere-Terpstra, Mann-Whitney ar Dunn kriterijų (Hochberg and Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al*. 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Taikant Dunnett kriterijų, galima atlikti daugybines korekcijas, todėl jo klaidingi teigiami ir klaidingi neigiami rodikliai yra netinkami F kriterijaus reikšmingumui nustayti. Panašiai, mažėjimo tvarka taikomi Williams ir Jonckheere-Terpstra kriterijai, naudojant 0,05 reikšmingumo lygį, kiekvienoje pakopoje užtikrina visuminę 5 % klaidingai teigiamų rodiklių dalį, ir ši dalis bei kriterijų galia yra netinkami nustatant pagal F ar Kruskal-Wallis kriterijų reikšmingumą. Todėl reikia daryti Mann-Whitney ir Dunn kriterijų pataisą dėl daugybinių korekcijų ir tam rekomenduojama Bonferroni-Holm pataisa.

Daugumą rekomendacijų dėl hipotezių tikrinimo ir šiems kriterijams pagrįsti naudojamų prielaidų tikrinimo išsamiai aptariama EBPO (2006 m.) dokumente, kuriame taip pat pateikiama daug bibliografijos šaltinių.

▼M7

Kontrolinių ėminių apdorojimas, kai naudojamas tirpiklis

Jei naudojamas tirpiklis, reikėtų įtraukti skiedimo vandens kontrolinį ėminį ir tirpiklio kontrolinį ėminį. Jei tarp kontrolinių ėminių nenustatoma reikšmingo skirtumo, abu kontrolinius ėminius reikėtų palyginti dėl kiekvieno atsako ir sujungti atliekant statistinę analizę. Priešingu atveju tirpiklio kontrolinį ėminį reikėtų naudoti nustatant NOEC ar įvertinant EC_x, o vandens kontrolinio ėminio nenaudoti. Žr. tinkamumo kriterijų apribojimus (7 pastraipa)

Ilgiui, masei, išsiritusių ikrų arba nugaišusių ar nenormalių lervų daliai ir pirmajai ar paskutinei išsiritimo parai ar plaukimo pradžiai reikėtų taikyti T kriterijų arba Mann-Whitney kriterijų skiedimo vandens ir tirpiklio kontroliniams ėminiams palyginti esant 0,05 reikšmingumo lygiui, nekreipiant dėmesio į apdorotas grupes. Tikrinimo pagal šiuos kriterijus rezultatai turėtų būti pateikti ataskaitoje.

Dydžio matavimai (ilgio ir masės)

Atskirų žuvų ilgio ir masės verčių pasiskirstymas gali būti normalusis ar lognormalusis. Bet kuriuo atveju kartotinių ėminių vidutinės vertės linkusios į normalųjį pasiskirstymą, atsižvelgiant į centrinę ribinę teoremą, ir tai patvirtina daugiau kaip šimtas trijų gėlavandenių žuvų rūšių ankstyvųjų gyvenimo stadijų toksiškumo tyrimų. Be to, jei duomenys ar istorinės duomenų bazės rodo atskirų žuvų dydžio verčių lognormalųjį pasiskirstymą, galima apskaičiuoti atskirų žuvų verčių kartotinio ėminio vidurkio logaritmą ir tada analizės duomenys gali būti šių kartotinių ėminių vidurkių logaritmų antilogaritmai.

Duomenis reikėtų patikrinti dėl atitikties normaliajam pasiskirstymui ir dispersijos vienalytiškumui. Šiam tikslu reikėtų naudoti ANOVA modelio liekanas ir koncentraciją kaip vienintelį nepriklausomą kintamąjį. Galima naudoti vizualinį nustatymą pagal sklaidos diagramas ir histogramas arba kamieninę-lapinę diagramą. Arba galima taikyti formalųjį kriterijų, pvz., Shapiro-Wilk ar Anderson-Darling. Atitiktis dispersijos vienalytiškumui gali būti įvertinta vizualiai tiriant tą pačią sklaidos diagramą arba formaliai pagal Levene kriterijų. Įvertinamas tik parametrinių kriterijų (pvz., Williams, Dunnett) normalumas ar dispersijos vienalytiškumas.

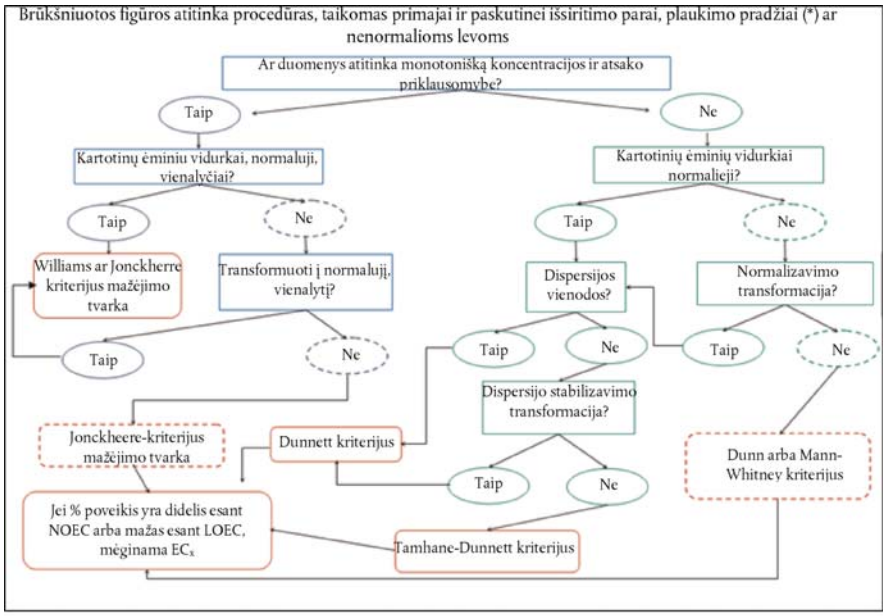
Reikėtų atkreipti dėmesį į galimus riktus ir jų įtaką analizei. Galima taikyti Tukey riktų kriterijų ir vizualiai patikrinti pirmiau aprašytus liekanų grafikus. Reikėtų priminti, kad stebėjimo vienetas yra visas kartotinis ėminys, todėl riktus iš analizės reikėtų šalinti tik po kruopštaus tyrimo.

Statistiniai kriterijai, kurie yra naudojami bandymų schemų ir biologinės tikimybės charakteristikoms yra tendencijos mažėjimo kriterijai, tokie kaip pvz., Williams ir Jonckheere-Terpstra. Tokiems kriterijams taikoma prielaida dėl koncentracijos ir atsako priklausomybės monotoniškumo, todėl duomenys turėtų būti vertinami siekiant nuoseklaus atitikimo tokiai prielaidai. Tai galima atlikti vizualiai, pagal kartotinių ėminių vidurkių sklaidos diagramą palyginant su bandymo koncentracijom. Būtų naudinga perdengti sklaidos diagramą tiesinio grafiko dalimis, kurios sujungtų koncentracijos vidurkius kaip kartotinio ėminio imties dydžio svertinius vidurkius. Didelis tokio tiesinio grafiko dalių nukrypimas nuo monotoniškumo rodytų, kad galbūt reikėtų naudoti ne tendencijos mažėjimo kriterijus. Arba galima taikyti formalius kriterijus. Paprastas formalus kriterijus yra apskaičiuoti koncentracijos vidurkių tiesinius ir kvadratinius kontrastus. Jei kvadratinis kontrastas yra reikšmingas, o tiesinis – ne, tai rodo, kad gali būti monotoniškumo problema, kurią reikėtų įvertinti pagal grafikus. Jei problema – normalumas ar dispersijos vienalytiškumas, šiuos kontrastus galima gauti pagal rangų transformacijos duomenis. Galima taikyti alternatyvias procedūras, pvz., Bartholomew monotoniškumo kriterijų, bet ši procedūra sudėtingesnė.

▼M7

2 paveikslas

Struktūrinė diagrama NOEC gauti pagal dydžio (ilgio ir masės) matavimus



(*) Šie atsakai niekuomet neatitinka parametrinės analizės ar modelių prielaidų.

Tais atvejais, kai duomenys neatitinka šių kriterijų reikalavimų, NOEC nustatoma mažėjimo tvarka taikant Williams ar Jonckheere-Terpstra kriterijus. Šios procedūros pateiktos EBPO (2006 m.). Jei duomenys neatitinka mažėjimo tvarka taikomo tendencijos kriterijaus, galima taikyti Dunnett kriterijų ar Tamhane-Dunnett (T3) kriterijų, kurie abu turi pataisas dėl daugybinių korekcijų. Taikant šiuos kriterijus daroma prielaida dėl normalumo, o Dunnett kriterijaus atveju – dėl dispersijos vienalytiškumo. Jei duomenys šių sąlygų neatitinka, galima taikyti Dunn neparametrinį kriterijų. Išsami informacija apie šiuos kriterijus pateikta EBPO (2006 m.). 2 paveiksle pateikta tinkamų kriterijų pasirinkimo apžvalga.

Išsiritimas iš ikrų ir lervų išgyvenamumas

Duomenys yra išsiritimo iš ikrų ar išgyvenusių lervų dalis atskirame kartotiniame ėminyje. Šias dalis reikėtų įvertinti dėl didesnės nei binominio skirstinio dispersijos, kuri yra įprastinė, bet ne visuotinė tokių matavimų dispersija. 3 paveiksle pateiktoje struktūrinėje diagramoje pateiktos rekomendacijos dėl tinkamo kriterijaus pasirinkimo; išsamus aprašymas pateiktas tekste.

Dažniausiai taikomi du kriterijai. Tai yra Tarone C(α) kriterijus (Tarone, 1979 m.) ir chi kvadratu kriterijus, kurių kiekvienas taikomas atskirai kiekvienai bandymo koncentracijai. Jei didesnė nei binominio skirstinio dispersija nustatoma nors vienai bandymo koncentracijai, reikėtų taikyti metodus, kurie su tokia sąlyga būtų suderinami.

1 formulė.

Tarone C (α) kriterijus (Tarone 1979 m.)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^{m} n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

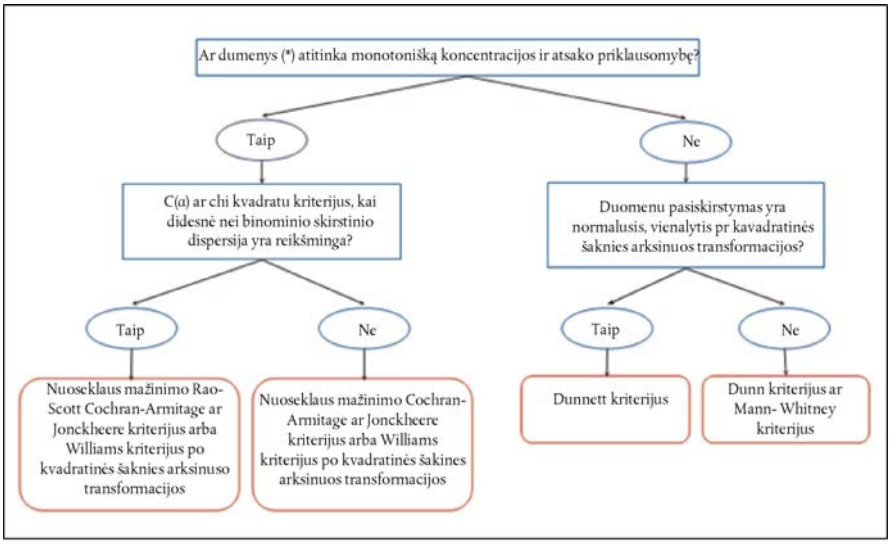
čia: $\hat{p}$ – vidutinė dalis esant tam tikrai koncentracijai, **m** – kartotinių ėminių indų skaičius, $\mathbf{n_j}$ – subjektų skaičius kartotiniame ėminyje **j**, ir $\mathbf{x_j}$ – reaguojančių subjektų tame kartotiniame ėminyje skaičius, pvz., neišsiritusių ar žuvusių. Šis

▼M7

kriterijus taikomas kiekvienai koncentracija atskirai. Į šį kriterijų galima žiūrėti kaip į pataisytą chi kvadratu kriterijų, bet Tarone atliktas ribotos galios modeliavimas parodė, kad jis yra didesnės galios nei chi kvadratu kriterijus.

3 paveikslas.

Struktūrinė diagrama NOEC gauti pagal išsiritimą iš ikrų ir lervų gaištamumą



(*) Duomenys yra kartotinių ėminių dalys.

Jei nėra reikšmingų didesnės nei binominio skirstinio dispersijos įrodymų, galima taikyti Cochran-Armitage kriterijų mažėjimo tvarka. Šis kriterijus neatsižvelgia į kartotinius ėminius, todėl, jei yra tokių įrodymų, reikėtų taikyti Cochran-Armitage kriterijų su Rao-Scott pataisa (RSCA), kuri atsižvelgia į kartotinius ėminius, kartotinių ėminių dydį ir į didesnę nei binominio skirstinio dispersiją, todėl ir yra rekomenduojama. Alternatyvūs kriterijai yra Williams ir Jonckheere-Terpstra kriterijai mažėjimo tvarka ir Dunnett kriterijus, aprašyti dydžio matavimams. Šie kriterijai taikomi, kai yra didesnė nei binominio skirstinio dispersija ar kai jos nėra, bet jų galia yra kažkiek mažesnė (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao and Scott 1992, 1999, Fung *et al.* 1994, 1996).

Pirmoji arba paskutinė išsiritimo arba plaukimo para

Atsakas yra sveikas skaičius, rodantis bandymo dieną, kurią yra stebimas nurodytas parametras tam tikrame kartotinio ėminio inde. Verčių intervalas paprastai yra labai ribotas ir dažnai esama didelės susijusių verčių dalies, pvz., ta pati pirmoji išsiritimo para stebima visuose kontroliniuose kartotiniuose ėminiuose ir galbūt vienos ar dviejų mažos koncentracijos verčių ėminiuose. Tokiems duomenims netinka parametriniai kriterijai, pvz., Williams ir Dunnett kriterijai. Jei nėra didelio nemonotoniškumo įrodymų, Jonckheere-Terpstra kriterijus mažėjimo tvarka turi didelę galią bandomosios cheminės medžiagos poveikiui aptikti. Priešingu atveju galima taikyti Dunn kriterijų.

Lervų anomalijos

Atsakas yra kokių nors anomalijų turinčių lervų skaičius. Šis atsakas labai dažnai yra mažo dažnumo ir turi kai kurių panašių pirmosios išsiritimo dienos problemų, taip pat kartais pastebima nepastovi koncentracijos ir atsako priklausomybė. Jei duomenys bent apytikriai atitinka monotonišką priklausomybės nuo koncentracijos formą, Jonckheere-Terpstra kriterijus mažėjimo tvarka turi didelę galią poveikiui aptikti. Priešingu atveju galima taikyti Dunn kriterijų.

▼M7

NUORODOS

Agresti, A. (2002); Categorical Data Analysis, second edition, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, J. American Statistical Association 50, 1096-1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, Technometrics 6, 241-252.

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

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, Risk Analysis 14, 639-648.

Fung, K.Y, D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, Canadian Journal of Statistics 24, 431-454.

Hochberg, Y. and A. C. Tamhane (1987); Multiple Comparison Procedures, Wiley, New York.

Hsu, J.C. (1996); Multiple Comparisons: Theory and Methods; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere A. R. (1954); A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, Biometrika 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, No. 54. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris..

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992) – A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1999) – A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright F.T. and Dykstra R.L. (1988); Order restricted statistical inference, Wiley.

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, Biometrika 66, 585-590.

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

Williams D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28, 519-531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratotlogy, Biometrics 31, 949-952.

Williams D.A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, Biometrika 64, 9-14.

▼M7

6 priedėlis

STATISTINĖS ANALIZĖS REKOMENDACIJOS ĮVERČIAMS GAUTI REGRESIJOS METODU

Bendrosios nuostatos

Modeliui priderinti naudoti stebėjimų duomenys yra kartotinių ėminių vidurkiai (ilgio ir masės) arba kartotinių ėminių dalys (išsiritimo iš ikrų ir lervų gaištamumo) (EBPO, 2006 m.).

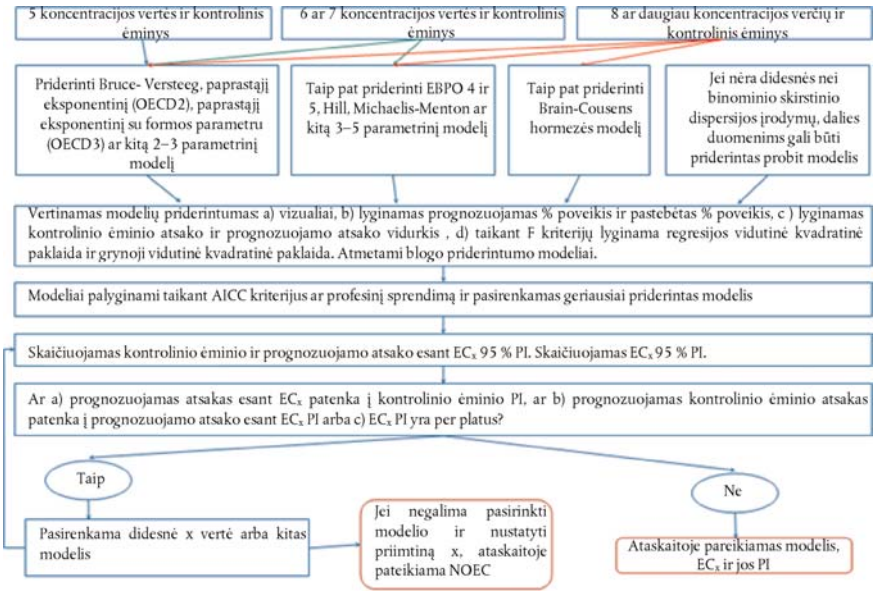
Paprastai patariama svertinė regresija pagal kartotinio ėminio imties dydį. Galima taikyti kitas svertinio įvertinimo schemas, pvz., svertinį įvertinimą pagal prognozuojamą vidutinį atsaką arba jo ir kartotinio ėminio imties dydžio derinį. Svertinis įvertinimas pagal vienos koncentracijos ėminių atvirkštinę dispersiją nerekomenduojamas (Bunke *et al.* 1999, Seber and Wild, 2003, Motulsky and Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

Transformuojant atsakus prieš analizę, reikėtų išsaugoti stebėjimo duomenų nepriklausomybę, ir EC_x, o jos pasikliovimo ribos turėtų būti išreikštos pradiniais matavimo vienetais, o ne transformuotais vienetais. Pvz., ilgio logaritmo 20 % pokytis nėra lygiavertis ilgio 20 % pokyčiui (Lyles *et.al* 2008, Draper and Smith 1999).

4 paveiksle pateikta struktūrinė diagrama EC_x įverčiams gauti. Išsamesnis paaiškinimas pateiktas tolesniame tekste.

4 paveikslas

EC_x įvertinimo pagal kartotinių ėminių vidutinį ilgį, masę arba išsiritimo iš ikrų ar lervų gaištamumo dalį struktūrinė diagrama, išsamesnis paaiškinimas pateiktas tekste



Išsiritimo iš ikrų ir lervų gaištamumo aspektai

Jei imamas išsiritimas iš ikrų ir lervų gaištamumas, paprastai būtų geriau priderinti mažėjimo modelį, nebent būtų priderinamas probit regresijos modelis, kaip aprašyta toliau. T. y reikėtų modeliuoti pagal neišsiritusių ikrų ar žuvusių lervų dalį. To priežastis – EC_x atitinka koncentraciją, kuriai esant pokytis yra lygus x % kontrolinio ėminio vidutinio atsako. Jei neišsirita 5 % kontrolinio ėminio ikrų ir modeliuojama pagal neišsiritusių ikrų skaičių, EC_{20} rodytų koncentraciją, kuriai esant yra 20 % pokytis, palyginti su 5 % kontrolinio ėminio neišsiritusių ikrų, t. y. pokytis yra 0,2 × 0,05 = 0,01 arba 1 procentinis punktas ir iš viso neišsirito 6 %. Toks nedidelis pokytis negali būti kaip nors prasmingai įvertintas

▼M7

pagal turimus duomenis ir nėra biologiškai svarbus. Tačiau, jei modeliuojama pagal išsiritusių ikrų kiekį, kontrolinio ėminio dalis šiame pavyzdyje būtų 95 %, o 20 % sumažėjimas, palyginti su kontrolinio ėminio vidurkiu, sudarytų pokytį 0,95 × 0,2 = 0,18, taigi nuo 95 % iki 77 % (= 95 – 18) išsiritusių ikrų procentinės dalies, todėl poveikio koncentracija gali būti įvertinta ir ji turbūt daug svarbesnė. Taip nėra matuojant dydį, nors neigiamas poveikis dydžiui paprastai reiškia dydžio sumažėjimą.

Dydžio (ilgio arba masės) ir išsiritimo iš ikrų ar lervų išgyvenamumo dalies modeliai

Išskyrus Brain-Cousens hormezės modelį, visi šie modeliai yra aprašyti ir rekomenduojami EBPO (2006 m.). Tai, kas vadinama EBPO 2-5, taip pat yra aptarta dėl ekotoksiškumo bandymų, Slob (2002). Aišku, kad yra daug kitų modelių, kurie galėtų būti naudingi. Bunke *et al*. (1999) išvardyta daug į šį dokumentą neįtrauktų modelių ir yra labai daug nuorodų į kitus modelius. Toliau išvardyti metodai yra siūlomi kaip ypač tinkami ekotoksiškumo bandymams ir yra plačiai taikomi.

Penkios bandymo koncentracijos vertės ir kontrolinis ėminys:

— Bruce-Versteeg;

— paprastasis eksponentinis (EBPO 2);

— eksponentinis su formos parametru (EBPO 3);

— paprastasis eksponentinis su apatine riba (EBPO 4).

Daugiau kaip šešios bandymo koncentracijos vertės ir kontrolinis ėminys:

— eksponentinis su formos parametru ir apatine riba (EBPO 5);

— Michaelis-Menten;

— Hill.

Jei yra vizualūs hormezės įrodymai (maža jos tikimybė išsiritimo iš ikrų ar lervų išgyvenamumo daliai, bet kartais stebima dydžio duomenims):

— Brain-Cousens Hormetic; Brain and Cousens (1989 m.)

Alternatyvūs išsiritimo iš ikrų ar lervų išgyvenamumo dalies modeliai

— Šių atsakų didėjimo modeliai gali būti priderinti pagal probit (ar logistinio skirstinio) modelį, jei nėra didesnės nei binominio skirstinio dispersijos įrodymų, o priderinant modelį įvertinamas kontrolinio ėminio incidentiškumas. Šis metodas nėra tinkamiausias, nes kaip analizės vienetas imamas pavienis, o ne kartotinis ėminys (Morgan 1992, O'Hara Hines and Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Atskiro modelio suderintumas

— Vizualiai lyginamas stebimas ir prognozuojamas procentinis sumažėjimas kiekvienai bandymo koncentracijai (Motulsky and Christopoulos 2004, Draper and Smith 1999).

— Taikant F kriterijų lyginama regresijos vidutinė kvadratinė paklaida ir grynoji vidutinė kvadratinė paklaida (Draper and Smith 1999).

— tikrinama, ar kad kiekvienas modelio narys gerokai skiriasi nuo nulio (pvz., nustatoma, ar visi modelio nariai yra svarbūs), (Motulsky and Christopoulos 2004).

▼M7

— Gaunamas regresijos liekanų kaip bandymų koncentracijos funkcijos grafikas, galbūt log (koncentracijos) skalėje. Neturėtų būti jokio šio grafiko modelio; taškai turėtų būti atsitiktinai išsisklaidę apie horizontalią liniją nulio aukštyje.

— Duomenys turėtų būti įvertinami dėl normalumo ir dispersijos vienalytiškumo 5 priedėlyje nurodytu būdu.

— Be to, liekanų apie regresijos modelį normalumas turėtų būti vertinamas taikant metodus, kurie 5 priedėlyje yra nurodyti ANOVA liekanoms.

Modelių palyginimas

— Taikomi Akiake informacijos kriterijai (AICc). Mažesnės AIC vertės žymi geresnius suderintumus ir, jei AICc(B)-AICc(A) ≥ 10, A modelis beveik neabejotinai yra geresnis nei B modelis (Motulsky and Christopoulos (2004).

— Du modeliai lyginami vizualiai pagal tai, kaip gerai jie atitinka pirmiau nurodytus vieno modelio kriterijus.

— Siūlomas paprastumo principas, kai taikomas paprasčiausias duomenis atitinkantis modelis (Ratkowsky 1993, Lyles et.al 2008).

EC_x įverčio kokybė

EC_x pasikliovimo intervalas (PI) neturėtų būti labai platus. Statistiškai reikėtų pagrįsti sprendimą dėl pasikliovimo intervalo pločio ir dėl vis dar tinkamo EC_x naudingumo. Išsiritimo iš ikrų ir dydžių duomenų regresijos modelių priderinimo tikrinimas rodo, kad maždaug 75 % EC_x (x = 10, 20 ar 30) pasikliovimo intervalų aprėpia ne daugiau kaip dvi koncentracijos vertes. Taip gaunamos bendrosios priimtinumo rekomendacijos ir praktinės pasiekiamumo rekomendacijos. Daug autorių teigia, kad ataskaitoje reikia pateikti visų modelio parametrų pasikliovimo intervalus, o platus modelio parametrų pasikliovimo intervalas rodo nepriimtiną modelį (Ott and Longnecker 2008, Alvord and Rossio 1993, Motulsky and Christopoulos 2004, Lyles *et al.* 2008, Seber and Wild 2003, Bunke *et al*. 1999, Environment Canada 2005).

EC_x pasikliovimo intervale (ar kitame modelio parametre) neturėtų būti nulio (Motulsky and Christopoulos 2004). Tai yra tas pat, kaip regresijai būtų minimalus reikšmingas skirtumas, kuris dažnai nurodomas taikant hipotezių tikrinimo metodus (pvz., Wang *et al* 2000). Tai taip pat atitinka LOEC atsakų vidurkių pasikliovimo intervalą, į kurį nepatenka kontrolinio ėminio vidurkis. Reikėtų įsitikinti, kad parametrų įverčiai yra moksliškai patikimi. Pvz., jei y0 pasikliovimo intervalas yra ± 20 %, joks EC_{10} įvertis nėra patikimas. Jei koncentracijai C pagal modelį prognozuojamas 20 % poveikis, o didžiausias stebimas poveikis esant C ir mažesnei koncentracijai yra 10 %, EC_{20} nėra patikima (Motulsky and Christopoulos 2004, Wang *et al.* 2000, Environment Canada 2005).

EC_x neturėtų prireikti ekstrapoliacijos toliau nei teigiamų koncentracijos verčių intervalas (Draper and Smith 1999, EBPO 2006). Pvz., bendroji rekomendacija galėtų būti tokia, kad EC_x turi būti ne daugiau kaip 25 % mažesnė nei mažiausia bandyta koncentracija ir ne daugiau kaip 25 % didesnė nei didžiausia bandyta koncentracija.

NUORODOS

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, Journal of Immunological Methods 157, 155-163.

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

▼M7

Bunke, O., Droge, B. and Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.

Collett, D. (2002); Modelling Binary Data, second edition, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003); Modelling Survival Data in Medical Research, second edition, Chapman and Hall, London.

Draper, N.R. and Smith, H. (1999); Applied Regression Analysis, third edition. New York: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005); Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests, Report EPS 1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, and C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 2008 November; 29(6): 878–886.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993); Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* Vol. 49, pp. 107-121

OECD (2006); Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series Testing and Assessment, No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, sixth edition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, Journal of Industrial Microbiology 12, 195-199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, Nonlinear Regression, Wiley, 2003

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66, 298-312

Wang, Q., D.L. Denton, and R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 19, pp. 113–117, 2000.

▼M7

C.48. TRUMPALAIKIS ŽUVŲ REPRODUKCIJOS TYRIMAS

ĮVADAS

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) 229 (2012). Poreikis parengti ir patvirtinti žuvų bandymą, kuriuo galima nustatyti endokrininę sistemą veikiančias chemines medžiagas, atsirado susirūpinus, kad aplinkos užterštumas cheminėmis medžiagomis gali kelti neigiamą poveikį ir žmonėms, ir laukinei gyvūnijai dėl šių cheminių medžiagų sąveikos su endokrinine sistema. 1998 m. EBPO iniciatyva pradėtas didelės svarbos darbas – peržiūrėti esamas gaires ir parengti naujas endokrininę sistemą galimai ardančių medžiagų atrankos ir bandymų gaires. Viena iš šio darbo dalių – parengti žuvų endokrininę sistemą veikiančių cheminių medžiagų atrankos bandymų gaires. Kad būtų įrodyta tyrimo svarba ir patikimumas, buvo atlikta trumpalaikio žuvų reprodukcijos tyrimo plataus masto patvirtinimo programa, kurią sudaro pasirinktų cheminių medžiagų tarplaboratoriniai tyrimai, siekiant aptikti chemines medžiagas, kurios pagal įvairius mechanizmus veikia žuvų reprodukciją, įskaitant poveikį endokrininei sistemai (1, 2, 3, 4, 5). Buvo patvirtintos visos EBPO juodosios drūtagalvės rainės bandymų gairių vertinamosios baigtys ir japoninės medakos (t. y. vitelogeninas ir antriniai lytiniai požymiai) bei zebrinės danijos (t. y. vitelogenino) vertinamųjų baigčių rinkinio dalis. Tinkamumo patvirtinimo darbus iš dalies peržiūrėjo ekspertų grupė, kurią paskyrė nacionaliniai EBPO bandymų gairių programos koordinatoriai (6), ir nepriklausoma ekspertų grupė, kurią įgaliojo Jungtinių Amerikos Valstijų Aplinkos apsaugos agentūra (29). Bandymas nėra skirtas specifiniams hormonų veiklos sutrikimo mechanizmams nustatyti, nes bandymo gyvūnai vis dar turi sveiką pagumburio, hipofizės ir lytinių liaukų (PHL) ašį, galinčią reaguoti į ją veikiančias chemines medžiagas, joms esant skirtingos koncentracijos.

2. Šiame bandymų metode aprašomas *in vivo* atrankos tyrimas, kai lytiškai subrendęs žuvies patinas ir neršianti patelė ribotą jų gyvavimo ciklo dalį (21 parą) laikomi kartu ir veikiami tam tikra chemine medžiaga. Pasibaigus 21 paros veikimo laikotarpiui, matuojamos dvi bandomosios cheminės medžiagos endokrininio aktyvumo biologinių žymenų vertinamosios baigtys; šios vertinamosios baigtys yra vitelogeninas ir antriniai lytiniai požymiai. Vitelogeninas matuojamas juodosios drūtagalvės rainės, japoninės medakos ir zebrinės danijos, o antriniai lytiniai požymiai – juodosios drūtagalvės rainės ir japoninės medakos organizme. Be to, kasdien visą bandymo laiką stebimas kiekybinis veislumas. Siekiant įvertinti bandymų gyvūnų reprodukcinį tinkamumą ir į įrodomosios vertės analizę įtraukti kitas vertinamąsias baigtis, lytinės liaukos konservuojamos ir gali būti įvertinta jų histopatologija.

3. Ši biologinis tyrimas yra *in vivo* poveikio reprodukcijai atrankos tyrimas ir jo taikymą reikėtų vertinti pagal EBPO endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo konceptualiąją sistemą (angl. *Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals*) (30). Pagal šią konceptualiąją sistemą trumpalaikis žuvų reprodukcijos bandymas pasiūlytas 3 lygiu kaip *in vivo* bandymas, kurį atliekant gaunami duomenys apie pasirinktą (-us) endokrininį (-ius) mechanizmą (-us) ar kelią (-ius).

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

4. Vitelogeniną (VTG) paprastai gamina kiaušinius dedančių moteriškos lyties stuburinių gyvūnų kepenys, kaip atsaką į cirkuliuojantį endogeninį estrogeną. Jis yra kiaušinio trynio baltymų pirmtakas ir, pagamintas kepenyse, keliauja krauju į kiaušidę, kurioje jį įsisavina ir modifikuoja besivystantys kiaušinėliai. Nesubrendusių žuvų patelių ir patinų plazmoje vitelogenino beveik neįmanoma aptikti, nes jų organizme nepakanka cirkuliuojančio estrogeno, tačiau kepenys gali sintetinti ir išskirti VTG, kaip atsaką į išorinį dirginimą estrogenais.

▼M7

5. Matuojant vitelogenino kiekį, galima nustatyti įvairias chemines medžiagas, turinčias įvairaus pobūdžio estrogeninį poveikį. Estrogenines chemines medžiagas galima aptikti matuojant vitelogenino indukciją žuvies patino organizme – tai išsamiai aprašyta ekspertų įvertintoje literatūroje (pvz. (7)). Taip pat nustatyta, kad vitelogenino indukciją sukelia aromatizuotų androgenų poveikis (8, 9). Sumažėjus patelių organizme cirkuliuojančiam estrogenų kiekiui, pvz., jei slopinama aromatazė, kuri endogeninį androgeną paverčia natūraliu estrogenu 17β-estradioliu, mažėja VTG koncentracija, naudojama aromatazės slopinimo savybių turinčioms cheminėms medžiagoms (10, 11). Yra nustatyta ir plačiai dokumentuota VTG atsako po estrogenų ar aromatazės slopinimo biologinė svarba. Tačiau įmanoma, kad VTG gamybai patelėse įtaką taip pat daro bendrasis toksiškumas ir neendokrininio toksinio veikimo būdai, pvz., toksinis poveikis kepenims.

6. Įprastam naudojimui sėkmingai sukurti ir standartizuoti keli matavimo metodai. Toks yra rūšių specifinės imunofermentinės analizės metodas (IFA), kurį taikant imunocheminiu būdu kiekybiškai nustatomas VTG, gautas mažuose iš atskirų žuvų paimtuose kraujo ar kepenų ėminiuose (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). VTG kiekiui išmatuoti imami juodosios drūtagalvės rainės kraujo, zebrinės danijos kraujo arba galvos ir uodegos homogenato bei medakos kepenų ėminiai. Tarp VTG kiekio, išmatuoto medakos kraujyje ir kepenyse, esama geros koreliacijos (19). 6 priedėlyje pateiktos rekomenduojamos VGT analizei skirtų ėminių ėmimo procedūros. VTG matavimo rinkiniai yra plačiai prieinami; tokie rinkiniai turėtų būti pagrįsti patvirtintu rūšims specifiniu IFA metodu.

7. Tam tikrų rūšių žuvų patinų antriniai lytiniai požymiai yra išoriškai matomi, kiekybiškai įvertinami ir reaguoja į cirkuliuojančius endogeninių androgenų kiekius; tai taikytina juodajai drūtagalvei rainei ir medakai, bet ne zebrinei danijai, kuri neturi kiekybiškai įvertinamų antrinių lytinių požymių. Patelės išlaiko gebėjimą išvystyti vyriškuosius antrinius lytinius požymius, kai yra paveikiamos androgeninėmis cheminėmis medžiagomis vandenyje. Mokslinėje literatūroje pateikiami keli tyrimai tokio tipo juodosios drūtagalvės rainės (20) ir medakos (21) organizmo reakcijai pagrįsti dokumentais. Patinų antrinių lytinių požymių sumažėjimą reikėtų vertinti atsargiai dėl mažos statistinės galios, be to, jis turėtų būti pagrįstas ekspertų vertinimais ir įrodomosios vertės analize. Kadangi zebrinė danija neturi kiekybiškai įvertinamų antrinių lytinių požymių, kurie reaguotų į androgeninio poveikio chemines medžiagas, jos naudojimas šiame tyrime yra ribotas.

8. Kalbant apie juodąją drūtagalvę rainę, pagrindinis išorinio androgeninio veikimo rodiklis yra poravimosi gumburėlių skaičius priekinėje patelės galvos dalyje. Kalbant apie medaką, pagrindinis išorinio veikimo androgeninėms cheminėms medžiagoms požymis yra patelės spenelinių ataugų skaičius. 5A ir 5B priedėliuose nurodytos rekomenduojamos procedūros, skirtos juodosios drūtagalvės rainės ir medakos lyties požymiams įvertinti.

9. 21 paros žuvų tyrimas aprėpia kiekybinį ikrų gamybos įvertinimą ir lytinių liaukų konservavimą, kad būtų galima atlikti neprivalomą histopatologinį tyrimą. Kad būtų galima išsamiau įvertinti bandymų gyvūnų reprodukcinį tinkamumą, arba tais atvejais, kai veikiant cheminei medžiagai nebuvo vitelogenino ir antrinių lytinių požymių atsako, kai kurios priežiūros institucijos gali pareikalauti papildomų vertinamųjų baigčių. Nors kai kurios vertinamosios baigtys gali ypač tikti diagnostikai (pvz., VTG indukcija patinuose ir gumburėlių susidarymas patelėse), ne visos tyrimo vertinamosios baigtys (pvz., vislumas ir lytinių liaukų histopatologija) yra skirtos vienareikšmiškai

▼M7

nustatyti specifinius ląstelių veikimo mechanizmus. Atvirkščiai, vertinamųjų baigčių seka, kaip visuma, leidžia daryti išvadas dėl galimų endokrininių sutrikimų ir tokiu būdu užtikrinti tolesnių bandymų gaires. Nors vislumas endokrininiu požiūriu nėra specifinis veiksnys, jis dėl įrodyto jautrio žinomoms endokrininę sistemą veikiančioms cheminėms medžiagoms (5) yra svarbi vertinamoji baigtis, kurią reikią įtraukti, nes kai ji ir kitos vertinamosios baigtys nėra paveiktos, yra didesnė tikimybė, kad junginys nerodo endokrininio aktyvumo. Tačiau jei paveikiamas vislumas, labai padidėja įrodomoji duomenų galia išvadoms padaryti. Rekomendacijos dėl duomenų aiškinimo ir bandymų rezultatų priimtinumo pateikiamos toliau šio bandymų metodo aprašyme.

10. Šiame bandymų metode vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

11. Atliekant tyrimą, chemine medžiaga veikiami kartu į bandymo indus patalpinti reprodukcinio amžiaus žuvų patinai ir patelės. Tyrime naudojamos suaugusios reprodukcinio amžiaus žuvys, todėl jas galima aiškiai atskirti pagal lytį, taigi ir atlikti su lytimi susijusią kiekvienos vertinamosios baigties analizę, be to, taip užtikrinamas jų jautrumas išorinėms cheminėms medžiagoms. Baigus bandymą, lytis patvirtinama makroskopiniu lytinių liaukų tyrimu atvėrus pilvo ertmę žirklėmis. Atitinkamų biologinio tyrimo sąlygų apžvalga pateikta 2 priedėlyje. Tyrimas paprastai pradedamas atrenkant žuvis iš neršiančių žuvų populiacijos; tyrime neturėtų būti naudojami senstantys gyvūnai. Rekomendacijos dėl žuvų amžiaus ir reprodukcinės būklės pateiktos skirsnyje *Žuvų atranka*. Tyrimas atliekamas naudojant trijų koncentracijos verčių cheminę medžiagą, taip pat vandens kontrolinį ėminį ir, jei reikia, tirpiklio kontrolinį ėminį. Tiriant zebrinę daniją, vienai bandomosios medžiagos dozei naudojami du indai arba du kartotiniai ėminiai (kiekviename inde yra po penkis patinus ir penkias pateles). Tiriant juodąją drūtagalvę rainę, vienai bandomosios medžiagos dozei naudojami keturi indai arba keturi kartotiniai ėminiai (kiekviename inde yra po du patinus ir keturias pateles). Taip daroma siekiant atsižvelgti į teritorinį juodosios drūtagalvės rainės patino elgesį, tačiau užtikrinant pakankamą tyrimo statistinę galią. Tiriant medaką, vienai bandomosios medžiagos dozei naudojami keturi indai arba keturi kartotiniai ėminiai (kiekviename inde yra po tris patinus ir tris pateles). Žuvys veikiamos 21 parą, o žuvų ėminiai imami 21-ą parą. Kiekybinių vislumo duomenų kontrolė atliekama kasdien.

12. Imant ėminius 21-ą parą visi gyvūnai humaniškai numarinami. Įvertinami juodosios drūtagalvės rainės ir medakos antriniai lytiniai požymiai (žr. 5A ir 5B priedėlius); iš zebrinės danijos ir juodosios drūtagalvės rainės paimami kraujo ėminiai VTG kiekiui nustatyti, arba jam nustatyti vietoj zebrinės danijos kraujo galima paimti jų galvą ir uodegą (6 priedėlis); iš medakos VTG analizei atlikti paimamos kepenys (6 priedėlis); lytinės liaukos fiksuojamos su visu kūnu arba išpjautos, kad būtų galima atlikti histopatologinį įvertinimą (22).

BANDYMO PRIIMTINUMO KRITERIJAI

13. Taikomos šios sąlygos, kad bandymo rezultatai būtų priimtini:

— gaištamumas vandens (arba tirpiklio) kontrolinių ėminių induose veikimo laikotarpio pabaigoje neturėtų būti didesnis kaip 10 %;

— ištirpusio deguonies koncentracija visą veikimo laikotarpį turėtų būti ne mažesnė kaip 60 % oro soties vertės (OSV);

— kiekvienu veikimo laikotarpio momentu bandymo indų vandens temperatūra neturėtų skirtis daugiau kaip ± 1,5 °C ir turėtų būti bandymų rūšiai nurodytame intervale 2 °C tikslumu (2 priedėlis);

— turėtų būti įrodymų, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentracija tirpale yra išmatuotų vidutinių verčių ± 20 % intervale;

▼M7

— turėtų būti įrodymų, kad žuvys aktyviai neršia visuose kartotinių ėminių induose prieš pradedant jas veikti chemine medžiaga ir visą bandymo trukmę kontrolinių ėminių induose.

METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

14. Įprasta laboratorinė įranga ir ši speciali įranga:

a. deguonies ir pH matuokliai,

b. įranga vandens kietumui ir šarmingumui nustatyti,

c. atitinkama aparatūra temperatūrai kontroliuoti, geriau nuolatinės kontrolės aparatūra,

d. indai, pagaminti iš chemiškai inertiškos medžiagos, kurių talpa atitinka rekomenduojamą įkrovą bei žuvų tankį (žr. 2 priedėlį);

e. neršto substratas juodajai drūtagalvei rainei ir zebrinei danijai, reikiama išsami informacija pateikta 4 priedėlyje;

f. reikiamo tikslumo svarstyklės (t. y. ± 0,5 mg tikslumo).

Vanduo

15. Galima naudoti bet kokį vandenį, kuriame bandomoji rūšis gali ilgai gyventi ir augti. Jo kokybė turėtų būti pastovi visą bandymų trukmę. Vandens pH vertė turėtų būti 6,5–8,5, tačiau, atliekant konkretų bandymą, pH vertė neturėtų pakisti daugiau kaip ± 0,5 pH vieneto. Siekiant užtikrinti, kad skiedimo vanduo netinkamai nepaveiktų bandymo rezultatų (pvz., sudarydamas kompleksus su bandomąja chemine medžiaga), tam tikrais intervalais turėtų būti imami mėginiai analizei atlikti. Sunkiųjų metalų jonų (pvz., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ir Ni), pagrindinių anijonų ir katijonų (pvz., Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} ir SO_4^{2-}), pesticidų (pvz., fosforo organinių ir chloro organinių pesticidų bendrojo kiekio), bendrosios organinės anglies ir suspenduotų kietųjų dalelių analizė turėtų būti atliekama, pvz., kas tris mėnesius, jei žinoma, kad skiedimo vandens kokybė yra gana pastovi. Jei būtų įrodyta, kad vandens kokybė išlieka pastovi bent metus, analizė gali būti atliekama ne taip dažnai, o intervalai – padidinti (pvz., kas šešis mėnesius). Kai kurios skiedimui tinkamo vandens cheminės savybės pateiktos 3 priedėlyje.

Bandymų tirpalai

16. Pasirinktos koncentracijos bandymo tirpalai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Pradinį tirpalą geriau ruošti tiesiog maišant ar plakant bandomąją cheminę medžiagą skiedimo vandenyje mechaninėmis priemonėmis (pvz., maišykle ar ultragarsu). Pakankamai koncentruotam pradiniam tirpalui ruošti galima naudoti prisotinimo kolonėles (tirpumo kolonėles). Nerekomenduojama naudoti tirpiklinio nešiklio. Tačiau jei tirpiklis yra būtinas, lygiagrečiai reikėtų bandyti kontrolinį tirpiklio ėminį, kurio koncentracija atitinka ėminių su chemine medžiaga tirpiklio koncentraciją. Sunkiai bandomoms cheminėms medžiagoms tirpiklis gali būti geriausias techninis sprendimas; informacijos reikėtų ieškoti EBPO rekomendaciniame dokumente apie sunkiai apdorojamų cheminių medžiagų ir mišinių toksiškumo vandens organizmams bandymus (23). Tirpiklis bus pasirinktas pagal cheminės medžiagos ar mišinio chemines savybes. EBPO rekomendaciniame dokumente rekomenduojama ne didesnė kaip 100 µl/l koncentracija ir šios rekomendacijos reikėtų laikytis. Tačiau neseniai pateiktoje apžvalgoje (24) atkreiptas dėmesys į papildomas problemas, kai tiriant endokrininį aktyvumą naudojami tirpikliai. Todėl prireikus naudoti tirpiklį rekomenduojama kiek įmanoma mažinti jo koncentraciją, jei tai techniškai įmanoma (atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos fizines ir chemines savybes).

▼M7

17. Bus naudojama dinaminė bandymų sistema. Naudojant tokią sistemą (pvz., dozavimo siurblį, proporcingojo skiedimo sistemą, prisotinimo sistemą), pradinis bandomosios cheminės medžiagos tirpalas visą laiką dozuojamas ir skiedžiamas, kad bandymo kamerose būtų reikiamos koncentracijos verčių serijos tirpalai. Pradinių tirpalų ir skiedimo vandens srautai turėtų būti tikrinami tam tikrais laiko tarpais, pageidautina kasdien, ir per visą bandymą neturėtų skirtis daugiau kaip 10 %. Reikėtų vengti naudoti nekokybiškus plastmasinius vamzdelius ar kitas medžiagas, kurios gali turėti biologiškai veiklių cheminių medžiagų. Renkantis dinaminei bandymų sistemai tinkamą medžiagą, reikėtų atsižvelgti į galimą bandomosios cheminės medžiagos adsorbciją ant šios medžiagos.

Žuvų laikymas

18. Pasirenkamos vienos laboratorinės populiacijos ir geriau to paties neršto žuvys, kurios bent dvi savaites prieš bandymą būtų aklimatizuojamos į bandymo sąlygas panašiomis vandens kokybės ir apšvietimo sąlygomis. Svarbu, kad įkrova ir žuvų tankis (apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje) atitiktų naudojamą bandymų rūšį (žr. 2 priedėlį).

19. Po 48 h stabilizacijos laikotarpio, registruojamas gaištamumas ir taikomi tokie kriterijai:

— populiacijos gaištamumas per septynias paras yra didesnis kaip 10 % – visa partija atmetama;

— jei populiacijos gaištamumas per septynias paras 5–10 %, aklimatizuojama dar septynias paras ir, jei gaištamumas per kitas septynias paras didesnis kaip 5 %, visa partija atmetama;

— populiacijos gaištamumas per septynias paras yra mažesnis kaip 5 % – partija priimama.

20. Aklimatizacijos, parengiamuoju arba veikimo chemine medžiaga laikotarpiais žuvys neturėtų būti gydomos nuo ligų.

Parengiamasis laikotarpis ir žuvų atranka

21. Rekomenduojama parengiamojo laikotarpio trukmė – viena ar dvi savaitės, jo metu gyvūnai laikomi induose, kurie būtų panašūs į naudojamus atliekant patį bandymą. Visą laikymo laikotarpį ir veikimo chemine medžiaga tarpsniu žuvys turėtų būti maitinamos iki soties. Veikimo tarpsnis pradedamas iš laboratorijos turimų poravimuisi subrendusių gyvūnų atsargų atrenkant lytiškai dimorfiškas (pvz., turinčias aiškius antrinius lytinius požymius, kurie juodosios drūtagalvės rainės ir medakos atveju yra matomi) ir aktyviai neršiančias suaugusias žuvis. Tik dėl bendrosios orientacijos (nevertinant atskirai nuo stebimos konkrečios žuvų partijos tikrosios reprodukcinės būklės) juodosios drūtagalvės rainės turėtų būti maždaug 20 (± 2) savaičių amžiaus, darant prielaidą, kad visą savo gyvavimo laikotarpį jos augo 25 ± 2 °C temperatūroje. Japoninės medakos turėtų būti maždaug 16 (± 2) savaičių amžiaus, darant prielaidą, kad visą savo gyvavimo laikotarpį jos augo 25 ± 2 °C temperatūroje. Zebrinės danijos turėtų būti maždaug 16 (± 2) savaičių amžiaus, darant prielaidą, kad visą savo gyvavimo laikotarpį jos buvo auginamos 26 ± 2 °C temperatūroje. Parengiamuoju veikimo tarpsniu ikrų gamyba turėtų būti vertinama kasdien. Nerštą rekomenduojama stebėti visuose kartotinių ėminių induose prieš pradedant veikimo bandomąja medžiaga tarpsnį. Šioje stadijoje negalima pateikti pageidautinų kiekybinių kasdienio neršto duomenų, tačiau yra įprasta stebėti, kad kiekvienos rūšies vidutinis nerštas yra > 10 ikrų/patelei/per parą. Reikėtų naudoti atsitiktinio išdėstymo blokinę schemą, kai kartotiniai ėminiai atsitiktinai priskiriami įvairioms bandymų dozėms pagal ikrų gamybos išeigą, kad būtų užtikrintas subalansuotas kartotinių ėminių paskirstymas.

▼M7

BANDYMO SCHEMA

22. Naudojami trijų bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos verčių ėminiai, taip pat vienas (vandens) kontrolinis ėminys ir, jei reikia, vienas tirpiklio kontrolinis ėminys. Duomenys gali būti analizuojami, kad būtų nustatyti statistiškai reikšmingi chemine medžiaga apdorotų ir kontrolinių ėminių atsako skirtumai. Šie analizės duomenys suteikia informacijos apie tai, ar reikia atlikti papildomus ilgesnės trukmės cheminės medžiagos bandymus, siekiant nustatyti nepageidaujamą poveikį (t. y. išgyvenamumui, vystymuisi, augimui ir reprodukcijai), o ne tik naudoti šiuos duomenis rizikai vertinti (25).

23. 21-ą bandymų parą imami kiekvienos bandomosios medžiagos dozės (penki patinai ir penkios patelės dviejuose kartotinių ėminių induose) ir kontrolinio (-ių) ėminio (-ių) zebrinės danijos patinų ir patelių ėminiai vitelogenino kiekiui nustatyti. 21-ą bandymų parą imami kiekvienos bandomosios medžiagos dozės (trys patinai ir trys patelės keturiuose kartotinių ėminių induose) ir kontrolinio (-ių) ėminio (-ių) medakos patinų ir patelių ėminiai vitelogenino kiekiui ir antriniams lytiniams požymiams nustatyti. 21-ą parą imami kiekvienos bandomosios medžiagos dozės (du patinai ir keturios patelės keturiuose kartotinių ėminių induose) ir kontrolinio (-ių) ėminio (-ių) juodosios drūtagalvės rainės patinų ir patelių ėminiai vitelogenino kiekiui ir antriniams lytiniams požymiams nustatyti. Būtina kiekybiškai nustatyti vislumą, o lytinės liaukos fiksuojamos su visu kūnu arba išpjautos, kad, jei reikia, būtų galima atlikti histopatologinį įvertinimą.

Bandymų koncentracijos verčių parinkimas

24. Šiame bandyme didžiausia bandymo koncentracija turėtų atitikti didžiausią toleruojamą koncentraciją (DTK), nustatytą atliekant ribinį bandymą arba pagal kitus toksiškumo duomenis, arba 10 mg/l ar didžiausio tirpumo vandenyje koncentracija, jei ji mažesnė. DTK apibrėžiama kaip cheminės medžiagos didžiausia bandymo koncentracija, kuriai esant žuvų gaištamumas yra mažesnis nei 10 %. Taikant tokį metodą, daroma prielaida, kad yra empiriniai ūmaus toksiškumo ar kiti toksiškumo duomenys, pagal kuriuos galima apskaičiuoti DTK. DTK gali būti sunku tiksliai nustatyti, todėl paprastai reikia profesinio sprendimo.

25. Reikia naudoti ne mažiau kaip tris bandymų koncentracijos vertes, kurių skirtumo pastovus faktorius būtų ne didesnis kaip 10, ir skiedimo vandens kontrolinį ėminį. Rekomenduojamas faktorių intervalas yra nuo 3,2 iki 10.

PROCEDŪRA

Bandymų žuvų atranka ir svėrimas

26. Svarbu, kad žuvų masės skirtumas bandymų pradžioje būtų kuo mažesnis. Šiam bandymui atlikti rekomenduojamų įvairių žuvų rūšių tinkamo dydžio ribos pateiktos 2 priedėlyje. Bandymams naudotos visos žuvų partijos patinų ir patelių atskiro gyvūno masė bandymo pradžioje, jei įmanoma, neturėtų skirtis nuo tos pačios lyties masės aritmetinio vidurkio daugiau kaip ± 20 %. Vidutinei masei nustatyti rekomenduojama prieš bandymą pasverti žuvų populiacijos poėminį.

Veikimo sąlygos

Trukmė

27. Bandymo trukmė po parengiamojo laikotarpio – 21 para. Rekomenduojama parengiamojo laikotarpio trukmė – viena arba dvi savaitės.

Maitinimas

28. Siekiant palaikyti gerą kūno būklę, žuvis reikėtų maitinti tinkamu maistu iki soties (2 priedėlis) ir pakankamai dažnai. Reikėtų imtis priemonių išvengti mikrobų dauginimosi ir vandens drumstumo. Apskritai rekomenduojama

▼M7

paros davinį padalyti į dvi ar tris lygias dalis, kad žuvys maisto davinį gautų kelis kartus per parą, bet ne dažniau kaip kas tris valandas. Priimtinas vienas didesnis davinys – ypač savaitgaliais. Žuvų nereikėtų maitinti 12 h prieš ėminių ėmimą ar skrodimą.

29. Reikėtų patikrinti, ar žuvų pašare nėra teršalų, pvz., chloro organinių pesticidų, policiklinių aromatinių angliavandenilių (PAA) ar polichlorintųjų bifenilų (PCB). Reikėtų vengti maisto, kuriame būtų didesnis fitoestrogenų kiekis, nes taip būtų iškreiptas tyrimo atsakas į žinomą estrogenų agonistą (pvz., 17-beta estradiolį).

30. Nesuėstą maistą ir išmatas iš bandymo indų reikėtų šalinti bent du kartus per savaitę, pvz., kruopščiai valant kiekvienos talpyklos dugną siurbliu.

Šviesa ir temperatūra

31. Šviesiojo laikotarpio trukmė ir vandens temperatūra turėtų atitikti bandymo rūšį (žr. 2 priedėlį).

Analizinių nustatymų ir matavimų dažnumas

32. Prieš veikimo bandomąja medžiaga laikotarpio pradžią reikėtų įsitikinti, ar cheminės medžiagos tiekimo sistema veikia tinkamai. Reikėtų turėti visus reikiamus analizės metodus, taip pat turėti pakankamai duomenų apie cheminės medžiagos stabilumą bandymų sistemoje. Atliekant bandymą, bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertės reguliariais intervalais nustatomos taip: skiediklio ir toksinės cheminės medžiagos srautą pageidautina tikrinti kasdien, bet ne rečiau kaip du kartus per savaitę, ir visą bandymų laiką neturėtų skirtis daugiau kaip 10 %. Faktinę bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją visuose induose rekomenduojama matuoti bandymo pradžioje, o vėliau – kas savaitę.

33. Rekomenduojama rezultatus pagrįsti išmatuotomis koncentracijos vertėmis. Tačiau, jei bandomosios cheminės medžiagos koncentracija tirpale per visą bandymą buvo tinkamai užtikrinama ± 20 % tikslumu, rezultatus galima pagrįsti nominaliosiomis arba išmatuotomis vertėmis.

34. Ėminius gali tekti filtruoti (pvz., per 0,45 μm akučių filtrą) ar centrifuguoti. Jei reikia atskirti, rekomenduojama procedūra yra centrifugavimas. Tačiau, jei filtras bandomosios medžiagos neadsorbuoja, priimtinas būtų ir filtravimas.

35. Atliekant bandymą, visuose bandymo induose bent kartą per savaitę reikėtų matuoti ištirpusį deguonį, temperatūrą ir pH. Bendras kietumas ir šarmingumas kontrolinių ėminių induose ir viename inde su didžiausia koncentracija turėtų būti matuojami bent kartą per savaitę. Bent viename bandymų inde temperatūrą reikėtų kontroliuoti nuolat.

Stebėjimai

36. Tyrimo laikotarpiu arba jam pasibaigus vertinami tam tikri bendrieji (pvz., išgyvenamumo) ir pagrindiniai biologiniai atsakai (pvz., vitelogenino koncentracija). Kasdien reikia atlikti kiekybinę vislumo stebėseną. Šių vertinamųjų baigčių matavimas ir įvertinimas bei jų naudingumas aprašyti toliau.

Išgyvenamumas

37. Bandymo laikotarpiu žuvis reikėtų tirti ir jų gaištamumą registruoti kasdien, o nugaišusias žuvis reikėtų kuo greičiau pašalinti. Kontrolinių ar apdorojamų ėminių induose nugaišusių žuvų nereikėtų pakeisti kitomis. Bandymų metu nugaišusių žuvų lytis turėtų būti nustatyta atliekant makroskopinį lytinių liaukų patikrinimą.

▼M7

Elgesys ir išvaizda

38. Reikėtų atkreipti dėmesį į visas elgesio anomalijas (palyginti su kontrolinių ėminių gyvūnais); tai galėtų būti bendrojo toksiškumo požymiai, įskaitant hiperventiliaciją, nekoordinuotą plaukimą, pusiausvyros praradimą ir netipišką nejudamumą ar mitybą. Taip pat reikėtų atkreipti dėmesį į papildomas išorines anomalijas (pvz., kraujavimą, spalvos pakeitimą). Atliekant duomenų vertinimą, į tokius toksiškumo požymius reikėtų ypač atkreipti dėmesį, nes jie gali rodyti tokias koncentracijos vertes, kurioms esant biologiniai endokrininio aktyvumo žymenys nėra patikimi. Atliekant tokius elgesio stebėjimus, taip pat galima gauti naudingos kokybinės informacijos, pagal kurią ateityje būtų galima nustatyti galimus žuvų bandymų reikalavimus. Pvz., stebint juodąsias drūtagalves raines, pastebėta, kad androgenų veikiamiems normaliems patinams arba patino požymių įgijusioms patelėms pasireiškia teritorinė agresija; stebint zebrines danijas, nustatyta, kad jas veikiant estrogenais arba antiandrogenais sumažėja arba sutrinka joms būdingo su pirmais saulės spinduliais prasidedančio poravimosi ir neršto aktyvumas.

39. Dėl to, kad kai kurie išvaizdos aspektai (visų pirma, spalva) apdorojant žuvis gali greitai pasikeisti, prieš išimant žuvis iš bandymo sistemos svarbu atlikti kokybinius stebėjimus. Ligšiolinė juodosios drūtagalvės rainės stebėjimo patirtis rodo, kad kai kurios endokrininę sistemą veikiančios cheminės medžiagos iš pradžių gali sukelti šių išorės savybių pokyčius: kūno spalvos (šviesios ar tamsios), spalvų rašto (t. y. vertikalių dryžių atsiradimą) ir kūno formos (t. y. galvos ir krūtinės srities formos). Todėl žuvų fizinę išvaizdą reikia stebėti viso bandymo metu ir jo pabaigoje.

Vislumas

40. Kasdienius kiekybinius neršto duomenis reikėtų registruoti pagal kartotinius ėminius. Ikrų gamybą reikėtų registruoti kaip ikrų skaičių vienai išgyvenusiai patelei per parą pagal kartotinius ėminius. Ikrai iš bandymų kamerų pašalinami kasdien. Neršto substratus reikėtų dėti į juodosios drūtagalvės rainės ir zebrinės danijos bandymų kamerą, kad žuvys galėtų neršti normaliomis sąlygomis. 4 priedėlyje pateikta papildoma informacija apie rekomenduojamus zebrinės danijos (4A priedėlis) ir juodosios drūtagalvės rainės (4B priedėlis) neršto substratus. Nemanoma, kad neršto substratas yra būtinas medakai.

Humaniškas žuvų numarinimas

41. 21 parą, t. y. pasibaigus veikimo laikotarpiui, žuvį reikėtų numarinti atitinkamu kiekiu 100–500 mg/l trikaino (trikaino metansulfonato, metakaino, MS-222 (CAS 886-86-2)) tirpalu 300 mg/l $NaHCO_3$ (natrio hidrokarbonato, CAS 144-55-8) buferiniame tirpale, skirtu gleivinės dirginimui sumažinti; vitelogenino kiekiui nustatyti imami kraujo ar audinių ėminiai, kaip paaiškinta skirsnyje *Vitelogeninas*.

Antrinių lytinių požymių stebėjimas

42. Kai kurios endokrininę sistemą veikiančios cheminės medžiagos gali sukelti rūšims būdingų antrinių lytinių požymių (juodosios drūtagalvės rainės patino poravimosi gumburėlių, medakos patino spenelinių ataugų skaičiaus) pokyčius. Visų pirma, dėl pagal tam tikrus mechanizmus veikiančių cheminių medžiagų priešingos lyties gyvūnams gali atsirasti anomalūs antriniai lytiniai požymiai; pvz., veikiant androgenų receptorių agonistams, tokiems kaip trenbolonas, metiltestosteronas ir dihidrotestosteronas, juodosios drūtagalvės rainės patelėms gali išsivystyti aiškiai išreikšti poravimosi gumburėliai, o medakos patelėms – spenelinės ataugos (11, 20, 21). Taip pat buvo pranešimų, kad estrogenų receptorių agonistai gali sumažinti juodosios drūtagalvės

▼M7

rainės suaugusių patinų poravimosi gumburėlių skaičių ir sprando pagalvėlės dydį (26, 27). Atliekant tokius makroskopinius morfologinius stebėjimus, galima gauti naudingos kokybinės ir kiekybinės informacijos, pagal kurią ateityje būtų galima nustatyti galimus žuvų bandymų reikalavimus. Juodosios drūtagalvės rainės poravimosi gumburėlių ir medakos spenelinių ataugų skaičių ir dydį galima nustatyti tiesiogiai, atliekant bandymą, arba tikslesniu būdu – iš išsaugotų bandinių. Rekomenduojamos juodosios drūtagalvės rainės ir medakos antrinių lytinių požymių vertinimo procedūros pateiktos 5A ir 5B priedėliuose.

Vitelogeninas (VTG)

43. Kraujas paimamas iš uodegos arterijos ar venos, naudojant heparinizuotą kapiliarinį mikrohematokrito vamzdelį, arba švirkštu atliekant širdies punkciją. Atsižvelgiant į žuvies dydį, iš kiekvienos juodosios drūtagalvės rainės paprastai paimama po 5–60 µl, o iš kiekvienos zebrinės danijos – po 5–15 µl kraujo. Plazma nuo kraujo atskiriama centrifugavimu ir iki vitelogenino nustatymo analizės kartu su proteazės inhibitoriais laikoma – 80 °C temperatūroje. Arba kaip audinių šaltinis medakos VTG kiekiui nustatyti naudojamos kepenys, o zebrinės danijos atveju gali būti naudojamas galvos ir (arba) uodegos homogenatas (6 priedėlis). VTG reikėtų matuoti taikant patvirtintą homologinį IFA metodą, naudojant homologinį VTG standartą ir homologinius antikūnus. Rekomenduojama taikyti metodą, kuriuo VTG kiekį plazmoje galima aptikti ng/ml eilės (arba audiniuose – ng/mg eilės), nes tai yra foninė koncentracija chemine medžiaga neapdoroto žuvies patino organizme.

44. Vitelogenino analizės kokybės kontrolė atliekama naudojant cheminių medžiagų etalonus ir atliekant tuščiųjų ėminių bei ne mažiau kaip dviejų kartotinių ėminių analizę. Kiekvienam IFA metodui reikėtų atlikti matricos efekto (ėminio skiedimo efekto) bandymą mažiausiam ėminio skiedimo faktoriui nustatyti. Kiekvienoje VTG tyrimams naudojamoje IFA plokštelėje turėtų būti šie kokybės kontrolės ėminiai: bent šeši kalibravimo etalonai, kurie aprėptų numatomų vitelogenino koncentracijos verčių diapazoną, ir bent vienas tuščiasis nespecifinio surišimo ėminys (analizuojami du kartotiniai ėminiai). Šių tuščiųjų ėminių optinis tankis turėtų būti mažesnis nei 5 % didžiausios koncentracijos kalibravimo etalono optinio tankio. Analizuojamos bent dvi alikvotinės kiekvienos skiedimo koncentracijos ėminio (kartotiniai duobučių ėminiai). Jei kartotinių duobučių ėminių koncentracija skiriasi daugiau kaip 20 %, analizę reikėtų pakartoti.

45. Kalibravimo kreivių koreliacijos koeficientas (R^2) turėtų būti didesnis kaip 0,99. Tačiau didelės koreliacijos nepakanka tiksliai visų intervalų koncentracijos prognozei užtikrinti. Reikėtų užtikrinti ne tik pakankamai didelę kalibravimo kreivės verčių koreliaciją, bet ir pagal kalibravimo kreivę apskaičiuota kiekvieno etalono koncentracija turėtų būti 70–120 % jo nominaliosios koncentracijos vertės. Jei nominaliosios koncentracijos vertės tolsta nuo kalibravimo kreivės regresijos linijos (pvz., esant mažesnei koncentracijai), gali tekti kalibravimo kreivę padalyti į mažų ir didelių verčių intervalus arba taikyti netiesinį modelį, kad būtų galima tinkamai priderinti optinio tankio duomenis. Jei kreivė padalijama, abiejų tiesiųjų atkarpų $R^2 > 0,99$.

46. Aptikimo riba apibrėžiama kaip mažiausios koncentracijos analizės etalono koncentracija, o kiekybinio nustatymo riba – kaip mažiausios koncentracijos analizės etalono koncentracija, padauginta iš mažiausio skiedimo faktoriaus.

47. Kiekvieną dieną atliekant VTG tyrimus analizuojamas sodrintas ėminys, paruoštas naudojant tyrimų serijos pamatinį etaloną (7 priedėlis). Numatomos ir išmatuotos koncentracijos verčių santykis pateikiamas ataskaitoje kartu su kiekvienos tą dieną atliktų tyrimų grupės rezultatais.

Lytinių liaukų histopatologijos įvertinimas

48. Priežiūros institucijos gali pareikalauti atlikti lytinių liaukų histopatologijos įvertinimą, kad būtų ištirtas PHL ašies tikslinis organas, jį paveikus chemine medžiaga. Šiuo tikslu lytines liaukos fiksuojamos su visu kūnu arba išpjautos. Kai reikalaujama atlikti histopatologiją, vertinant bandomosios cheminės medžiagos endokrininį aktyvumą bus ieškoma su endokrinine sistema susijusių specifinių lytinių liaukų atsakų. Šiuos diagnostinius atsakus

▼M7

dažniausiai sudaro sėklidžių oocitų buvimas, Leidigo ląstelių hiperplazija, trynio susidarymo sulėtėjimas, padidėjusi spermatogonija ir perifolikulinė hiperplazija. Kitų lytinių liaukų pažeidimų, pvz., oocitų atrezijos, sėklidžių išsigimimo ir stadijos pasikeitimų priežastys gali būti įvairios. Rekomendaciniame dokumente apie žuvų lytinių liaukų histopatologiją nurodytos procedūros, kurios būtų taikomos atliekant lytinių liaukų preparavimą, fiksavimą, pjūvių gamybą ir histopatologinį įvertinimą (22).

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Biologinių žymenų atsako vertinimas taikant dispersinės analizės (ANOVA) metodą

49. Nustatant galimą cheminės medžiagos aktyvumą endokrininės sistemos atžvilgiu lyginami apdorotų ir kontrolinių grupių atsakai taikant dispersinės analizės (ANOVA) metodą. Jei naudojamas tirpiklio kontrolinis ėminys, reikėtų atlikti tinkamą statistinę skiedimo vandens ir tirpiklio kontrolinių ėminių skirtumo analizę atsižvelgiant į visas vertinamąsias baigtis. Rekomendacijas dėl praskiesto vandens ir tirpiklio kontrolinių ėminių duomenų apdorojimo atliekant paskesnę statistinę analizę, galima rasti EBPO dokumente (2006c) (28). Visi biologinio atsako duomenys turėtų būti analizuojami ir pateikiami atskirai pagal lytį. Jei parametriniams metodams taikyti reikiamos prielaidos nepasitvirtina, t. y. nenormalus pasiskirstymas (pvz., Shapiro-Wilk kriterijus) ar nevienalytė dispersija (Bartlett kriterijus arba Levene kriterijus), reikėtų atsižvelgti į galimybę transformuoti duomenis dispersijoms homogenizuoti prieš atliekant ANOVA arba svertinę ANOVA. Jei dozės ir atsako priklausomybė yra nemonotoniška, daugybiniam lyginimui paporiui gali būti taikomas Dunnett kriterijus (parametrinis) arba Mann-Whitney kriterijus su Bonferroni pataisa (neparametrinis). Galima taikyti kitus kriterijus (pvz., Jonckheere-Terpstra kriterijų arba Williams kriterijų), jei dozės ir atsako priklausomybė yra maždaug monotoniška. Siekiant padėti apsispręsti, kurį statistinį kriterijų geriausia taikyti, 8 priedėlyje pateikta statistinė struktūrinė diagrama. Papildomos informacijos taip pat galima gauti iš OECD dokumento *Dabartiniai ekotoksiškumo duomenų statistinės analizės metodai* (28).

Rezultatų ataskaita

50. Tyrimo duomenis turėtų sudaryti ši informacija:

Bandymus atliekanti įstaiga:

— atsakingi darbuotojai ir jų pareigos atliekant tyrimą;

— kiekviena laboratorija turėtų įrodyti savo kvalifikaciją, naudodama reprezentatyviųjų cheminių medžiagų grupę.

Bandomoji cheminė medžiaga:

— bandomosios cheminės medžiagos apibūdinimas;

— fizinė būsena ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės;

— bandymų koncentracijos verčių tirpalų paruošimo metodas ir dažnumas;

— informacija apie stabilumą ir biologinį skaidumą.

Tirpiklis:

— tirpiklio apibūdinimas (tipas, naudojama koncentracija);

— tirpiklio pasirinkimo pagrindimas (jei ne vanduo).

▼M7

Bandymų gyvūnai:

— rūšis ir veislė;

— tiekėjas ir speciali tiekėjo įranga;

— žuvų amžius bandymų pradžioje ir reprodukcinė ar neršto būklė;

— išsamūs duomenys apie gyvūnų aklimatizavimo procedūrą;

— žuvų (iš veislinių žuvų poėminio) kūno masė veikimo pradžioje.

Bandymų sąlygos

— taikyta bandymų procedūra (bandymų tipas, įkrova, įkrovos tankis ir kt.);

— pradinių tirpalų paruošimo metodas ir srautas;

— nominaliosios bandymo koncentracijos vertės, kas savaitę matuojamos bandymo tirpalų koncentracijos vertės, taikomas analizės metodas, bandymų indams gauti išmatuotų verčių vidurkiai bei standartiniai nuokrypiai ir įrodymai, kad matavimai atitinka bandomosios cheminės medžiagos koncentraciją tikrajame tirpale;

— skiedimo vandens savybės (įskaitant pH, kietumą, šarmingumą, temperatūrą, ištirpusio deguonies koncentraciją, liekamojo chloro kiekį, bendrąją organinę anglį, suspenduotų kietųjų dalelių kiekį ir visus kitus atliktus matavimus);

— bandymų indų vandens kokybė, pH, kietumas, temperatūra ir ištirpusio deguonies koncentracija;

— išsami informacija apie maitinimą (pvz., maisto (-ų) rūšis, šaltinis, duodamas kiekis, maitinimo dažnumas ir, jei yra, atitinkamų teršalų (polichlorintųjų bifenilų, policiklinių aromatinių angliavandenilių ir chloro organinių pesticidų) analizės rezultatai.

Rezultatai:

— įrodymai, kad kontroliniai ėminiai atitiko bandymo priimtinumo kriterijus;

— duomenys apie gaištamumą induose su kuria nors bandymo koncentracija ir kontroliniame inde;

— taikyti statistiniai analizės metodai, duomenų apdorojimas ir taikomų metodų pagrindimas;

— bendrųjų morfologinių stebėjimų duomenys, įskaitant apie antrinius lytinius požymius, ikrų gamybą ir VTG;

— duomenų analizių rezultatai, pageidautina – lentelių ir grafikų forma;

— neįprastų žuvų reakcijų dažnumas ir bandomosios cheminės medžiagos sukeltas matomas poveikis.

▼M7

BANDYMŲ REZULTATŲ AIŠKINIMO IR PRIĖMIMO REKOMENDACIJOS

51. Šiame skirsnyje pateikti keli aspektai, į kuriuos reikia atsižvelgti aiškinant įvairių vertinamųjų baigčių matavimo atliekant bandymą rezultatus. Rezultatus reikėtų vertinti atsargiai, jei atrodo, kad bandomoji cheminė medžiaga sukėlė akivaizdų toksiškumą arba paveikė bendrąją bandymo gyvūno būklę.

52. Nustatant bandymo koncentracijos verčių intervalą, reikėtų stengtis neviršyti didžiausios toleruojamos koncentracijos, kad duomenų aiškinimas būtų prasmingas. Svarbu naudoti bent vieną cheminės medžiagos koncentraciją, dėl kurios neatsiranda toksinio poveikio požymių. Ligos ir toksinio poveikio požymius reikėtų atidžiai vertinti ir pateikti ataskaitoje. Pvz., gali būti taip, kad VTG gamybai patelių organizme įtakos taip pat gali turėti bendrasis toksiškumas, o ne endokrininio toksinio poveikio mechanizmai (pvz., toksinis poveikis kepenims). Tačiau poveikio aiškinimas gali tapti patikimesnis naudojant kitas cheminės medžiagos dozes, kurios nėra susijusios su sisteminiu toksiškumu.

53. Yra keli aspektai, kuriuos reikia apsvarstyti prieš priimant bandymų rezultatus. Reikėtų orientuotis pagal aiškų VTG koncentracijos kontrolinėse patinų ir patelių grupėse skirtumą, kuris juodosios drūtagalvės rainės bei zebrinės danijos atveju turėtų būti maždaug trijų eilių, o medakos – maždaug vienos eilės. Verčių, kurios pasitaiko kontrolinėse ir doze veikiamose grupėse, intervalo pavyzdžiai pateikti tinkamumo patvirtinimo ataskaitose (1, 2, 3, 4). Esant dideliems VTG kiekiams kontrolinių patinų organizme, galėtų sumažėti bandymo jautris ir gebėjimas aptikti silpnus estrogenų agonistus. Esant mažiems VTG kiekiams kontrolinių patelių organizme, galėtų sumažėti bandymo jautris ir gebėjimas aptikti aromatazės inhibitorius ir estrogenų antagonistus. Šioms rekomendacijoms parengti buvo atlikti tinkamumo patvirtinimo tyrimai.

54. Kalbant apie ikrų gamybos kiekybinį įvertinimą, jų kiekis gali labai stipriai skirtis (variacijos koeficientas (VK) gali būti 20–60 %), ir tai gali mažinti bandymo gebėjimą aptikti reikšmingą ikrų gamybos sumažėjimą, jei jis yra mažesnis kaip 70 %, VK artėjant prie 50 % ar didesnės vertės. Kai VK yra mažesnių verčių (apie 20–30 %), bandymo galia (80 %) bus pakankama 40–50 % ikrų gamybos sumažėjimui aptikti. Bandymų su juodąja drūtagalve raine schema, naudojant keturis kartotinius vienos bandomosios medžiagos dozės ėminius užtikrintų didesnę galią vislumo vertinamajai baigčiai palyginti su bandymų schema naudojant tik du kartotinius ėminius.

55. Jei laboratorija anksčiau nė karto nebuvo atlikusi tokio bandymo arba buvo padaryti reikšmingi pakeitimai (pvz., pakeista žuvų veislė ar tiekėjas), patartina atlikti techninės kvalifikacijos tyrimą. Rekomenduojama naudoti chemines medžiagas, kurios veiktų keliais būdais arba turėtų poveikį kelioms bandymo vertinamosioms baigtims. Praktiniu požiūriu kiekvienai laboratorijai rekomenduojama kurti savo istorinių kontrolinių ėminių duomenų patinams ir patelėms bazę ir atlikti estrogeninio aktyvumo bandymus su teigiama kontroline chemine medžiaga (pvz., 17β-estradioliu, 100 ng/l, arba žinomu silpnu agonistu), dėl kurios padidėja VTG kiekis žuvų patinų organizme, su aromatazę slopinančia teigiama kontroline chemine medžiaga (pvz., fadrozolu arba prochlorazu, 300 µg/l), dėl kurios sumažėja VTG kiekis žuvų patelių organizme, ir su androgeninio aktyvumo teigiama kontroline chemine medžiaga (pvz., 17β-trenbolonu, 5 ng/l), dėl kurios juodosios drūtagalvės rainės ir medakos patelės įgauna antrinių lytinių požymių. Visus šiuos duomenis galima palyginti su turimais tinkamumo patvirtinimo tyrimų (1, 2, 3) duomenimis, kad būtų užtikrinta laboratorijos kvalifikacija.

56. Apskritai VTG matavimus reikėtų laikyti teigiamais, jei VTG kiekis statistiškai reikšmingai padidėja patinų organizme ($p < 0,05$) arba statistiškai reikšmingai sumažėja patelių organizme ($p < 0,05$) bent didžiausiai bandytai dozei, palyginti su kontroline grupe, ir nėra bendrojo toksiškumo požymių.

▼M7

Teigiamas rezultatas dar patvirtinamas įrodant, kad dozės ir atsako priklausomybės kreivė yra biologiškai pagrįsta. Kaip nurodyta pirmiau, VTG kiekio sumažėjimas gali būti ne vien endokrininės kilmės, tačiau teigiamas rezultatas paprastai turėtų būti aiškinamas kaip poveikio endokrininei sistemai *in vivo* įrodymas, o tokiu atveju paprastai turėtų būti imtasi veiksmų papildomai informacijai gauti.

57. Priežiūros institucijos gali pareikalauti atlikti lytinių liaukų histopatologijos įvertinimą, kad būtų nustatytas bandymo gyvūnų reprodukcinis tinkamumas ir kad būtų galima atlikti bandymų rezultatų įrodomosios duomenų galios vertinimą. Lytinių liaukų histopatologijos gali neprireikti tais atvejais, kai VTG arba antrinių lytinių požymių rezultatas yra teigiamas (pvz., VTG padidėja ar sumažėja, atsiranda antriniai lytiniai požymiai).

LITERATŪRA

(1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, Paris.

(2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, Paris.

(3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, Paris.

(4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (accessed 18/09/08).

(5) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.

(6) OECD (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, Paris.

(7) Sumpter J.P. and S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives; 103 Suppl 7:173-8 Review.

(8) Pawlowski S., *et al.* (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

(9) Andersen L., *et al* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

(10) Ankley G.T., *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences; 67(1):121-30.

▼M7

(11) Panter G.H., *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

(12) Parks L.G., *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

(13) Panter G.H., *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

(14) Fenske M., *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

(15) Holbech H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131

(16) Rose J., *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531-539.

(17) Brion F., *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

(18) Yokota H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87–98.

(19) Tatarazako N., *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.

(20) Ankley G.T., *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

(21) Seki M, *et al* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

(22) OECD (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 123, Paris.

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

(24) Hutchinson T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

(25) Hutchinson T.H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts," not „traffic lights," in risk assessment. Environmental Health Perspectives; 114 Suppl 1:106-14.

▼M7

(26) Miles-Richardson S.R., *et al*. (1999). Effects of waterborne exposure to 17β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

(27) Martinovic D., *et al*. (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

(28) OECD (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.

(29) US EPA (2008), Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, dated 30 January 2008, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 110 pp.

(30) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150, OECD, Paris.

▼M7

1 priedėlis

SANTRUMPOS IR APIBRĖŽTYS

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

VK – variacijos koeficientas.

IFA – imunofermentinė analizė.

PHL ašis – pagumburio, hipofizės ir lytinių liaukų ašis.

Įkrova – drėgnų žuvų masė vandens tūrio vienete.

DTK – didžiausia toleruojama koncentracija, atitinkanti maždaug 10 % LC_{50}.

Žuvų tankis – žuvų skaičius, tenkantis vandens tūrio vienetui.

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

VTG – vitelogeninas yra fosfolipoglikoproteininis kiaušinio trynio baltymų pirmtakas, kurio paprastai yra visų kiaušinius dedančių gyvūnų rūšių lytiškai aktyvių patelių organizme.

▼M7

2 priedėlis

BANDYMO SĄLYGOS ATLIEKANT POVEIKIO ŽUVŲ ENDOKRININEI SISTEMAI ATRANKOS TYRIMĄ

1. Rekomenduojamos rūšys	Juodoji drūtagalvė rainė (*Pimephales promelas*)	Medaka (*Oryzias latipes*)	Zebrinė danija (*Danio rerio*)
2. Bandymo tipas	Dinaminis	Dinaminis	Dinaminis
3. Vandens temperatūra	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Apšvietimo kokybė	Liuminescencinės lempos (plataus spektro)	Liuminescencinės lempos (plataus spektro)	Liuminescencinės lempos (plataus spektro)
5. Šviesos stipris	10–20 $\mu E/m^2/s$, 540–1 000 liuksų arba 50–100 ft-c (laboratorijos apšvietimas)	10–20 $\mu E/m^2/s$, 540–1 000 liuksų arba 50–100 ft-c (laboratorijos apšvietimas)	10–20 $\mu E/m^2/s$, 540–1 000 liuksų arba 50–100 ft-c (laboratorijos apšvietimas)
6. šviesiojo laikotarpio trukmė (aušros ir sutemų pasikeitimas galimas, bet nelaikomas privalomu)	16 h šviesa, 8 h tamsa	12–16 h šviesa, 12–8 h tamsa	12–16 h šviesa, 12–8 h tamsa
7. Įkrova	< 5 g vienam litrui	< 5 g vienam litrui	< 5 g vienam litrui
8. Bandymų kameros tūris	10 l (mažiausiai)	2 l (mažiausiai)	5 l (mažiausiai)
9. Bandymų tirpalo tūris	8 l (mažiausiai)	1,5 l (mažiausiai)	4 l (mažiausiai)
10. Bandymų tirpalų tūrio keitimo dažnumas	Ne mažiau kaip 6 kartus per parą	Ne mažiau kaip 5 kartus per parą	Ne mažiau kaip 5 kartus per parą
11. Bandymų organizmų amžius	žr. 21 pastraipą	žr. 21 pastraipą	žr. 21 pastraipą
12. Apytikrė suaugusios žuvies drėgno kūno masė (g)	Patelių: 1,5 ± 20 % Patinų: 2,5 ± 20 %	Patelių 0,35 ± 20 % Patinų: 0,35 ± 20 %	Patelių: 0,65 ± 20 % Patinų: 0,4 ± 20 %
13. Žuvų skaičius viename bandymų inde	6 (2 patinai ir 4 patelės)	6 (3 patinai ir 3 patelės)	10 (5 patinai ir 5 patelės)
14. Bandomosios medžiagos dozių skaičius	= 3 (ir atitinkami kontroliniai ėminiai)	= 3 (ir atitinkami kontroliniai ėminiai)	= 3 (ir atitinkami kontroliniai ėminiai)
15. Vienos dozės indų skaičius	Ne mažiau kaip 4	Ne mažiau kaip 4	Ne mažiau kaip 2
16. Viena bandymo koncentracija veikiamų žuvų skaičius	16 suaugusių patelių ir 8 suaugę patinai (po 4 pateles ir 2 patinus kiekviename kartotinio ėminio inde)	12 suaugusių patelių ir 12 suaugę patinai (po 3 pateles ir 3 patinus kiekviename kartotinio ėminio inde)	10 suaugusių patelių ir 10 suaugę patinai (po 5 pateles ir 5 patinus kiekviename kartotinio ėminio inde)
17. Maitinimo režimas	Gyvos arba šaldytos suaugusios sūriavandenės krevetės arba jų nauplijai (iki soties) du ar tris kartus per parą, pirktinis maistas arba jo derinys	Sūriavandenių krevečių nauplijai (iki soties) du ar tris kartus per parą, pirktinis maistas arba jo derinys	Sūriavandenių krevečių nauplijai (iki soties) du ar tris kartus per parą, pirktinis maistas arba jo derinys

▼M7

18. Aeravimas	Jokio, nebent ID koncentracija yra mažesnė nei 60 % oro soties vertės	Jokio, nebent ID koncentracija yra mažesnė nei 60 % oro soties vertės	Jokio, nebent ID koncentracija yra mažesnė nei 60 % oro soties vertės
19. Skiedimo vanduo	Švarus paviršinis, šulinio, atkurtasis ar vandentiekio vanduo be chloro	Švarus paviršinis, šulinio, atkurtasis ar vandentiekio vanduo be chloro	Švarus paviršinis, šulinio, atkurtasis ar vandentiekio vanduo be chloro
20. Laikotarpis prieš veikimą	rekomenduojama 7–14 parų	rekomenduojama 7–14 parų	rekomenduojama 7–14 parų
21. Veikimo chemine medžiaga trukmė	21 para	21 para	21 para
22. Biologinės vertinamosios baigtys	— išgyvenamumas — elgesys — vislumas — antriniai lytiniai požymiai — VTG — neprivaloma lytinių liaukų histopatologija	— išgyvenamumas — elgesys — vislumas — antriniai lytiniai požymiai — VTG — neprivaloma lytinių liaukų histopatologija	— išgyvenamumas — elgesys — vislumas — VTG — neprivaloma lytinių liaukų histopatologija
23. Bandymo priimtinumo kriterijai	Ištirpęs deguonis sudaro ≥ 60 % oro soties vertės; vidutinė temperatūra 25 ± 2 °C; 90 % žuvų išgyvenamumas kontrolinėse grupėse; išmatuotos bandymo koncentracijos vertės skiriasi ne daugiau kaip 20 % kiekvienos koncentracijos išmatuotos vidutinės vertės.	Ištirpęs deguonis sudaro ≥ 60 % oro soties vertės; vidutinė temperatūra 25 ± 2 °C; 90 % žuvų išgyvenamumas kontrolinėse grupėse; išmatuotos bandymo koncentracijos vertės skiriasi ne daugiau kaip 20 % kiekvienos koncentracijos išmatuotos vidutinės vertės.	Ištirpęs deguonis sudaro ≥ 60 % oro soties vertės; vidutinė temperatūra 26 ± 2 °C; 90 % žuvų išgyvenamumas kontrolinėse grupėse; išmatuotos bandymo koncentracijos vertės skiriasi ne daugiau kaip 20 % kiekvienos koncentracijos išmatuotos vidutinės vertės.

▼M7

3 priedėlis

KAI KURIOS TINKAMO SKIEDIMO VANDENS CHEMINĖS SAVYBĖS

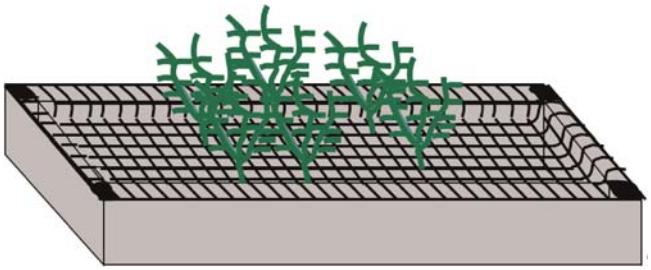
KOMPONENTAS	KONCENTRACIJA
Kietosios dalelės	< 20 mg/l
Bendroji organinė anglis	< 2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	< 1 µg/l
Liekamojo chloro kiekis	< 10 µg/l
Bendras organinių fosforo pesticidų kiekis	< 50 ng/l
Bendras organinių chloro pesticidų ir polichlorintųjų bifenilų kiekis	< 50 ng/l
Bendras organinio chloro kiekis	< 25 ng/l

▼M7

4A priedėlis

NERŠTO SUBSTRATAS ZEBRINEI DANIJAI

Neršto padėklas– vien tik iš stiklo pagamintas instrumentinis indas, pvz., 22 × 15 × 5,5 cm (ilgis × plotis × gylis), uždengtas nuimamomis nerūdijančiojo plieno grotelėmis (su 2 mm pločio akutėmis). Grotelės turėtų uždengti instrumentinio indo angą žemiau jo krašto.



Ant grotelių turėtų būti pritvirtintas neršto substratas. Jis turėtų sudaryti struktūrą, į kurią žuvys galėtų įplaukti. Pvz., jai gauti tinka dirbtiniai akvariumo augalai, pagaminti iš žalios spalvos plastiko (reikia pažymėti, kad reikėtų atsižvelgti į galimą bandomosios cheminės medžiagos adsorbciją ant plastiko). Medžiagas iš plastiko reikėtų gana ilgai mirkyti pakankamame šilto vandens tūryje, siekiant užtikrinti, kad jokios cheminės medžiagos nepatektų į bandymo vandenį. Naudojant stiklines medžiagas, reikėtų užtikrinti, kad žuvys negalėtų susižeisti ir nebūtų varžomi jų staigūs judesiai.

Siekiant užtikrinti, kad nebūtų neršiama už padėklo ribų, atstumas tarp jo ir stiklinių sienelių turėtų būti bent 3 cm. Ant padėklo padėti ikrai iškrenta pro groteles ir jų ėminius galima paimti praėjus 45–60 min nuo apšvietimo pradžios. Skaidrūs ikrai nelimpa ir juos galima lengvai suskaičiuoti naudojant šoninę šviesą. Viename inde laikant penkias pateles, mažiau kaip 20 per parą padėtų ikrų skaičius gali būti laikomas mažu, iki 100 ikrų – vidutiniu ir daugiau kaip 100 ikrų – dideliu. Neršto padėklą reikėtų išimti, ikrus surinkti ir padėklą įdėti atgal į bandymų indą kuo vėliau vakare arba labai anksti ryte. Padėklas turėtų būti grąžintas į bandymo indą ne vėliau kaip per valandą, nes kitaip neršto substratas kaip dirgiklis gali sukelti individualų poravimąsi ir nerštą neįprastu laiku. Jei atsižvelgiant į situaciją padėklą nerštui reikia įdėti vėliau, tai reikėtų padaryti ne vėliau kaip per devynias valandas nuo apšvietimo pradžios. Tokiu vėlyvu paros metu nerštas nebevyksta.

▼M7

4B priedėlis

NERŠTO SUBSTRATAS JUODAJAI DRŪTAGALVEI RAINEI

Į kiekvieną bandymų kamerą įdedama po dvi ar tris sujungtas neršto slėptuves ir padėklus, pagamintus iš plastiko, keramikos, stiklo derinio arba nerūdijančiojo plieno (pvz., 80 mm ilgio pilką pusapvalį lataką, padėtą ant 130 mm ilgio padėklo su užlenktais kraštais) (žr. paveikslą). Įrodyta, kad tinkamai pagamintos polivinilchlorido ar keraminės slėptuvės yra tinkamos naudoti kaip neršto substratas (Thorpe ir kiti, 2007).

Rekomenduojama slėptuves šlifuoti, kad pagerėtų sukibimas. Padėklą taip pat reikėtų ekranuoti, kad žuvys negalėtų pasiekti nukritusių ikrų, nebent būtų įrodyta, kad ikrai efektyviai prilimpa prie naudojamo neršto substrato.



Padėklo pagrindas skirtas visiems prie slėptuvės paviršiaus neprilipusiems, taigi į indo dugną nukritusiems ikrams (arba ikrams, padėtiems tiesiai ant plokščio plastikinio pagrindo) sulaikyti. Prieš naudojant, visi neršto substratai bent 12 h turėtų būti mirkomi skiedimo vandenyje.

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas.* Aquatic Toxicology, 81, 90–98.

▼M7

5A priedėlis

JUODOSIOS DRŪTAGALVĖS RAINĖS ANTRINIŲ LYTINIŲ POŽYMIŲ VERTINIMAS TAM TIKROMS ENDOKRININĘ SISTEMĄ VEIKIANČIOMS CHEMINĖMS MEDŽIAGOMS APTIKTI

Apžvalga

Suaugusios juodosios drūtagalvės rainės fizinės išvaizdos ypatybės, kurios gali būti svarbios atliekant endokrininę sistemą ardančių medžiagų bandymą, yra kūno spalva (t. y. šviesi ar tamsi), spalvų raštas (t. y. vertikalių dryžių buvimas arba nebuvimas), kūno forma (t. y. galvos ir krūtinės srities forma, pilvo išsipūtimas) ir rūšims būdingi antriniai lytiniai požymiai (t. y. poravimosi gumburėlių skaičius ir dydis, sprando pagalvėlės dydis ir kiaušdėtis).

Poravimosi gumburėliai yra ant aktyvaus reprodukcinio amžiaus juodosios drūtagalvės rainės patino galvos (sprando pagalvėlės) ir paprastai yra simetriškai išsidėstę iš abiejų pusių (Jensen *et al*. 2001). Kontrolinės patelės ir abiejų lyčių žuvų jaunikliai gumburėlių neturi (Jensen *et al*. 2001). Aplink patinų akis ir tarp jų šnervių gali būti iki aštuonių atskirų gumburėlių. Daugiausia (ir didžiausių) gumburėlių yra išsidėstę dviem lygiagrečiomis linijomis iš karto po šnervėmis ir virš burnos. Daugelis žuvų turi gumburėlių grupes po apatiniu žandu; arčiausiai burnos paprastai yra pavienės poros, o arčiau pilvo esančią grupę gali sudaryti iki keturių gumburėlių. Faktinis gumburėlių skaičius retai viršija 30 (18–28 intervalas; Jensen *et al*. 2001). Pagrindiniai gumburėliai (kalbant apie jų skaičių) yra atskira, palyginti apvali, struktūra, kurios aukštis apytiksliai atitinka spindulį. Dauguma aktyvaus reprodukcinio amžiaus patinų taip pat turi bent kelis gumburėlius, kurie yra padidėję ir išaugę taip, kad jų neįmanoma įžiūrėti kaip atskirų struktūrų.

Veikiant kai kurių rūšių endokrininę sistemą ardančioms cheminėms medžiagoms, priešingos lyties gyvūnams gali pasireikšti anomalūs antriniai lytiniai požymiai; pvz., dėl androgenų receptorių agonistų, tokių kaip 17α-metiltestosteronas ar 17β-trenbolonas, juodosios drūtagalvės rainės patelėms gali išsivystyti poravimosi gumburėliai (Smith 1974; Ankley *et al.* 2001; 2003), o dėl estrogenų receptorių agonistų gali sumažėti patinų poravimosi gumburėlių skaičius arba dydis (Miles-Richardson *et al*. 1999; Harries *et al*. 2000).

Toliau pateiktas juodosios drūtagalvės rainės poravimosi gumburėlių apibūdinimas, pagrįstas procedūromis, taikytomis JAV Aplinkos apsaugos agentūros Duluto (Minesota) laboratorijoje. Tam tikrus produktus ir (arba) įrangą galima pakeisti panašiomis turimomis medžiagomis.

Tyrimą geriausia atlikti naudojant padidinimo stiklą su apšvietimu arba 3× dviejų okuliarų mikroskopą su apšvietimu. Žuvis tiriama iš nugaros pusės, priešakine dalimi į priekį (galva nukreipta į tyrėjo pusę).

— Žuvis įdedama į mažą Petri lėkštelę (pvz., 100 mm skersmens), priešakine dalimi į priekį ir pilvu į apačią. Vaizdo ieškiklis nustatomas gumburėliams matyti. Žuvis atsargiai ir lėtai apverčiama nuo vieno šono ant kito, kad būtų galima nustatyti gumburėlių zonas. Gumburėliai suskaičiuojami ir įvertinami balais.

— Žuvies galvos apžiūra kartojama iš pilvo pusės Petri lėkštelėje, padedant žuvį ant nugaros priešakine dalimi į priekį.

— Kiekvienos žuvies apžiūrą reikėtų atlikti per 2 min.

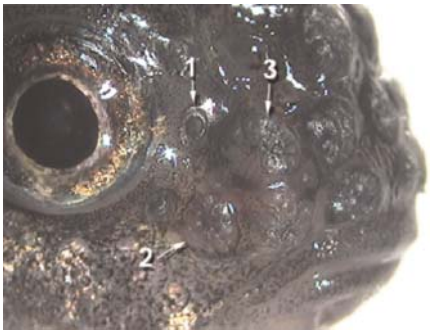
▼M7

Gumburėlių skaičiavimas ir įvertinimas balais

Nustatytos šešios specifinės juodosios drūtagalvės rainės kūno zonos, kuriose reikia įvertinti gumburėlių buvimą ir vystymąsi. Esamų gumburėlių vietai ir kiekiui sužymėti parengta lentelė (žr. šio priedėlio gale). Gumburėlių skaičius registruojamas, o jų dydis kiekviename organizme gali būti kiekybiškai įvertintas balais taip: 0 – nėra, 1 – yra, 2 – padidėjęs ir 3 – aiškiai išreikštas (1 paveikslas).

Įvertis 0 – gumburėlių nėra. Įvertis 1 – gumburėlių yra; įvertis taikomas, jei bent vieno gumburėlio aukštis yra beveik lygus jo spinduliui. Įvertis 2 – padidėję gumburėliai; nustatomi pagal tai, kad jų audiniai primena žvaigždutę, paprastai didelio apskrito pagrindo, su einančiais iš centro grioveliais ir kanalėliais. Gumburėlių viršus dažnai yra nelygus, bet kartais gali būti kiek suapvalintas. Įvertis 3 – gumburėliai aiškiai išreikšti, paprastai gana dideli ir suapvalinti, turi mažiau apibrėžtą struktūrą. Kartais šie gumburėliai susilieja ir sudaro vientisą masę vienoje arba keliose srityse (B, C ir D, kaip apibūdinta toliau). Spalva ir forma panašios į 2 balais įvertintų gumburėlių, bet kartais gali būti gana silpnai išreikštos. Naudojant šią vertinimo balais sistemą, normaliam kontroliniam patinui, kuris turi 18–20 gumburėlių, paprastai gaunama balų suma < 50 (Jensen *et al*. 2001).

1 paveikslas



Faktiškai kai kurios žuvys gali turėti daugiau gumburėlių nei lentelėje yra konkrečiai vertinamai sričiai skirtų langelių. Jei taip atsitinka, papildomi įverčiai gali būti įrašomi į langelį arba jo dešinėje ar kairėje. Todėl lentelė nebūtinai turi būti simetriška. Galima būtų sukurti papildomą būdą suporuotiems arba vertikaliai palei horizontaliąją burnos liniją sujungtiems gumburėliams žymėti, dviejų gumburėlių įverčius įrašant į vieną langelį.

Žymėjimo sritys:

A – aplink akis išsidėstę gumburėliai. Jie išdėstyti nugaros ir pilvo pusėje aplink priekinį akies kraštą. Paprastai daug jų turi subrendę kontroliniai patinai, o kontrolinės patelės jų neturi; paprastai jie yra išsidėstę poromis (po vieną prie kiekvienos akies) arba po vieną jų turi androgenų veikiamos patelės.

B-tarp šnervių esantys gumburėliai (jutiminio kanalo angos). Ant kontrolinių patinų šie gumburėliai paprastai išsidėstę poromis ir yra labiau išsivystę (du padidėję arba trys aiškiai išreikšti). Jų neturi kontrolinės patelės, tačiau kartais jie atsiranda ir vystosi androgenais veikiamoms patelėms.

C – gumburėliai, esantys iš karto priešais šnerves, lygiagrečiai su burna. Paprastai subrendusių kontrolinių patinų gumburėliai vertinami kaip padidėję arba aiškiai išreikšti. Mažiau išsivystę patinai arba androgenais veikiamos patelės jų turi arba jie yra padidėję.

▼M7

D – lygiagrečiai su burnos liniją išsidėstę gumburėliai. Kontrolinių patinų gumburėliai paprastai vertinami kaip išsivystę. Jų neturi kontrolinės patelės, tačiau turi androgenais veikiamos patelės.

E – ant apatinio žando, arti burnos išsidėstę gumburėliai, paprastai maži ir dažniausiai išsidėstę poromis. Kontroliniai ar apdoroti patinai ir apdorotos patelės turi įvairų jų kiekį.

F – gumburėliai, esantys E atžvilgiu arčiau pilvo. Paprastai būna maži ir išsidėstę poromis. Jų turi kontroliniai patinai ir androgenais veikiamos patelės.

NUORODOS

(1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.

(2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.

(3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows *(Pimephales promelas). Environ Sci Technol* 34:3003-3011.

(4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow *(Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.

(5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.

(6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows *(Pimephales promelas). Aquat Toxicol* 47:129-145.

(7) Smith RJF. 1974. Effects of 17α-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows *(Pimephales promelas). Can J Zool* 52:1031-1038.

Gumburėlių žymėjimo lentelė:

ID _____

Data _____

Bendras balas _____

Skaitinis įvertis balais

1 – yra

2 – padidėjęs

3 – aiškiai išreikštas

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

		E	**X1**	**X1**	
	F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

▼M7

5B priedėlis

MEDAKOS ANTRINIŲ LYTINIŲ POŽYMIŲ VERTINIMAS TAM TIKROMS ENDOKRININĘ SISTEMĄ VEIKIANČIOMS CHEMINĖMS MEDŽIAGOMS APTIKTI

Aprašytas spenelinių ataugų ([1]), kurios yra medakos (*Oryzias latipes*) antriniai lytiniai požymiai, matavimas.

(1) Pašalinus kepenis (6 priedėlis) skerdena įdedama į kūginį mėgintuvėlį, kuriame yra maždaug 10 ml 10 % formalino tirpalo neutraliame buferiniame tirpale (galva į viršų, uodega į apačią). Jei lytinė liauka fiksuojama kitame tirpale nei 10 % formalino tirpalas neutraliame buferiniame tirpale, preparavimo peiliu atsargiai, kad nebūtų pažeistas gonoporas ir pati lytinė liauka, skerdena perpjaunama skersai tarp priekinės analinio peleko dalies ir išangės (3 paveikslas). Žuvies kūno dalis su galva dedama į fiksavimo tirpalą lytinei liaukai užkonservuoti, o uodeginė kūno dalis – į 10 % formalino tirpalą neutraliame buferiniame tirpale, kaip aprašyta pirmiau.

(2) Žuvies kūną įdėjus į 10 % formalino tirpalą neutraliame buferiniame tirpale, priekinė analinio peleko dalis suimama pincetu ir 30 s laikoma sulenkta taip, kad analinis pelekas būtų išskleistas. Suimant pincetu analinį peleką, atsargiai, kad nebūtų pažeistos spenelinės ataugos, suimami keli priekinėje dalyje esantys peleko spinduliai.

(3) Palaikius analinį peleką išskleistą apie 30 s, žuvies kūnas įdedamas į 10 % formalino tirpalą neutraliame buferiniame tirpale ir laikomas kambario temperatūroje iki spenelinių ataugų matavimo (matuoti reikėtų po ne mažesnės kaip 24 h trukmės fiksavimo).

Matavimas

(1) Žuvies kūną fiksavus ne trumpiau kaip 24 h 10 % formalino tirpalo neutraliame buferiniame tirpale, skerdena išimama iš kūginio mėgintuvėlio ir nušluostoma filtravimo popieriumi (arba popierine servetėle).

(2) Žuvis dedama pilvu į viršų. Analinis pelekas atsargiai nukerpamas mažomis skrodimo žirklėmis (pageidautina analinį peleką nukirpti su nedideliu kiekiu pterigioforo).

(3) Nupjautas analinis pelekas suimamas už priekinės dalies ir dedamas ant stiklinės plokštelės su keliais vandens lašais. Ant analinio peleko uždedamas dengiamasis stiklelis. Imant analinį peleką pincetu, reikia žiūrėti, kad nebūtų pažeistos spenelinės ataugos.

(4) Sujungtos plokštelės, ant kurių yra spenelinių ataugų suskaičiuojamos po biologiniu (tiesioginės šviesos arba inversiniu) mikroskopu esančiu skaitikliu. Spenelinės ataugos atpažįstamos, kai ant užpakalinės sujungtos plokštelės dalies matomi nedideli ataugų dariniai. Darbalapyje užrašomas kiekvieno peleko spindulio sujungtų plokštelių, ant kurių yra spenelinių ataugų,

([1]) Spenelinės ataugos paprastai atsiranda tik pas suaugusius patinus ir būna tarp antrojo ir septintojo arba aštuntojo analinio peleko spindulio, skaičiuojant nuo analinio peleko užpakalinio galo (1 ir 2 paveikslai). Tačiau ataugos retai atsiranda ant pirmojo peleko spindulio nuo analinio peleko užpakalinio galo. Pagal šią standartinę veiklos procedūrą (SVP) galima matuoti ant pirmojo peleko spindulio esančias ataugas (pagal šią SVP peleko spinduliai skaičiuojami nuo analinio peleko užpakalinio galo).

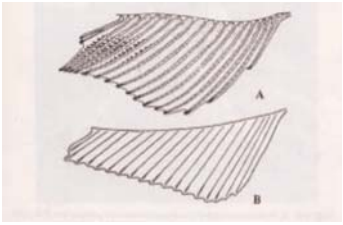
▼M7

skaičius (pvz., pirmasis peleko spindulys – 0, antrasis peleko spindulys – 10, trečiasis peleko spindulys – 12, ir t. t.) ir kiekvienai atskirai žuviai gauta šių skaičių suma įrašoma į Excel elektroninę lentelę. Prireikus daroma analinio peleko nuotrauka ir joje suskaičiuojamos sujungtos plokštelės, ant kurių yra spenelinių ataugų.

(5) Atlikus matavimus, analinis pelekas dedamas į 1) punkte aprašytą kūginį mėgintuvėlį ir jame laikomas.

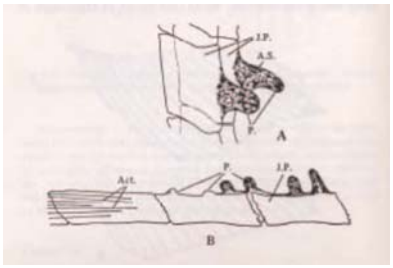
1 paveikslas

Schemoje parodyti analinio peleko formos ir dydžio skirtumai pagal lytį. A – patino, B – patelės. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



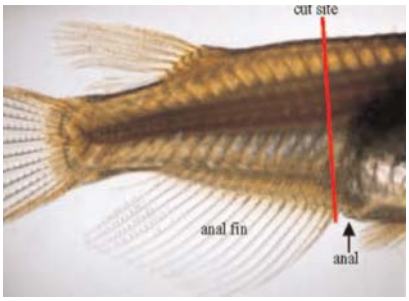
2 paveikslas

A – ataugos ant sujungtų analinio peleko spindulio plokštelių. J.P. – sujungta plokštelė; A.S. – ašinis atstumas; P – atauga. B – distalinis analinio peleko galas. Aktinotrichijos (Act.) yra ant galiuko. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



3 paveikslas

Nuotraukoje parodyta žuvies kūno pjūvio vieta, kai lytinė liauka fiksuojama kitame fiksavimo tirpale nei 10 % formalino tirpalas neutraliame buferiniame tirpale. Tokiu atveju likusi kūno dalis bus nupjauta preparavimo peiliu (raudona linija) darant pjūvį tarp priekinės analinio peleko dalies ir išangės, žuvies kūno dalis arčiau galvos bus įdėta į lytinės liaukos fiksavimo tirpalą, o uodeginė dalis – į 10 % formalino tirpalą neutraliame buferiniame tirpale.



▼M7

6 priedėlis

REKOMENDUOJAMOS ĖMINIŲ ĖMIMO VITELOGENINO ANALIZEI ATLIKTI PROCEDŪROS

Reikėtų stengtis išvengti kryžminio patinų ir patelių VTG ėminių užteršimo.

1A procedūra. Juodoji drūtagalvė rainė, kraujo paėmimas iš uodegos venos arba arterijos

Po anestezijos uodegos kotelis dalinai įpjaunamas skalpeliu ir iš uodegos venos arba arterijos heparinizuotu mikrohematokrito kapiliariniu vamzdeliu paimamas kraujas. Paėmus kraujo, plazma greitai atskiriama, esant 15 000 *g* centrifuguojant 3 min (arba esant 15 000 *g* – 10 min 4 °C temperatūroje). Jei reikia, po centrifūgavimo galima nustatyti hematokrito procentinę dalį. Plazmos frakcija paimama iš mikrohematokrito vamzdelio ir iki vitelogenino analizės laikoma centrifugavimo mėgintuvėlyje su 0,13 vienetų aprotinino (proteazės inhibitoriaus) –80 °C temperatūroje. Atsižvelgiant į juodosios drūtagalvės rainės dydį (kuris priklauso nuo lyties), iš vienos žuvies paprastai surenkama 5–60 mikrolitrų plazmos (Jensen *et al.* 2001).

1B procedūra. Juodoji drūtagalvė rainė, kraujo paėmimas iš širdies

Kraują taip pat galima paimti atliekant širdies punkciją heparinizuotu švirkštu (1 000 vienetų heparino viename ml). Kraujas supilamas į Eppendorfo mėgintuvėlius (laikomus ant ledo) ir centrifuguojamas (5 min, 7 000 *g*, kambario temperatūroje). Iki analizės plazmą reikėtų perpilti į švarius Eppendorfo mėgintuvėlius (padalijus į alikvotines dalis, jei plazmos tūris yra pakankamas) ir greitai užšaldyti – 80 °C temperatūroje (Panter *et al*., 1998).

2A procedūra. Japoninė medaka, medakos kepenų pašalinimas

Bandymų žuvies paėmimas iš bandymų kameros

(1) Bandymų žuvį iš bandymų kameros reikėtų išimti mažu tinkleliu. Imti reikia atsargiai, kad bandymų žuvis neįkristų į kitas bandymų kameras.

(2) Paprastai bandymų žuvis reikėtų imti tokia eilės tvarka: kontrolinio, tirpiklio kontrolinio (jei reikia), mažiausios koncentracijos, vidutinės koncentracijos, didžiausios koncentracijos ir teigiamo kontrolinio ėminio indas. Be to, prieš išimant pateles, iš tos pačios bandymų kameros reikėtų išimti visus patinus.

(3) Kiekvienos bandymų žuvies lytis nustatoma pagal išorinius antrinius lytinius požymius (pvz., analinio peleko formą).

(4) Bandymų žuvis dedama į nešiojamąją talpyklą ir nešama į darbo vietą kepenims pašalinti. Patikrinama, ar bandymų kameros ir nešiojamosios talpyklos etiketės yra tikslios, ir įsitikinama, kad iš bandymų kameros paimtų ir joje likusių žuvų skaičius atitinka numatytą.

(5) Jei lyties neįmanoma nustatyti pagal žuvies išorę, iš bandymų kameros išimamos visos žuvys. Tokiu atveju lytį reikėtų nustatyti lytinę liauką arba antrinius lytinius požymius tiriant stereoskopiniu mikroskopu.

Kepenų pašalinimas

(1) Bandymų žuvis pernešama mažu tinkleliu iš nešiojamosios talpyklos į anestetiko tirpalą.

▼M7

(2) Anestezuota bandymų žuvis (paprastu) pincetu pernešama ant filtravimo popieriaus (arba popierinės servetėlės). Bandymų žuvį reikia suimti pincetu už galvos šonų, kad liktų sveika uodega.

(3) Vanduo nuo bandymų žuvų paviršiaus nušluostomas filtravimo popieriumi (arba popierine servetėle).

(4) Žuvis dedama pilvu į viršų. Tada skrodimo žirklėmis daroma maža skersinė įpjova nuo pilvo pusės kaklo srities iki pilvo vidurio.

(5) Į šią mažą įpjovą įkišamos skrodimo žirklės ir pilvas prakerpamas išilgai vidurinės pilvo linijos nuo užpakalinės žiaunų dalies iki išangės priekinės pusės. Reikia žiūrėti, kad žirklės nebūtų įkištos per giliai, kad nebūtų pažeistos kepenys ir lytinė liauka.

(6) Tolesni veiksmai atliekami po stereoskopiniu mikroskopu.

(7) Žuvis dedama pilvu į viršų ant popierinės servetėlės (taip pat ją galima dėti į stiklinę Petri lėkštelę arba ant objektinio stiklelio).

(8) Pilvo ertmės sienelės praplečiamos plonu pincetu ir išimami vidaus organai. Prireikus vidaus organus taip pat galima išimti pašalinant vieną pilvo ertmės sienelės pusę.

(9) Kitu plonu pincetu atveriama sujungta kepenų ir tulžies pūslės dalis. Tada tulžies latakas suimamas pincetu ir nupjaunama tulžies pūslė. Reikia žiūrėti, kad tulžies pūslė nebūtų nutraukta.

(10) Stemplė suimama ir tokiu pat būdu atskiriamas virškinimo traktas nuo kepenų. Reikia žiūrėti, kad neištekėtų virškinimo trakto turinys. Užpakalinė virškinimo trakto dalis atskiriama nuo išangės ir traktas išimamas iš pilvo ertmės.

(11) Pašalinama riebalų masė ir kiti aplink kepenis esantys audiniai. Reikia žiūrėti, kad kepenys nebūtų pažeistos.

(12) Plonu pincetu suimama už kepenų vartų ir kepenys išimamos iš pilvo ertmės.

(13) Kepenys dedamos ant objektinio stiklelio. Prireikus nuo kepenų paviršiaus plonu pincetu pašalinami visi likę riebalai ir išoriniai audiniai (pvz., pilvo sienelė).

(14) Kepenys pasveriamos elektroninėmis analitinėmis svarstyklėmis, kaip tarą naudojant 1,5 ml mikromėgintuvėlį. Gauta vertė užrašoma darbalapyje (0,1 mg tikslumu). Identifikavimo informacija patvirtinama mikromėgintuvėlio etiketėje.

(15) Mikromėgintuvėlis su kepenimis uždaromas dangteliu. Laikoma šaldymo stove (arba stove su ledu).

(16) Po kiekvienų kepenų pašalinimo skrodimo instrumentai valomi arba pakeičiami švariais.

▼M7

(17) Pagal pirmiau aprašytą procedūrą kepenys pašalinamos iš visų nešiojamojoje talpykloje esančių žuvų.

(18) Pašalinus kepenis iš visų nešiojamojoje talpykloje esančių žuvų (t. y. visų bandymo akvariume laikomų patinų ir patelių), visi kepenų bandiniai su identifikavimo etiketėmis sudedami į mėgintuvėlių stovą ir laikomi šaldiklyje. Jei kepenys parengiamajam apdorojimui atlikti pateikiamos netrukus po jų pašalinimo, bandiniai į kitą darbo vietą pernešami šaldymo stove (arba stove su ledu).

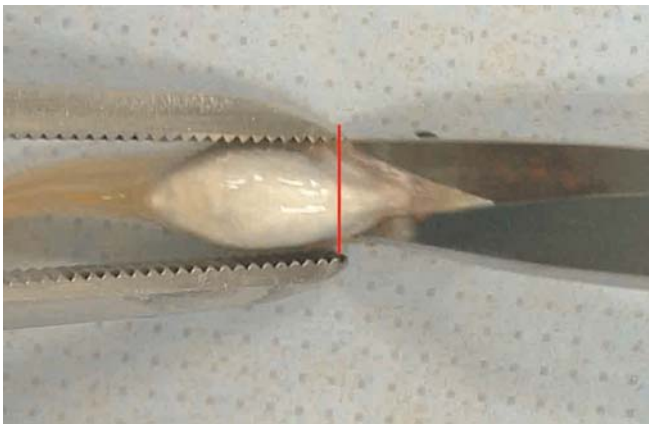
Pašalinus kepenis, žuvies skerdeną galima naudoti antriniams lytiniams požymiams įvertinti.

Bandinys

Jei iš bandymų žuvų paimtų kepenų bandinių parengiamasis apdorojimas atliekamas ne iš karto, jie laikomi ≤ – 70°C temperatūroje.

1 paveikslas

Vieta priešais krūtinės pelekus įkerpama žirklėmis.



2 paveikslas

Pilvas prakerpamas žirklėmis išilgai vidurinės pilvo linijos iki vietos, esančios maždaug 2 mm iki išangės nuo galvos pusės.



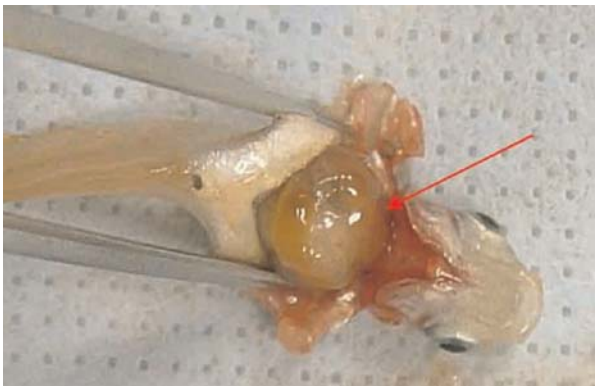
▼M7

3 paveikslas

Pilvo sienelės praskečiamos chirurginėmis žnyplėmis, kad būtų galima išimti kepenis ir kitus vidaus organus.

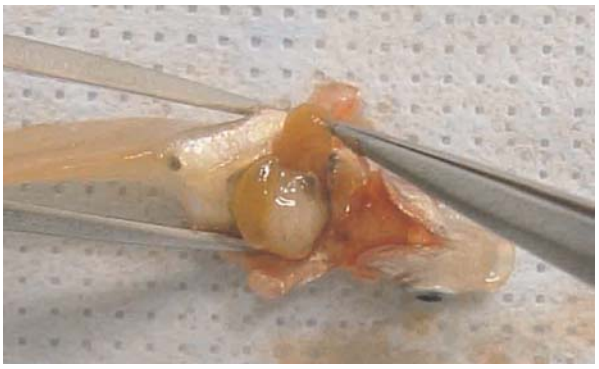
(Taip pat pilvo sieneles galima prispausti iš šonų).

Rodykle nurodytos kepenys.



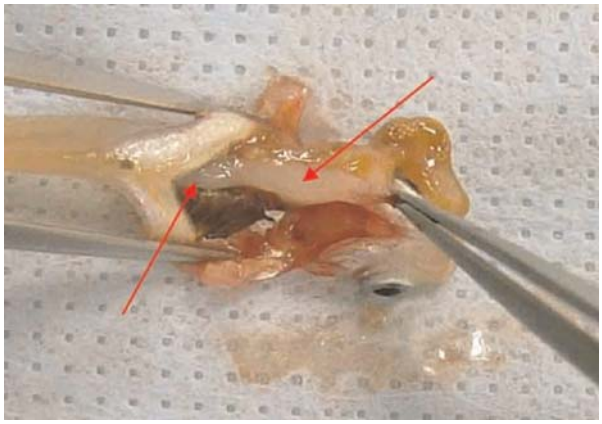
4 paveikslas

Kepenys išpjaunamos ir išimamos chirurginėmis žnyplėmis.



5 paveikslas

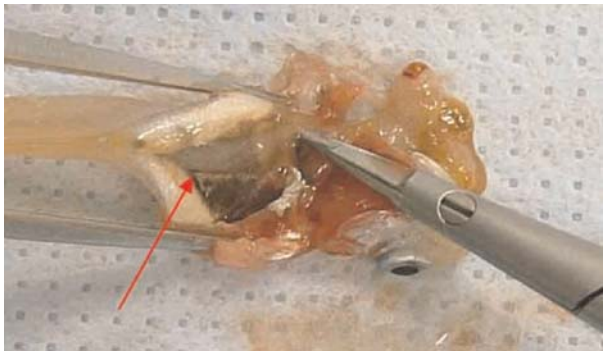
Žarnynas atsargiai atitraukiamas chirurginėmis žnyplėmis.



▼M7

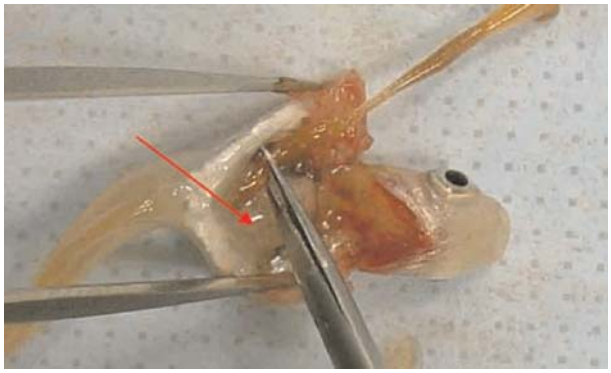
6 paveikslas

Abu žarnyno galai ir prisitvirtinusi žarnaplėvė atskiriami žirklėmis.



7 paveikslas (patelė)

Tokia pati procedūra atliekama su patele.



8 paveikslas

Procedūra baigta.



▼M7

2B procedūra. Japoninė medaka (*Oryzias latipes*), kepenų parengiamasis apdorojimas vitelogenino analizei

Iš IFA rinkinio paimamas homogenizavimo buferio buteliukas ir atvėsinamas smulkintu ledu (tirpalo temperatūra: $\leq 4^{o}C$). Jei naudojamas homogenizavimo buferis iš EnBio IFA rinkinio, tirpalas paliekamas atitirpti kambario temperatūroje, o tada butelis atvėsinamas smulkintu ledu.

Apskaičiuojamas reikiamas homogenizavimo buferinio tirpalo tūris pagal kepenų masę (vienam kepenų mg imama 50 µl homogenizavimo buferinio tirpalo). Pvz., jei kepenys sveria 4,5 mg, reikia 225 µl homogenizavimo buferinio tirpalo. Ruošiamas visoms kepenims reikiamo homogenizavimo buferinio tirpalo tūrių sąrašas.

Kepenų paruošimas parengiamajam apdorojimui

1) Prieš pat parengiamąjį apdorojimą iš šaldiklio išimamas 1,5 ml mikromėgintuvėlis su kepenimis.

2) Patinų kepenų parengiamąjį apdorojimą reikėtų atlikti pirmiau nei patelių, kad būtų išvengta užteršimo vitelogeninu. Be to, bandymų grupių žuvų parengiamasis apdorojimas turėtų būti atliekamas tokia tvarka: kontrolinio, tirpiklio kontrolinio (jei reikia), mažiausios koncentracijos, vidutinės koncentracijos, didžiausios koncentracijos ir teigiamo kontrolinio ėminio indas.

3) Bet kuriuo konkrečiu momentu iš šaldiklio turėtų būti paimta ne daugiau 1,5 ml mikromėgintuvėlių su kepenų ėminiais nei tuo metu galima centrifuguoti.

4) 1,5 ml mikromėgintuvėliai su kepenų ėminiais sudedami į stovą su ledu bandinių numerių eilės tvarka (kepenų atitirpdyti nereikia).

Parengiamojo apdorojimo procedūra

1) Homogenizavimo buferinio tirpalo įpylimas

   Pagal sąrašą patikrinamas kiekvieno konkretaus ėminio homogenizavimo buferinio tirpalo tūris ir reikiamam tūriui nustatoma mikropipetė (tūrio intervalas: 100–1 000 µl). Ant mikropipetės užmaunamas švarus antgalis.

   Paimama homogenizavimo buferinio tirpalo iš reagento butelio ir įpilama į 1,5 ml mikromėgintuvėlį su kepenimis.

   Homogenizavimo buferinio tirpalo įpilama į visus 1,5 ml mikromėgintuvėlius su kepenimis pagal pirmiau aprašytą procedūrą. Mikropipetės antgalio nauju pakeisti nereikia. Tačiau, jeigu antgalis užterštas arba įtariama, kad jis gali būti užterštas, antgalį reikėtų pakeisti.

2) Kepenų homogenizavimas

   — Prie mikromėgintuvėlio homogenizatoriaus pritvirtinamas naujas homogenizavimo grūstuvėlis.

   — Grūstuvėlis įstatomas į 1,5 ml mikromėgintuvėlį. Mikromėgintuvėlio homogenizatorius laikomas taip, kad kepenys būtų suspaustos tarp grūstuvėlio paviršiaus ir 1,5 ml mikromėgintuvėlio vidinės sienelės.

   — Mikromėgintuvėlio homogenizatorius įjungiamas 10–20 s. Atliekant šį veiksmą, mikromėgintuvėlis aušinamas smulkintu ledu.

▼M7

— Grūstuvėlis ištraukiamas iš 1,5 ml mikromėgintuvėlio, kuris paliekamas stovėti maždaug 10 s. Suspensijos būsena patikrinama apžiūrint.

— Jei suspensijoje matomi kepenų gabaliukai, (3) ir (4) veiksmai kartojami, kad būtų gautas tinkamas kepenų homogenatas.

— Prieš centrifugavimą kepenų homogenato suspensija aušinama stove su ledu.

— Ruošiant kiekvieną homogenatą, grūstuvėlį reikia pakeisti nauju.

— Pagal pirmiau aprašytą procedūrą homogenizuojamos visos kepenys, naudojant homogenizavimo buferinį tirpalą.

3) Kepenų homogenato suspensijos centrifugavimas

— Šaldomoje centrifugos kameroje nustatoma $\leq 5^{o}C$ temperatūrą.

— Į šaldomą centrifugą įdedami 1,5 ml mikromėgintuvėliai su kepenų homogenato suspensija (jei reikia, reguliuojamas balansas).

— Kepenų homogenato suspensija 10 min centrifuguojama $\leq 5^{o}C$ temperatūroje, esant 13 000 *g*. Tačiau, jei skysčiai virš nuosėdų tinkamai atsiskiria, centrifugavimo jėga ir trukmė prireikus gali būti reguliuojama.

— Po centrifugavimo tikrinama, ar skystis virš nuosėdų tinkamai atsiskyrė (paviršiuje – lipidai, per vidurį – skystis virš nuosėdų, apačioje – kepenų audiniai). Jei atsiskyrimas nepakankamas, suspensija centrifuguojama dar kartą tomis pačiomis sąlygomis.

— Visi bandiniai išimami iš šaldomos centrifugos ir stove su ledu išrikiuojami jų numerių eilės tvarka. Reikia žiūrėti, kad po centrifugavimo atskiri sluoksniai nebūtų sudrumsti.

4) Skysčio virš nuosėdų surinkimas

— Į mėgintuvėlių stovą įstatomi keturi 0,5 ml mikromėgintuvėliai skysčiui virš nuosėdų įpilti.

— Mikropipete paimama 30 µl skysčio virš nuosėdų (atsiskyrusio kaip vidurinis sluoksnis) ir supilama į vieną 0,5 ml mikromėgintuvėlį. Reikia žiūrėti, kad nepatektų lipidų nuo paviršiaus arba kepenų audinio iš apatinio sluoksnio.

— Paimama skysčio virš nuosėdų ir jis supilamas į kitus du 0,5 ml mikromėgintuvėlius, kaip aprašyta pirmiau.

— Likusi skysčio virš nuosėdų dalis susiurbiama mikropipete (jei įmanoma: 100 µl). Skystis virš nuosėdų supilamas į paskutinį 0,5 ml mikromėgintuvėlį. Reikia žiūrėti, kad nepatektų lipidų nuo paviršiaus arba kepenų audinio iš apatinio sluoksnio.

— 0,5 ml mikromėgintuvėlis uždaromas dangteliu ir skysčio virš nuosėdų tūris užrašomas etiketėje. Mikromėgintuvėliai nedelsiant statomi į stovą su ledu.

— Kiekvienam skysčio virš nuosėdų ėminiui paimti mikropipetės antgalis keičiamas nauju. Jei prie antgalio prilimpa didelis lipidų kiekis, antgalis iš karto keičiamas nauju, kad kepenų ekstraktas nebūtų užterštas riebalais.

▼M7

— Visas po centrifugavimo gautas skystis virš nuosėdų supilamas į keturis 0,5 ml mikromėgintuvėlius pagal pirmiau aprašytą procedūrą.

— Supylus skystį virš nuosėdų į 0,5 ml mikromėgintuvėlius, visi jie su identifikavimo etiketėmis sustatomi į mėgintuvėlių stovą ir nedelsiant užšaldomi šaldiklyje. Jei VTG koncentracija matuojama iš karto po parengiamojo apdorojimo, vienas 0,5 ml mikromėgintuvėlis (su 30 µl skysčio virš nuosėdų) atvėsinamas mėgintuvėlių stove ir pernešamas į darbo vietą, kurioje atliekama IFA. Tokiu atveju likę mikromėgintuvėliai sustatomi į mėgintuvėlių stovus ir užšaldomi šaldiklyje.

— Surinkus skystį virš nuosėdų, likučiai tinkamai pašalinami.

Bandinio laikymas

0,5 ml mikromėgintuvėliai su kepenų homogenato skysčiu virš nuosėdų laikomi ≤ –70 °C iki jie bus panaudoti atliekant IFA.

3A procedūra Zebrinė danija, kraujo paėmimas iš uodegos venos arba arterijos

Iš karto po anestezijos uodegos kotelis skersai įpjaunamas ir iš uodegos venos arba arterijos heparinizuotu mikrohematokrito kapiliariniu vamzdeliu paimamas kraujas. Imama 5–15 mikrolitrų kraujo, atsižvelgiant į žuvies dydį. Toks pat aprotinino buferinio tirpalo (6 mikrogramai/ml fosfatinio buferinio druskos tirpalo) tūris įtraukiamas į mikrokapiliarinį vamzdelį ir plazma nuo kraujo atskiriama centrifuguojant (5 min esant 600 *g*). Plazma surenkama į mėgintuvėlius ir iki vitelogenino ar kitų tiriamų baltymų analizės laikoma –20 °C temperatūroje.

3B procedūra. Zebrinė danija, kraujo paėmimas atliekant širdies punkciją

Siekiant išvengti kraujo koaguliacijos ir baltymų irimo, ėminiai imami į fosfatinį buferinį druskos tirpalą (PBS), kuriame yra heparino (1 000 vienetų/ml) ir proteazės inhibitoriaus aprotinino (2 TIU/ml). Buferiniam tirpalui paruošti kaip sudedamąsias dalis rekomenduojama naudoti hepariną, amonio druską ir liofilizuotą aprotininą. Kraujo ėminiui paimti rekomenduojama naudoti švirkštą (1 ml) su fiksuota plona adata (pvz., Braun Omnikan-F). Švirkštą reikia iš anksto pripildyti buferinio tirpalo (maždaug 100 mikrolitrų), kad iš kiekvienos žuvies būtų visiškai išplautas nedidelis kraujo tūris. Kraujo ėminiai paimami atliekant širdies punkciją. Iš pradžių žuvį reikėtų anestezuoti MS-222 (100 mg/l). Tinkamai pritaikęs anesteziją, tyrėjas gali atskirti zebrinės danijos širdies plakimą. Atliekant širdies punkciją, švirkšto stūmoklis nestipriai įtempiamas. Paimamas kraujo tūris yra 20–40 mikrolitrų. Atlikus širdies punkciją, kraujo ir buferinio tirpalo mišinį reikėtų supilti į mėgintuvėlį. Plazma nuo kraujo atskiriama centrifuguojant (20 min, 5000 *g*) ir iki analizės turėtų būti laikoma – 80 °C temperatūroje.

3C procedūra. Standartinė veiklos procedūra (SVP). Zebrinė danija, galvos ir uodegos homogenizavimas

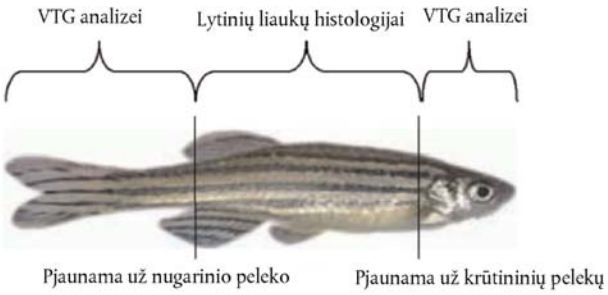
1. Žuvys anestezuojamos ir numarinamos pagal bandymo aprašymą.

2. Žuvies galva ir uodega nupjaunamos taip, kaip parodyta 1 paveiksle.

Svarbu. *Po kiekvienos atskiros žuvies preparavimo visi skrodimo instrumentai ir preparavimo stalas turėtų būti tinkamai išplauti ir išvalyti (pvz., 96 % etanoliu), kad būtų išvengta neindukuotų patinų užteršimo patelių arba indukuotų patinų vitelogeninu.*

▼M7

1 paveikslas



3. Bendra kiekvienos žuvies galvos ir uodegos masė, matuojama mg tikslumu.

4. Pasvėrus kūno dalys įdedamos į atitinkamus mėgintuvėlius (pvz., 1,5 ml Eppendorfo mėgintuvėlius) ir iki homogenizavimo užšaldomos – 80 °C temperatūroje arba tiesiogiai homogenizuojamos ant ledo dviem plastikinėmis piestelėmis. (Kiti metodai gali būti taikomi, jeigu tai atliekama ant ledo ir gaunama vienalytė masė). Svarbu. *Mėgintuvėliai turėtų būti tinkamai sunumeruoti, kad žuvies galvą ir uodegą būtų galima susieti su atitinkama jų kūno dalimi, naudojama lytinių liaukų histologinei analizei atlikti.*

5. Gavus vienalytę masę, įpilama ledo temperatūros **homogenizavimo buferinio tirpalo** ([1]), kurio masė turi būti keturis kartus didesnė nei audinių. Toliau maišoma piestelėmis, kad būtų gautas vienalytis mišinys. Svarbi pastaba. Kiekvienai žuviai naudojamos naujos piestelės.

6. Iki centrifugavimo 30 min **4 °C** temperatūroje esant 50 000 *g* ėminiai laikomi ant ledo.

7. Naudojama pipetė 20 µl skysčio virš nuosėdų įlašinti **bent į du** mėgintuvėlius, panardinant jos galiuką žemiau paviršinio riebalų sluoksnio ir atsargiai įsiurbiant skysčio virš nuosėdų be riebalų ar audinių dalelių.

8. Iki naudojimo mėgintuvėliai laikomi –80 °C.

([1]) Homogenizavimo buferinis tirpalas:
— (50 mmol/l Tris-HCl, pH 7,4; 1 % proteazės inhibitoriaus mišinio (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl proteazės inhibitoriaus mišinio.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), pvz., *Bie & Berntsen* gamybos, Danija.
— Proteazės inhibitoriaus mišinys: *Sigma* gamybos (žinduolių audiniams). Produkto numeris P 8340.
PASTABA. Homogenizavimo buferis turėtų būti naudojamas gamybos dieną. Naudojant dedamas ant ledo.

▼M7

7 priedėlis

VITELOGENINU SODRINTI ĖMINIAI IR TYRIMŲ SERIJOS PAMATINIS ETALONAS

Kiekvieną dieną atliekant vitelogenino tyrimus analizuojamas sodrintas ėminys, paruoštas naudojant tyrimų serijos pamatinį etaloną. Pamatiniam tyrimų serijos etalonui paruošti naudojamas vitelogeninas imamas iš kitos partijos nei ta, kuri naudojama atliekamo tyrimo kalibravimo etalonams paruošti.

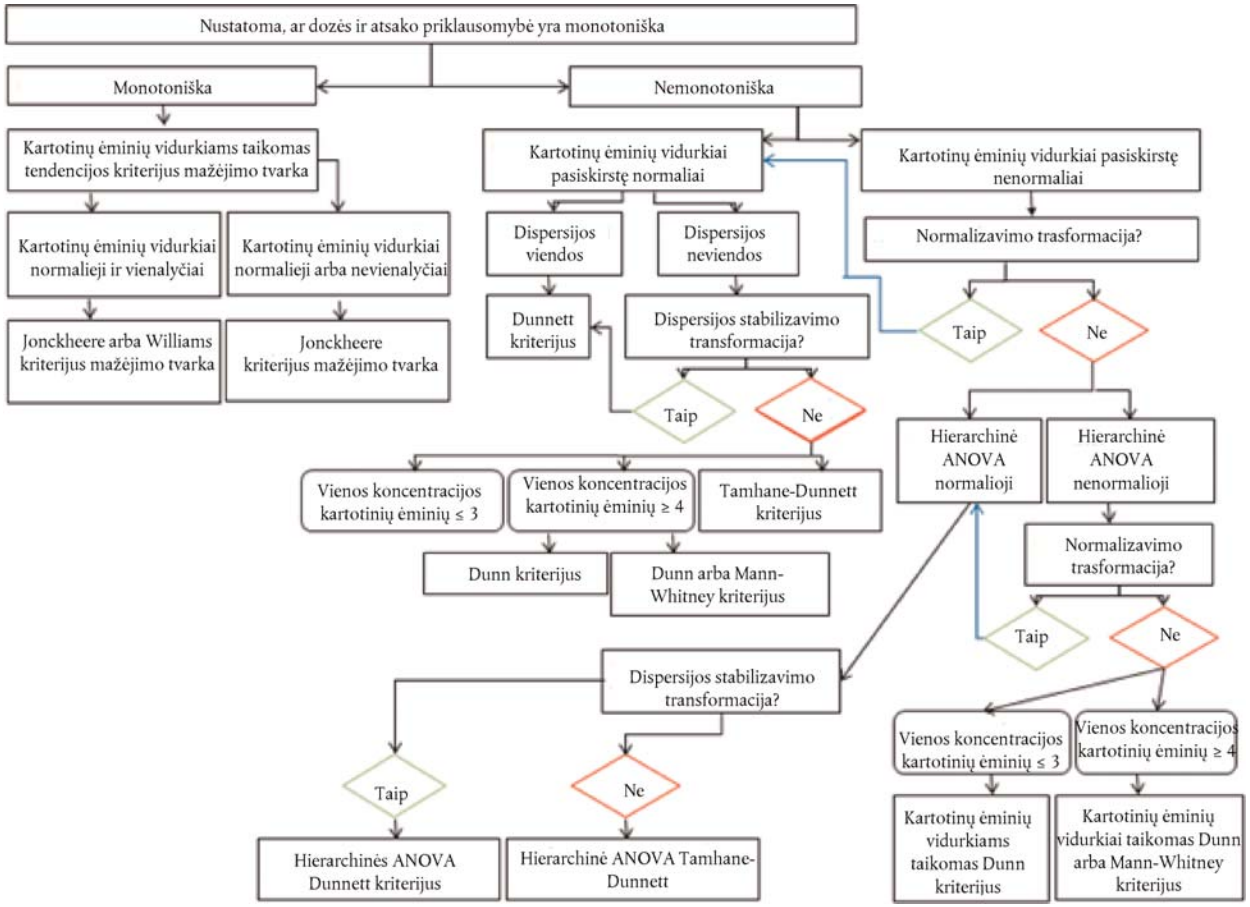
Sodrintas ėminys ruošiamas į kontrolinio patino plazmą pridedant žinomą tyrimų serijos etalono kiekį. Ėminys sodrinamas turint tikslą gauti vitelogenino koncentraciją, kuri būtų 10–100 kartų didesnę nei numatoma kontrolinio patino vitelogenino koncentracija. Sodrinamą kontrolinio patino plazmos ėminį galima paimti iš vienos žuvies arba jis gali būti kelių žuvų sudėtinis ėminys.

Nesodrintas kontrolinio patino plazmos poėminis analizuojamas bent dviejose kartotinėse duobutėse. Sodrintas ėminys taip pat analizuojamas bent dviejose kartotinėse duobutėse. Numatomai koncentracijai apskaičiuoti vidutinis dviejų kontrolinių patinų plazmos nesodrintų ėminių vitelogenino kiekis įdedamas į apskaičiuotą vitelogenino kiekį, įdėtą į sodrintus ėminius. Šios numatomos ir išmatuotos koncentracijos verčių santykis pateikiamas ataskaitoje kartu su kiekvienos tą dieną atliktų tyrimų serijos rezultatais.

▼M7

8 priedėlis

SPRENDIMUI PRIIMTI SKIRTA STATISTINĖS ANALIZĖS STRUKTŪRINĖ DIAGRAMA



▼M7

C.49. ŪMAUS TOKSIŠKUMO ŽUVŲ EMBRIONAMS (FET) BANDYMAS

ĮVADAS

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymo gaires (TG) 236 (2013). Jame aprašytas ūmaus toksiškumo žuvų embrionams (angl. *Fish Embryo Acute Toxicity*, FET) bandymas su zebrine danija (*Danio rerio*). Šio bandymo tikslas – nustatyti cheminių medžiagų toksiškumą žuvims embriono stadijoje. FET bandymas yra pagrįstas tyrimais ir tinkamumo patvirtinimo darbų naudojant zebrinę daniją rezultatais (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14). Taikant FET bandymą, buvo sėkmingai bandomos skirtingais būdais veikiančios įvairių grupių cheminės medžiagos, kurios skiriasi tirpumu, lakumu ir hidrofobiškumu (apžvalga 15 ir 16).

2. Šiame bandymų metode vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMO PRINCIPAS

3. Ką tik apvaisinti zebrinės danijos ikrai 96 h veikiami bandomąja chemine medžiaga. Kas 24 h registruojama iki keturių apikalinių stebėjimo požymių kaip žūstamumo rodiklių (6): i) apvaisinti ikrai koaguliuoja, ii) nesusidaro somitai, iii) uodegos pumpuras ne visiškai atsiskiria nuo trynio maišelio ir iv) neplaka širdis. Pasibaigus veikimo laikotarpiui, ūmus toksiškumas nustatomas pagal kurio nors iš keturių užregistruotų apikalinių stebėjimo požymių teigiamą rezultatą ir apskaičiuojama LC_{50}.

PRADINIAI ASPEKTAI

4. Naudingą informaciją apie cheminei medžiagai būdingas savybes sudaro struktūrinė formulė, molekulinė masė, grynumas, stabilumas vandenyje ir veikiant šviesai, pK_a ir K_{ow}, tirpumas vandenyje, garų slėgis ir lengvo biologinio skaidumo bandymų rezultatai (C.4 (17) ar C.29 bandymų metodas (18)). Tirpumas ir garų slėgis gali būti naudojami Henrio dėsnio konstantai apskaičiuoti, kuri rodytų, ar dėl bandomosios cheminės medžiagos garavimo gali būti nuostolių. Reikėtų turėti patikimą metodą cheminei medžiagai kiekybiškai nustatyti bandymo tirpaluose žinomu tikslumu ir aptikimo riba, kurie nurodomi ataskaitoje.

5. Jei šiuo metodu bandomas mišinys, turėtų būti kuo išsamiau apibūdinta jo sudėtis, pvz., nurodant jo sudedamųjų dalių cheminį pavadinimą, kiekybinį paplitimą ir cheminei medžiagai būdingas savybes (žr. 4 pastraipą). Prieš taikant bandymų metodą mišinio reglamentavimo bandymams, reikėtų atsižvelgti į tai, ar galima gauti reglamentavimo tikslui skirtus priimtinus rezultatus.

6. Kalbant apie chemines medžiagas, kurios gali būti aktyvintos per metabolizmą, yra įrodymų, kad zebrinės danijos embrionai turi metabolinio pajėgumo (19)(20)(21)(22). Tačiau embriono žuvų metabolinis pajėgumas ne visada yra panašus į mailiaus arba suaugusių žuvų pajėgumą. Pvz., alilo alkoholis, kuris virsta toksiniu metabolitu (9), nebuvo aptiktas taikant FET. Todėl, jei yra kokių nors požymių, kad metabolitai ar kiti svarbūs virsmo produktai gali būti labiau toksiški nei pirminis junginys, rekomenduojama atlikti bandymą ir su šiais metabolitais ar virsmo produktais bei šiuos rezultatus panaudoti darant išvadą dėl bandomosios cheminės medžiagos toksiškumo arba atlikti kitą bandymą, kuriame būtų atsižvelgta į metabolizmą.

7. Jei cheminių medžiagų molekulinė masė $\geq$ 3 kDa, jų molekulinė struktūra yra labai didelio tūrio ir jei cheminės medžiagos sukelia uždelstą išsiritimą, dėl kurio galėtų būti sutrikdytas arba sumažintas poveikis po išsiritimo, nesitikima, kad embrionai būtų jautrūs cheminei medžiagai dėl jos riboto biologinio įsisavinamumo, todėl galbūt labiau tiktų kiti toksiškumo bandymai.

▼M7

BANDYMO TINKAMUMAS

8. Taikomi šie kriterijai, kad bandymo rezultatai būtų tinkami:

a) bandytos partijos surinktų ikrų bendras apvaisinimo laipsnis turėtų būti ≥ 70 %;

b) bandymo kamerų vandens temperatūra bet kuriuo momentu turėtų būti 26 ± 1 °C;

c) pasibaigus 96 h veikimui, neigiamo (skiedimo vandens) kontrolinio ėminio ir, jei reikia, tirpiklio kontrolinio ėminio vibendras embrionų išgyvenamumas turėtų būti ≥ 90 %;

d) pasibaigus 96 h veikimui, mažiausias žūstamumas, gautas teigiamam kontroliniam ėminiui (pvz., 4,0 mg/l 3,4-dichloranilino zebrinei danijai), yra 30 %;

e) pasibaigus 96 h veikimui, išsiritimo laipsnis, gautas neigiamam kontroliniam ėminiui (ir, jei reikia, tirpiklio kontroliniam ėminiui), turėtų būti ≥ 80 %;

f) pasibaigus 96 h veikimui, ištirpusio deguonies koncentracija neigiamo kontrolinio ėminio ir didžiausios bandymo koncentracijos tirpale turėtų būti ≥ 80 % soties.

METODO APRAŠYMAS

9. Rekomenduojamų priežiūros ir bandymo sąlygų apžvalga pateikta 2 priedėlyje.

Aparatūra

10. Reikalinga ši aparatūra:

a) akvariumai, pagaminti iš chemiškai inertinės medžiagos (pvz., stiklo) ir tinkamo tūrio, atsižvelgiant į rekomenduotą įkrovą (žr. *Veislinių žuvų priežiūra*, 14 pastraipa);

b) inversinis arba dviejų okuliarų mikroskopas, kurio didinimas būtų ne mažesnis kaip 80 kartų. Jei stebėjimams registruoti skirtoje patalpoje neįmanoma užtikrinti 26 ± 1 °C temperatūros, būtinas temperatūros valdomas skersinės pastūmos stalas arba temperatūros pastovumo užtikrinimo metodai;

c) bandymo kameros; pvz., maždaug 20 mm gylio standartinės 24 duobučių plokštelės (žr. *Bandymo kameros*, 11 pastraipa);

d) pvz., lipnioji plėvelė 24 duobučių plokštelėms uždengti;

e) inkubatorius arba valdomos temperatūros patalpa su oro kondicionavimu, kad duobutėse (ar bandymo kamerose) būtų galima užtikrinti 26 ± 1 °C temperatūrą;

f) pH-metras;

g) deguonies matuoklis

h) įranga vandens kietumui ir laidžiui nustatyti,

i) ikrų gaudyklė: instrumentiniai padėklai iš stiklo, nerūdijančiojo plieno ar kitos inertinės medžiagos; vielinės grotelės (akučių matmuo 2 ± 0,5 mm) iš nerūdijančiojo plieno ar kitos inertinės medžiagos išleistiems ikrams apsaugoti; neršto substratas (pvz., dirbtiniai akvariumo augalai iš inertinės medžiagos) (C.48 bandymų metodo 4a priedėlis (23));

j) platėjančios angos pipetės ikrams surinkti;

▼M7

k) stikliniai indai skirtingos bandymo koncentracijos tirpalams ir skiedimo vandeniui paruošti (laboratorinės stiklinės, matavimo kolbos, graduoti cilindrai ir graduotos pipetės) arba zebrinės danijos ikrams rinkti (pvz., laboratorinės stiklinės, kristalizavimo lėkštelės);

l) jei bandymui atlikti naudojamos alternatyvios veikimo sistemos, pvz., dinaminės (24) arba pasyvaus dozavimo sistemos (25), reikia turėti atitinkamus įrenginius ir įrangą.

Bandymo kameros

11. Reikėtų naudoti stiklo arba polistireno bandymo kameras (pvz., 24 duobučių plokšteles su 2,5–5 ml pripildymo talpos duobutėmis). Jei galima įtarti adsorbciją ant polistireno (pvz., nepolinių, plokščios molekulės cheminių medžiagų, kurių didelis K_{OW}), reikėtų naudoti inertinę medžiagą (stiklą), kad būtų mažesni nuostoliai dėl adsorbcijos (26). Bandymo kameros turėtų būti atsitiktinai išdėstytos inkubatoriuje.

Vanduo ir bandymo sąlygos

12. Gyvūnams laikyti skirtą vandenį rekomenduojama skiesti, kad būtų pasiektas tipinis įvairių paviršinių vandenų kietumas. Skiedimo vanduo turėtų būti ruošiamas iš atkurtojo vandens (27). Gautas kietumo laipsnis turėtų atitikti 100–300 mg/l $CaCO_3$, kad į nuosėdas neiškristų per didelis kalcio karbonato kiekis. Galima naudoti kitokį gerai apibūdintą paviršinį arba šulinių vandenį. Atkurtąjį vandenį galima paversti mažo kietumo gyvūnams laikyti skirtu vandeniu skiedžiant jį dejonizuotu vandeniu ne didesniu kaip 1:5 santykiu iki minimalaus kietumo 30–35 mg/l $CaCO_3$. Prieš dedant bandomąją cheminę medžiagą, vanduo yra aeruojamas, kad būtų pasiekta deguonies soties koncentracija. Visą bandymo laiką duobutėse reikėtų užtikrinti 26 ± 1 °C temperatūrą. pH turėtų būti 6,5–8,5 intervale ir bandymo metu nesiskirti daugiau kaip 1,5 vieneto šio intervalo ribose. Jei nesitikima, kad pH galėtų likti šiame intervale, prieš pradedant bandymą, pH reikėtų reguliuoti. pH reikėtų reguliuoti taip, kad reikšmingai nepasikeistų pradinio tirpalo koncentracija ir kad nepradėtų vykti cheminė reakcija arba nesusidarytų bandomosios cheminės medžiagos nuosėdos. Tirpalams su bandomąja chemine medžiaga pH koreguoti rekomenduojamas vandenilio chloridas (HCl) ir natrio hidroksidas (NaOH).

Bandymo tirpalai

13. Pasirinktų koncentracijos verčių bandymo tirpalai paprastai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Pradinius tirpalus geriau ruošti bandomąją medžiagą tiesiog maišant ar purtant skiedimo vandenyje mechaninėmis priemonėmis (pvz., maišykle ar ultragarsu). Jei bandomąją cheminę medžiagą sunku ištirpinti vandenyje, reikėtų taikyti procedūras, aprašytas EBPO rekomendaciniame dokumente Nr. 23 dėl sunkiai apdorojamų cheminių medžiagų ir mišinių (28). Reikėtų vengti naudoti tirpiklius, bet kartais jie gali būti būtini, kad būtų galima gauti tinkamos koncentracijos pradinį tirpalą. Jei naudojamas tirpiklis, jo galutinė koncentracija neturėtų būti didesnė kaip 100 µl/l ir ji turėtų būti vienoda visuose bandymo induose. Jei naudojamas tirpiklis, reikia turėti papildomą tirpiklio kontrolinį ėminį.

Veislinių žuvų priežiūra

14. Ikrams neršti naudojama laukinio tipo veislinė zebrinės danijos populiacija, kuri nebūtų veikiama chemine medžiaga ir kurios apvaisinimo laipsnis būtų tinkamai patvirtintas dokumentais. Žuvys turėtų būti be makroskopinių infekcijos ir ligų simptomų, ir du mėnesius iki neršto neturėtų būti gydomos vaistais (dėl ūmaus susirgimo ar profilaktiškai). Neršiančios žuvys laikomos

▼M7

akvariumuose su rekomenduojama įkrova 1 l vandens vienai žuviai ir pastovia 12–16 h šviesiojo laikotarpio trukme (29)(30)(31)(32)(33). Reikėtų nustatyti optimalų filtravimo srautą; reikėtų vengti per didelio filtravimo srauto, kuris sukeltų stiprų vandens burbuliavimą. Maitinimo sąlygos nurodytos 2 priedėlyje. Reikėtų vengti duoti per daug maisto, o vandens kokybė ir akvariumų švara turėtų būti reguliariai stebima ir grąžinta į pradinę būseną, jei reikia.

Kvalifikacijos tikrinimas

15. Pageidautina ne rečiau kaip du kartus per metus bandyti 3,4-dichloraniliną kaip etaloninę cheminę medžiagą (naudotą atliekant tinkamumo patvirtinimo tyrimus (1)(2)), ją bandant visame koncentracijos ir atsako priklausomybės intervale, kad būtų galima patikrinti naudojamos žuvų veislės jautrį. Kiekviena laboratorija, kuri pradėtų taikyti šį bandymų metodą, turėtų naudoti kvalifikacijai tikrinti skirtą cheminę medžiagą. Laboratorija gali naudoti šią cheminę medžiagą, norėdama įrodyti savo techninę kompetenciją atlikti bandymą, prieš pateikdama duomenis reglamentavimo tikslais.

Ikrų gamyba

16. Zebrinės danijos ikrus galima gauti naudojant nerštо grupes (atskirose nerštо talpyklose) arba atliekant masinį nerštą (laikymo talpyklose). Jei naudojamos nerštо grupės, veisimo grupės patinai ir patelės (pvz., santykiu 2:1) dieną prieš bandymą dedami į nerštо talpyklas, likus kelioms valandoms iki sutemų. Kadangi zebrinės danijos nerštо grupių nerštas kartais gali nepavykti, rekomenduojama lygiagrečiai naudoti mažiausiai tris nerštо talpyklas. Siekiant išvengti genetinės sisteminės paklaidos, renkami ne mažiau kaip trijų veisimo grupių ikrai, kurie sumaišomi ir atsitiktinai pasirenkami.

17. Dieną prieš bandymą prieš sutemstant arba bandymo dieną prieš auštant į nerštо talpyklas arba laikymo talpyklas dedamos ikrų gaudyklės ikrams surinkti. Ikrų gaudyklės uždengiamos reikiamo akučių dydžio (maždaug 2 ± 0,5 mm) vielinėmis grotelėmis iš inertinės medžiagos, kad suaugusios zebrinės danijos negalėtų suėsti ikrų. Jei manoma, kad būtinas nerštо dirgiklis, gali būti pritvirtinti dirbtiniai augalai, pagaminti iš inertinės medžiagos (pvz., plastiko ar stiklo) (3)(4)(5)(23)(35). Reikėtų naudoti sendintas plastines medžiagas, iš kurių neišsiplauna (pvz., ftalatai). Poravimasis, nerštas ir apvaisinimas įvyksta per 30 min po to, kai atsiranda šviesa ir ikrų gaudyklės su surinktais ikrais gali būti atsargiai išimtos. Iš ikrų gaudyklių surinktus ikrus rekomenduojama praplauti atkurtuoju vandeniu.

Ikrų atskyrimas

18. 26 °C temperatūroje maždaug po 15 min įvysta apvaisintų ikrų pirmasis dalijimasis ir vėlesnis sinchroninis dalijimasis, susidarant 4, 8, 16 ir 32 ląstelėms blastomerams (žr. 3 priedėlį) (35). Šiose stadijose apvaisinti ikrai gali būti aiškiai identifikuoti pagal blastulės išsivystymą.

PROCEDŪRA

Veikimo sąlygos

19. Chemine medžiaga veikiama dvidešimt embrionų vienai koncentracijai (vienas embrionas duobutei). Veikiama turi būti taip, kad visą bandymo trukmę cheminės medžiagos koncentracija būtų lygi nominaliajai koncentracijai ± 20 %. Jei tai neįmanoma su statine sistema, reikėtų taikyti reguliuojamą pusiau statinio atnaujinimo intervalą (pvz., atnaujinimą kas 24 h). Tokiais atvejais reikėtų tikrinti bent didžiausią ir mažiausią veikimo koncentraciją kiekvieno veikimo intervalo pradžioje ir pabaigoje (žr. 36 pastraipą). Jei neįmanoma užtikrinti veikimo koncentracijos, kuri būtų lygi nominaliajai

▼M7

koncentracijai ± 20 %, visos koncentracijos vertės turi būti tikrinamos kiekvieno veikimo intervalo pradžioje ir pabaigoje (žr. 36 pastraipą). Atnaujinimo metu reikėtų žiūrėti, kad embrionai būtų apsemti nedideliu senųjų bandymo tirpalų kiekiu, siekiant išvengti jų džiuvimo. Bandymo schema turėtų būti pritaikyta atitikti specifinių cheminių medžiagų bandymų reikalavimams (pvz,. dinaminė (24) ar pasyvaus dozavimo sistemos (25) – lengvai skaidomoms arba stipriai adsorbuojamoms cheminėms medžiagoms (29), arba kitokios – lakiosioms cheminėms medžiagoms (36)(37)). Visais atvejais reikėtų imtis priemonių embrionų stresui sumažinti. Prieš bandymo pradžią bandymo kameras reikėtų kondicionuoti bandymo tirpalais ne trumpiau kaip 24 h. Bandymo sąlygos apibendrintos 2 priedėlyje.

Bandymo koncentracijos vertės

20. Paprastai reikia naudoti ne mažiau kaip penkias bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos vertes, kurių pastovus skirtumo faktorius būtų ne didesnis kaip 2,2. Reikėtų pagrįsti mažesnio nei penkių koncentracijos verčių skaičiaus naudojimą. Pageidautina, kad esant didžiausiai bandymo koncentracijai būtų 100 % žūstamumas, o mažiausiai bandymo koncentracijai – nebūtų stebimo poveikio, kaip apibrėžta 28 pastraipoje. Reikiamą koncentracijos intervalą padeda nustatyti intervalo nustatymo bandymas, atliekamas prieš galutinį bandymą. Intervalo nustatymo bandymas paprastai atliekamas naudojant dešimt embrionų vienai koncentracijai. Toliau pateiktos instrukcijos skirtos bandymui atlikti 24 duobučių plokštelėje. Jei naudojamos kitokios bandymo kameros (pvz., mažos Petri lėkštelės) ar bandomas didesnis koncentracijos verčių skaičius, instrukcija reikėtų atitinkamai pakeisti.

21. Informacija ir vaizdinės instrukcijos skirtingos koncentracijos tirpalams paskirstyti 24 duobučių lėkštelėse yra pateikti 27 pastraipoje ir 4 priedėlio 1 paveiksle.

Kontroliniai ėminiai

22. Skiedimo vandens kontroliniai ėminiai reikalingi, kaip neigiami kontroliniai ėminiai ir kaip vidiniai plokštelės kontroliniai ėminiai. Jei vidiniame plokštelės kontroliniame ėminyje pastebimas daugiau kaip vienas žuvęs embrionas, plokštelė atmetama, todėl sumažėja koncentracijos verčių skaičius LC_{50} vertei gauti. Jei atmetama visa plokštelė, gali sumažėti galimybė įvertinti ir atskirti stebimą poveikį, ypač jei atmesta plokštelė yra tirpiklio kontrolinio ėminio plokštelė arba plokštelė, kurioje apdoroti embrionai taip pat yra paveikti. Pirmuoju atveju bandymas turi būti pakartotas. Antruoju atveju visos (-ų) apdorojimo grupės (-ių) netekimas dėl žūstamumo vidiniame plokštelės kontroliniame ėminyje gali apriboti galimybę įvertinti poveikį ir nustatyti LC_{50} vertes.

23. Kiekvienai bandomai ikrų partijai atliekamas pastovios 4 mg/l koncentracijos teigiamo kontrolinio 3,4-dichloranilino ėminio bandymas.

24. Jei naudojamas tirpiklis, papildoma 20 embrionų grupė yra veikiama tirpikliu ant atskiros 24 duobučių plokštelės, tokiu būdu tai yra tirpiklio kontrolinis ėminys. Bandymą būtų galima laikyti priimtinu, jei būtų įrodyta, kad tirpiklis neturi reikšmingo poveikio išsiritimo laikui bei išgyvenamumui ir jokio kitokio neigiamo poveikio embrionams (plg. 8c pastraipą).

Veikimo pradžia ir bandymo trukmė

25. Bandymas pradedamas kuo greičiau po ikrų apvaisinimo ir baigiamas po 96 h veikimo bandomąja medžiaga. Embrionus reikėtų panardinti į bandymo tirpalus prieš blastodisko dalijimosi pradžią arba ne vėliau kaip pasiekus 16 ląstelių stadiją. Norint pradėti veikimą kuo greičiau, atsitiktinai pasirenkami ikrai, kurių skaičius būtų bent du kartus didesnis nei apdorojimo grupei reikiamas ikrų skaičius, ir ne vėliau kaip 90 min po apvaisinimo ikrai pernešami į atitinkamos koncentracijos ir kontrolinius ėminius (pvz., į 100 ml kristalizavimo lėkšteles; ikrai turėtų būti visiškai apsemti).

26. Gyvybingus apvaisintus ikrus reikėtų atskirti nuo neapvaisintų ikrų ir ne vėliau kaip 180 min po apvaisinimo pernešti į 24 duobučių plokšteles, prieš tai kondicionuotas 24 h ir iš naujo pripildytas 2 ml/duobutei

▼M7

naujai paruoštais bandymo tirpalais. Žiūrint per stereomikroskopą (pageidautina didinanti ≥ 30 kartų) atrenkami dalijimosi stadijos apvaisinti ikrai, kurie dalijimosi metu neturi akivaizdžių pažeidimų (pvz., asimetrijos, susidariusių pūslelių) arba apvalkalo sužalojimo. Apie ikrų surinkimą ir atskyrimą žr. 3 priedėlio 1 bei 3 paveikslus ir 4 priedėlio 2 paveikslą.

Ikrų paskirstymas 24 duobučių plokštelėse

27. Ikrai paskirstomi į duobučių plokšteles tokiais skaičiais (tai pat žr. 4 priedėlio 1 paveikslą):

— 20 ikrų plokštelei kiekvienai bandymo koncentracijai;

— 20 ikrų kaip tirpiklio kontrolinis ėminys vienoje plokštelėje (jei būtina);

— 20 ikrų kaip teigiamas kontrolinis ėminys vienoje plokštelėje;

— 4 ikrai skiedimo vandenyje kaip plokštelės vidinis kontrolinis ėminys kiekvienoje iš pirmiau nurodytų plokštelių;

— 24 ikrai skiedimo vandenyje kaip neigiamas kontrolinis ėminys vienoje plokštelėje.

Stebėjimai

28. Kiekvieno embriono apikalinius stebėjimo požymius sudaro: embrionų koaguliacija, somitų nesusidarymas, uodegos neatsiskyrimas, širdies plakimo nebuvimas (1 lentelė). Šie stebėjimo požymiai naudojami žūstamumui nustatyti: Vieno kurio nors šių požymių teigiamas rezultatas reiškia, kad zebrinės danijos embrionas yra žuvęs. Be to, išsiritimas apdorojimo ir kontrolinėse grupėse yra registruojamas kasdien, pradedant nuo 48 h. Stebėjimo duomenys yra registruojami kas 24 h iki bandymo pabaigos.

1 lentelė

Ūmaus toksiškumo zebrinės danijos embrionams apikaliniai stebėjimo požymiai, praėjus 24–96 h po apvaisinimo

	Veikimo trukmė			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Koaguliavę embrionai	+	+	+	+
Somitų nesusidarymas	+	+	+	+
Uodegos neatsiskyrimas	+	+	+	+
Širdies plakimo nebuvimas		+	+	+

29. *Embriono koaguliacija.* Koaguliavę embrionai yra pieno baltumo ir žiūrint per mikroskopą atrodo tamsios spalvos (žr. 5 priedėlio 1 paveikslą). Koaguliavusių embrionų skaičius nustatomas po 24, 48, 72 ir 96 h.

30. *Somitų nesusidarymas.* 26 ± 1 °C temperatūroje normaliai besivystančiame zebrinės danijos embrione po 24 h susidaro apie 20 somitų (žr. 5 priedėlio 2 paveikslą). Normaliai išsivystęs embrionas atlieka spontaninius judesius (susitraukimai į abi puses). Spontaniniai judesiai rodo somitų susidarymą. Somitų nebuvimas registruojamas po 24, 48, 72 ir 96 h. Somitai galėtų nesusidaryti po 24 h dėl bendrojo vystymosi vėlavimo. Ne vėliau kaip po 48 h somitų susidarymas turėtų būti baigtas. Jei jų nėra, embrionai laikomi žuvusiais.

31. *Uodegos neatsiskyrimas.* Normaliai besivystančio zebrinės danijos embriono uodegos atsiskyrimas (žr. 5 priedėlio 3 paveikslą) nuo trynio stebimas

▼M7

po užpakalinės embriono kūno dalies pailgėjimo. Uodegos neatsiskyrimas registruojamas po 24, 48, 72 ir 96 h.

32. *Širdies plakimo nebuvimas*. 26 ± 1 °C temperatūroje normaliai besivystančio zebrinės danijos embriono širdies plakimas matomas po 48 h (žr. 5 priedėlio 4 paveikslą). Reikia būti ypač atidiems registruojant šią vertinamąją baigtį, nes nereguliarus (neritmingas) širdies plakimas *neturėtų* būti registruojamas kaip žūtis. Dar daugiau, žūtimi nelaikomas matomas širdies plakimas be apytakos pilvo aortoje. Siekiant registruoti šią vertinamąją baigtį, embrioną su neplakančia širdimi reikėtų stebėti ne trumpiau kaip 1 min, esant ne mažesniam kaip 80× didinimui. Širdies plakimo nebuvimas registruojamas po 48, 72 ir 96 h.

33. Išsiritimo laipsnį visose apdorotose ir kontrolinėse grupėse reikėtų pradėti registruoti nuo 48 h ir pateikti ataskaitoje. Nors išsiritimas nėra vertinamoji baigtis, naudojama LC_{50} apskaičiuoti, išsiritimas užtikrina poveikį embrionui nesant kliūties, kurios funkciją atlieka apvalkalas, ir kaip toks jis gali padėti aiškinti duomenis.

34. Normalaus zebrinės danijos embrionų vystymosi (35) išsamus aprašymas ir nenormalaus vystymosi pavyzdžiai pateikti 3 ir 5 priedėliuose.

Analiziniai matavimai

35. Bandymo pradžioje ir pabaigoje matuojamas kontrolinio (-ių) ėminio (-ių) ir didžiausios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos tirpalų pH, bendras kietumas ir laidis. Naudojant pusiau statines sistemas, pH reikėtų matuoti prieš vandens atnaujinimą ir po jo. Ištirpusio deguonies koncentracija matuojama bandymo pabaigoje neigiamų kontrolinių ėminių ir didžiausios bandymo koncentracijos su gyvybingais embrionais tirpaluose, ir ji turėtų atitikti bandymo tinkamumo kriterijus (žr. 8f pastraipą). Jei susirūpinta dėl temperatūros nevienodumo visose 24 duobučių plokštelėse, temperatūra matuojama trijuose atsitiktinai pasirinktuose induose. Temperatūrą pageidautina registruoti nuolat visą bandymo trukmę arba bent kartą per parą.

36. Jei naudojama statinė sistema, koncentraciją reikėtų matuoti bandymo pradžioje ir pabaigoje bent didžiausios ir mažiausios bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos tirpaluose, bet pageidautina matuoti visuose tirpaluose su chemine medžiaga. Jei atliekant pusiau statinius (atnaujinimo) bandymus manoma, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentracija visą laiką yra lygi nominaliajai koncentracijai ± 20 %, rekomenduojama nustatyti bent didžiausią ir mažiausią naujai paruošto tirpalo bandymo koncentraciją ir koncentraciją prieš pat atnaujinimą. Jei atliekant bandymus nesitikima, kad bandomosios cheminės medžiagos koncentracija visą laiką yra lygi nominaliajai koncentracijai ± 20 %, reikia nustatyti visas naujai paruoštų tirpalų koncentracijos vertes ir koncentraciją prieš pat atnaujinimą. Jei analizei nepakanka tūrio, gal būti naudinga sujungti bandymo tirpalus arba naudoti dirbtines kameras, pagamintas iš tos pačios medžiagos ir turinčias tokį patį paviršiaus ploto ir tūrio santykį kaip 24 duobučių plokštelės. Primygtinai rekomenduojama rezultatus pagrįsti išmatuotomis koncentracijos vertėmis. Jei koncentracijos vertės neatitinka 80–120 % nominaliosios koncentracijos, poveikio koncentraciją reikėtų išreikšti kaip išmatuotų koncentracijos verčių geometrinį vidurkį; daugiau duomenų pateikta EBPO rekomendacinio dokumento Nr. 23 apie sunkiai apdorojamų cheminių medžiagų ir mišinių toksiškumo vandens organizmams bandymus 5 skyriuje (28).

RIBINIS BANDYMAS

37. Taikant šiame bandymų metode aprašytas procedūras, galima atlikti ribinį bandymą su bandomosios cheminės medžiagos koncentracija 100 mg/l arba koncentracija, atitinkančia ribinio tirpumo bandymo terpėje vertę (jei ji mažesnė), jei norima įrodyti, kad LC_{50} yra didesnė už šią koncentraciją. Ribinį bandymą reikėtų atlikti naudojant 20 embrionų apdorotam ėminiui, teigiamam kontroliniam ėminiui ir, jei reikia, tirpiklio kontroliniam ėminiui

▼M7

bei 24 embrionus neigiamam kontroliniam ėminiui. Jei bandytai koncentracijai žūstamumas procentais yra 10 % didesnis nei neigiamo kontrolinio ėminio (ar tirpiklio kontrolinio ėminio) žūstamumas, reikėtų atlikti viso masto tyrimą. Reikėtų registruoti visus pastebėtus reiškinius. Jei neigiamo kontrolinio ėminio (ar tirpiklio kontrolinio ėminio) žūstamumas yra didesnis kaip 10 %, bandymas netinkamas ir jį reikėtų pakartoti.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Rezultatų apdorojimas

38. Atliekant šio bandymo rezultatų statistinę analizę, nepriklausomais kartotiniais ėminiais laikomos atskiros duobutės. Embrionų, kurių bent vienas iš apikalinių stebėjimo požymių yra teigiamas 48 ir (arba) 96 h, procentinė dalis pateikiama grafiškai kaip bandymo koncentracijos verčių funkcija. Reikėtų taikyti tinkamus statistinius metodus (38) ir ieškoti informacijos EBPO rekomendaciniame dokumente *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data* (39), kad būtų galima apskaičiuoti kreivės krypties koeficientus, LC_{50} vertes ir pasikliovimo ribas (95 %).

Bandymo ataskaita

39. Į bandymo ataskaitą turėtų būti įtraukta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

Vienkomponentė cheminė medžiaga:

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;

— cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt. (įskaitant organinės anglies kiekį, jei tinka).

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

— kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.

bandymo organizmai:

— mokslinis pavadinimas, veislė, šaltinis apvaisintų ikrų surinkimo metodas ir vėlesnis apdorojimas.

Bandymo sąlygos:

— taikyta bandymo procedūra (pvz., pusiau statinis atnaujinimas);

— šviesiojo laikotarpio trukmė;

— bandymo schema (pvz., bandymo kamerų skaičius, kontrolinių ėminių tipai);

— vandens, kuriame laikomos žuvys, kokybės charakteristikos (pvz., pH, kietumas, temperatūra, laidis, ištirpusio deguonies koncentracija);

— bandymo tirpalų ištirpusio deguonies koncentracija, pH, bendras kietumas, temperatūra ir laidis bandymo pradžioje ir po 96 h;

— pradinių ir bandymo tirpalų paruošimo metodas ir atnaujinimo dažnumas;

▼M7

— tirpiklio naudojimo pagrindimas ir tirpiklio pasirinkimo pagrindimas, jei tirpiklis ne vanduo;

— bandymo koncentracijos nominaliosios vertės ir analizės cheminės medžiagos koncentracijai bandymo induose nustatyti rezultatas; ataskaitoje reikėtų pateikti metodo atgavimo laipsnį ir kiekybinio nustatymo ribą;

— įrodymas, kad kontroliniai ėminiai atitinka bendram išgyvenamumui taikomus tinkamumo kriterijus;

— ikrų apvaisinimo laipsnis;

— išsiritimo apdorotose ir kontrolinėse grupėse laipsnis.

Rezultatai:

— didžiausia bandymo koncentracija, kuriai gautas nulinis žūstamumas bandymo laikotarpiu;

— mažiausia bandymo koncentracija, kuriai gautas 100 % žūstamumas bandymo laikotarpiu;

— bendras žūstamumas kiekvienai koncentracijai rekomenduojamais stebėjimo momentais;

— LC_{50} vertės po 96 h (neprivalomai po 48 h), kai žūstamumo pasikliovimo ribos yra 95 %, jei įmanoma;

— žūstamumo bandymo pabaigoje kaip koncentracijos funkcijos kreivė;

— žūstamumas kontroliniuose ėminiuose (neigiamuose kontroliniuose ėminiuose, vidiniuose plokštelės kontroliniuose ėminiuose, taip pat teigiamame kontroliniame ėminyje ir tirpiklio kontroliniame ėminyje, jei naudotas);

— kiekvieno iš keturių apikalinių stebėjimo požymių duomenys;

— morfologinių ir fiziologinių anomalijų, jei yra, dažnumas ir aprašymas (žr. pavyzdžius, pateiktus 5 priedėlio 2 paveiksle);

— incidentai bandymo metu, kurie būtų galėję turėti įtakos bandymo rezultatams;

— duomenų statistinė analizė ir apdorojimas (probit analizė, logistinės regresijos modelis ir LC_{50} geometrinis vidurkis);

— (transformuotos) koncentracijos ir atsako priklausomybės regresijos kreivės krypties koeficientas ir pasikliovimo ribos.

Visi nukrypimai nuo bandymų metodo ir atitinkami paaiškinimai.

Rezultatų aptarimas ir aiškinimas.

LITERATŪRA

(1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Paris.

(2) OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Paris.

(3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute

▼M7

fish LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: 87-102.

(4) ISO (2007) International Standard Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.

(5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) – a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.

(6) Schulte, C. and Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test – preliminary results. ATLA 22, 12-19.

(7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Germany.

(8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. and Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: 2087-2102.

(9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 9690-9700.

(10) Kammann, U., Vobach, M. and Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97-102.

(11) Groth, G., Kronauer, K. and Freundt, K.J. (1994) Effects of *N,N*-diemethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. *In Vitro* 8: 401-406.

(12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. and Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 878-882.

(13) Nguyen, L.T. and Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: 566-571.

(14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. and Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: 3024-3031.

(15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. and Carr G. J.. Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry (Accepted).

(16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), 196–209

(17) Šio priedo C.4 skyrius. *Lengvo biologinio skaidumo nustatymas*.

(18) Šio priedo C.29 skyrius. *Lengvas biologinis skaidumas. CO_2 sandariuose induose*.

(19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: 25-36.

▼M7

(20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Reprod. Toxicol. 33: 133-141.

(21) Incardona, J.P, Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257: 242-249.

(22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. Toxicol. Appl. Pharmacol. 253: 244-252.

(23) Šio priedo C.48 skyrius. *Trumpalaikis žuvų reprodukcijos tyrimas*. Žr. 4a priedėlį.

(24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). Toxicol. *in vitro* 23: 1436-1442.

(25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35, 4097–4102.

(26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1676-1682.

(27) ISO (1996) International Standards. Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-through method. Available: [http://www.iso.org].

(28) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.

(29) Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. J. Fish Biol. 10: 121-173.

(30) Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5th edition. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.

(31) Canadian Council on Animal Care (2005) Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf

(32) Europos Komisija (2007). 2007 m. birželio 18 d. Komisijos rekomendacija dėl eksperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo ir priežiūros gairių (Pranešta dokumentu Nr. C(2007) 2525) [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:EN:PDF].

(33) Europos Sąjunga (2010). 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos. OL L 276, 2010 10 20, p. 33,

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF

(34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: 173-181.

▼**M7**

(35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253-310.

(36) Šio priedo C.2 skyrius. Daphnia sp. *ūmaus judrumo slopinimo (imobilizavimo) bandymas.*

(37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect conentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1970-1978

(38) ISO (2006) International Standard. Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Available: [http://www.iso.org].

(39) OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris.

(40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper „Fish embryo toxicity assays“. UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. 298 pp.

▼M7

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Apikalinė vertinamoji baigtis – sukelianti poveikį populiacijos lygiu.

Blastulė – ląstelių darinys apie animalinį polių, kuris dengia tam tikrą trynio dalį.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Epibolija – didžiulė daugiausia epidermio ląstelių proliferacija embriono gastruliacijos tarpsniu ir ląstelių judėjimas iš nugaros į pilvo pusę, dėl ko endodermi-niai ląstelių sluoksniai tampa vidiniai į invaginaciją panašaus proceso metu ir trynys atsiduria embriono viduje.

Dinaminis bandymas – bandymas, kai per bandymo sistemą teka nuolatinis bandymo tirpalų srautas visą veikimo trukmę.

Vidinis plokštelės kontrolinis ėminys – vidinis kontrolinis ėminys, kurį sudaro skiedimo vandens pripildytos 4 duobutės 24 duobučių plokštelėje, kad būtų galima nustatyti galimą gamintojo arba tyrėjo sukeltą plokštelių užteršimą proce-dūros metu ir visus su plokštele susijusius veiksnius, galbūt darančius įtaką bandymo rezultatui (pvz., temperatūros gradientą).

IUPAC – Tarptautinė teorinės ir taikomosios chemijos sąjunga.

Gyvūnams laikyti skirtas vanduo – vanduo, kuriame laikomos suaugusios akvariumų žuvys.

Medianinė mirtina koncentracija (LC_{50}) – bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant bandymo metu žūsta 50 % bandymo organizmų.

Pusiau statinis atnaujinimo bandymas – bandymas, kurį atliekant bandymo tirpalai reguliariai atnaujinami po tam tikro laikotarpio (pvz., kas 24 h).

SMILES – supaprastinto molekulių pateikimo linijine forma specifikacija.

Somitas – besivystančio stuburinių embriono somitai yra į šonus nuo nervinio vamzdelio pasiskirsčiusi mezoderminė masė, iš kurios vėliau susidaro derma (dermatomas), skeleto raumuo (miotomas) ir slanksteliai (sklerotomas).

Statinis bandymas – bandymas, kurį atliekant bandymo tirpalai nekeičiami visą bandymo trukmę.

Bandomoji cheminė medžiaga – taikant šį metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

▼M7

2 priedėlis

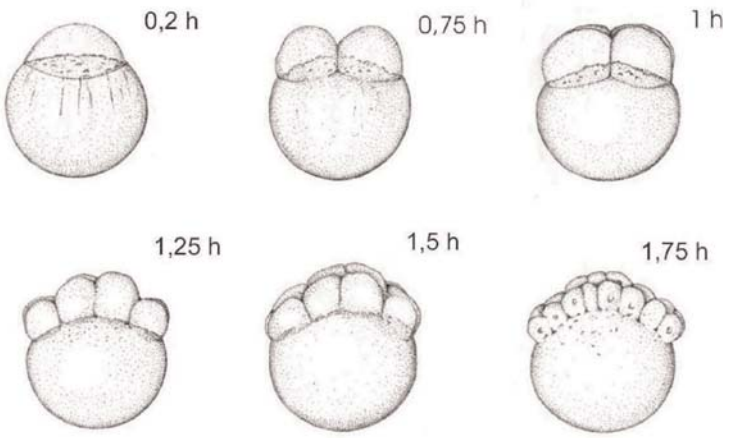
PRIEŽIŪRA, VEISIMAS IR TIPINĖS SĄLYGOS ATLIEKANT ŪMAUS TOKSIŠKUMO ZEBRINĖS DANIJOS EMBRIONUI BANDYMUS

Zebrinė danija (*Danio rerio*)		
Rūšies kilmė		Indija, Birma, Malaka, Sumatra
Lytinis dimorfizmas		Patelės: išpūstas pilvas, kai turi ikrų Patinai: lieknesni, oranžinis atspalvis tarp mėlynų išilginių juostų (ypač aiškiai matomas prie analinio peleko)
Maitinimo režimas		Sauso maisto dribsniai (ne daugiau kaip 3 % žuvies masės per parą) 3 – 5 kartus per parą; papildomai sūriavandenių krevečių (*Artemia* spec.) nauplijai ir (arba) reikiamo dydžio mažos dafnijos, gautos iš neužteršto šaltinio. Gyvas maistas yra pagerintos aplinkos šaltinis, todėl, jei įmanoma, turėtų būti duodamas, jei įmanoma. Siekiant užtikrinti optimalią vandens kokybę, maisto perteklius ir išmatos turėtų būti pašalintos maždaug po valandos nuo maitinimo.
Apytikrė suaugusios žuvies masė		Patelių:0,65 ± 0,13 g Patinų: 0,5 ± 0,1 g
Veislinių žuvų priežiūra	Apšvietimas	Fluorescencinės lempos (plataus spektro); 10–20 μE/m^2/s, 540–1 080 liuksų arba 50–100 ft-c (laboratorijos apšvietimas); 12–16 h šviesiojo laikotarpio trukmė
	Vandens temperatūra	26 ± 1 °C
	Vandens kokybė	O_2 ≥ 80 % soties, kietumas, pvz., ~30–300 mg/l $CaCO_3$, NO_3^-: ≤ 48mg/l, NH_4^+ ir NO_2^-: < 0,001 mg/l, liekamojo chloro koncentracija <10 μg/l, bendro organinio chloro koncentracija < 25 ng/l, pH = 6,5–8,5
	Kiti vandens kokybės kriterijai	Kietųjų dalelių koncentracija < 20 mg/l, bendrosios organinės anglies koncentracija < 2 mg/l, bendra fosforo organinių pesticidų koncentracija < 50 ng/l, bendra chloro organinių pesticidų ir polichlorintųjų bifenilų koncentracija < 50 ng/l
	Žuvims laikyti skirtos talpyklos dydis	pvz., 180 l, 1 žuvis/l
	Vandens valymas	Nuolatinis (per aktyvintųjų anglių filtrą); kitas galimybes sudaro deriniai su pusiau statinio atnaujinimo priežiūra ar dinamine sistema su nuolatiniu vandens atnaujinimu
	Rekomenduojamas patinų ir patelių santykis veisiant	2:1 (arba masinis nerštas)
Neršto talpyklos		Pvz., 4 l talpyklos su plieninėmis grotelėmis dugne ir dirbtiniais augalais kaip neršto dirgikliais; išorinio apšiltinimo dembliai, arba masinis nerštas laikymo talpyklose
Ikrų struktūra ir išvaizda		Stabilus apvalkalas (t. y. visiškai skaidrus, nelipnus, skersmuo ~ 0,8–1,5 mm)
Neršto išeiga		Viena subrendusi patelė neršia ne mažiau kaip 50–80 ikrų per parą. Atsižvelgiant į veislę, neršto išeiga gali būti gerokai didesnė. Apvaisinimo laipsnis turėtų būti ≥70 %. Pirmą kartą neršiančių žuvų ikrų apvaisinimo laipsnis pirmuosius kelis nerštus gali būti mažesnis.
Bandymo tipas		Statinis, pusiau statinio atnaujinimo, dinaminis, 26 ± 1 °C, 24 h kondicionuotos bandymų kameros (pvz., 24 duobučių plokštelės, 2,5–5 ml vienai duobutei)

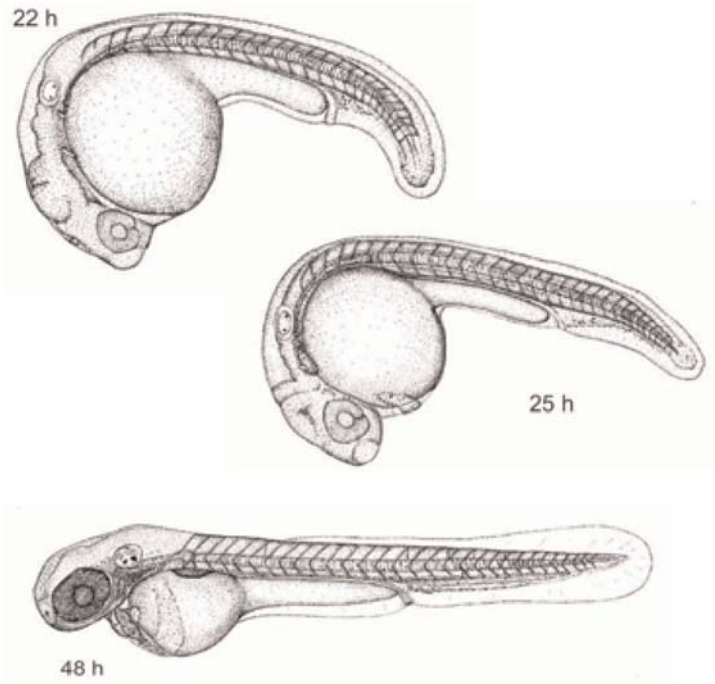
▼M7

3 priedėlis

NORMALUS ZEBRINĖS DANIJOS VYSTYMASIS 26 °C TEMPERATŪROJE

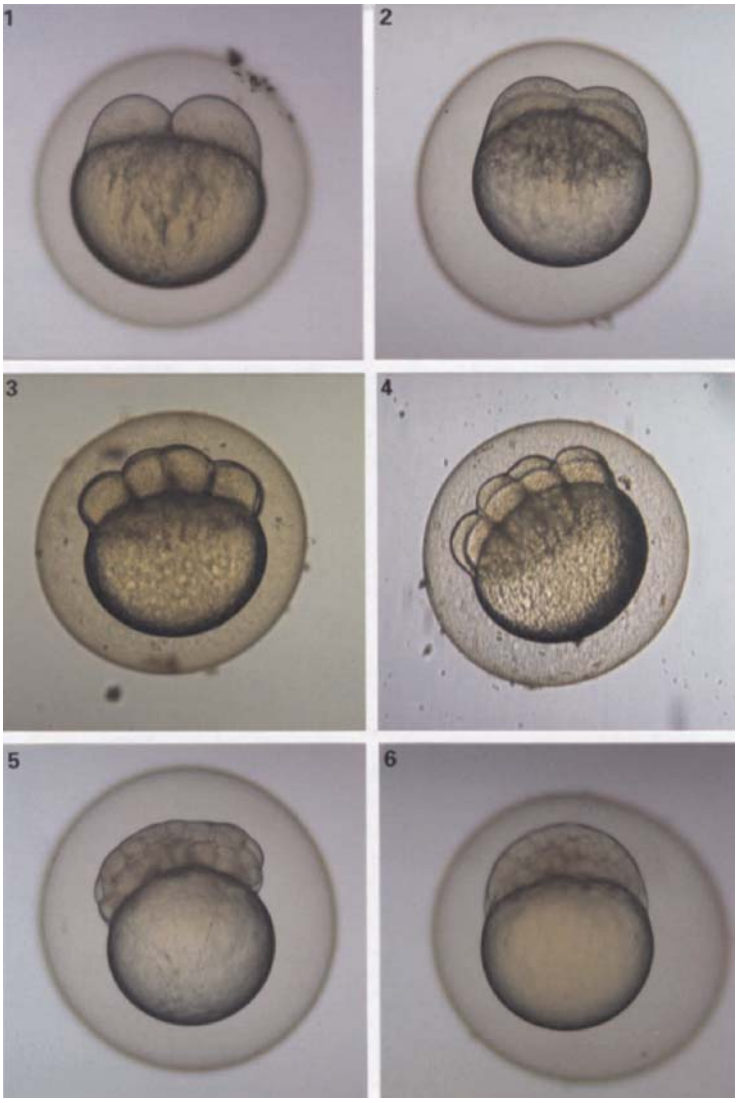


1 paveikslas. Rinktinės zebrinės danijos (*Danio rerio*) ankstyvojo vystymosi stadijos: 0,2–1,75 h po apvaisinimo (paimta iš Kimmel *et al*., 1995 (35)). Normalaus vystymosi laikinė seka gali būti paimta ikrų apvaisinimui ir gyvybingumui diagnozuoti (žr. 26 pastraipą, *Apvaisintų ikrų atranka*).



2 paveikslas. Rinktinės zebrinės danijos (*Danio rerio*) vėlyvojo vystymosi stadijos (embrionas be apvalkalo matomumui optimizuoti): 22–48 h po apvaisinimo (paimta iš Kimmel *et al*., 1995 (35)).

▼M7



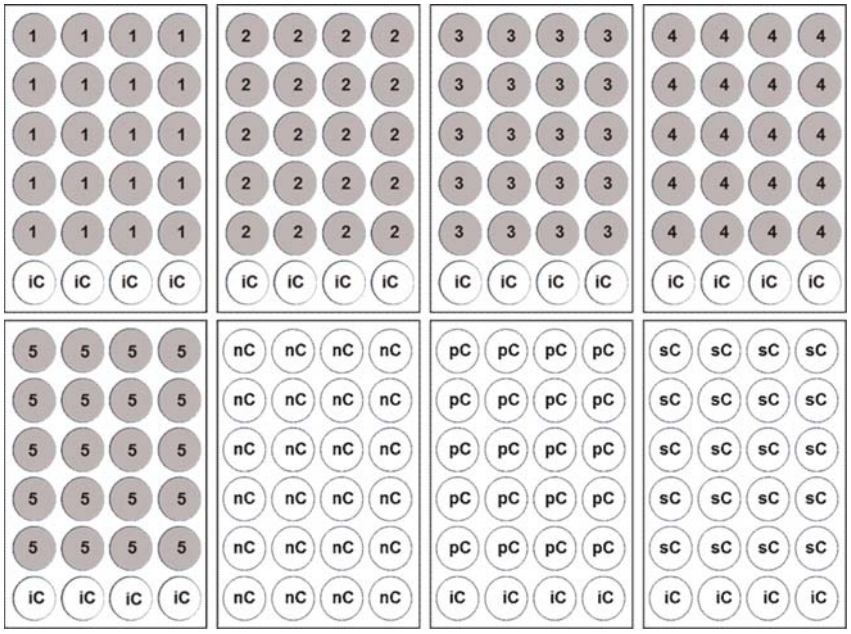
3 paveikslas. Normalus zebrinės danijos (*Danio rerio*) embriono vystymasis: 1) 0,75 h, 2 ląstelių stadija; 2) 1 hr, 4 ląstelių stadija; 3) 1,2 h, 8 ląstelių stadija; 4) 1,5 h, 16 ląstelių stadija; 5) 4,7 h, epibolijos pradžia; 6) 5,3 h, maždaug 50 % epibolijos (paimta iš Braunbeck & Lammer 2006 (40)).

▼M7

4 Priedėlis

1 paveikslas

24 duobučių plokštelės išdėstymo schema



1–5 – enkių bandymo koncentracijos verčių cheminė medžiaga;

nC – neigiamas kontrolinis ėminys (skiedimo vanduo);

iC – vidinis plokštelės kontrolinis ėminys (skiedimo vanduo);

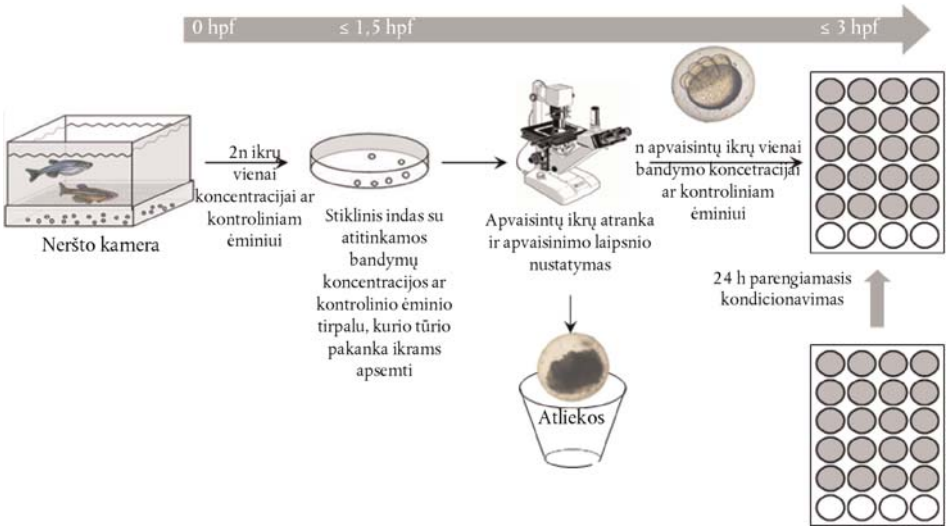
pC – teigiamas kontrolinis ėminys (3,4-dichloranilinas, 4mg/l);

sC – tirpiklio kontrolinis ėminys.

▼M7

2 paveikslas.

Ūmaus toksiškumo zebrinės danijos embrionui bandymo procedūros schema (iš kairės į dešinę): ikrų gamyba, ikrų surinkimas, laikymas stikliniuose induose prieš veikimą iš karto po apvaisinimo, apvaisintų ikrų atranka per inversinį ar dviejų okuliarų mikroskopą ir apvaisintų ikrų paskirstymas į 24 duobučių plokšteles su atitinkamos koncentracijos chemine medžiaga ir kontroliniais ėminiais, n – ikrų skaičius vienai bandymo koncentracijai ar kontroliniam ėminiui (šiame bandyme – 20), hpf – valandoms po apvaisinimo.



▼M7

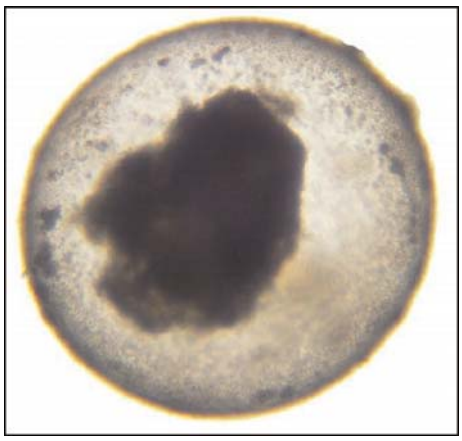
5 priedėlis

ŪMAUS TOKSIŠKUMO ZEBRINĖS DANIJOS EMBRIONUI BANDYMO ŽŪSTAMUMO VERTINAMŲJŲ BAIGČIŲ ATLASAS

Šios apikalinės vertinamosios baigtys rodo ūmų toksiškumą, taigi ir embrionų žūtį: *Embriono koaguliacija, uodegos neatsiskyrimas, somitų nesusidarymas ir širdies plakimo nebuvimas*. Šios mikrofotografijos buvo parinktos kaip šių vertinamųjų baigčių vaizdinė medžiaga.

1 paveikslas

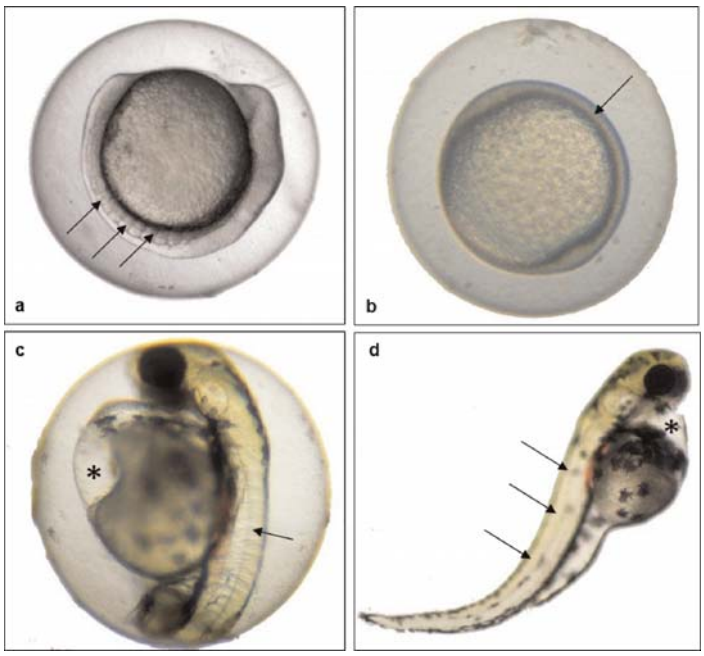
Embriono koaguliacija



Šviesiojo lauko apšvietimo sąlygomis koaguliavusiuose zebrinės danijos embrionuose matomi įvairūs neskaidrūs intarpai.

2 paveikslas

Somitų nesusidarymas

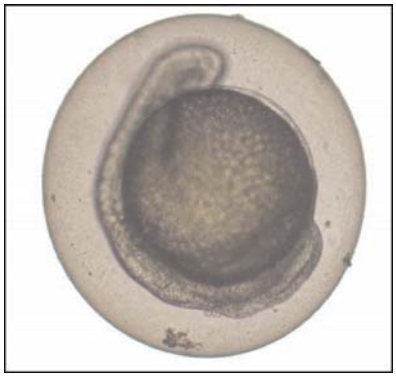


▼M7

Nors vystymasis vėluoja maždaug 10 h, 24 h amžiaus zebrinės danijos embrionui a) matomi gerai išsivystę somitai (→), o embrionui b) nesimato jokių somitų susidarymo požymių (→). Nors gerai matoma trynio maišelio edema (*), 48 h amžiaus zebrinės danijos embrionui c) ryškiai matomi susidarę somitai (→), o d) pavaizduotas 96 h amžiaus zebrinės danijos embrionas neturi jokių somitų susidarymo požymių (→). Atkreipiamas dėmesys į tai, kad d) pavaizduotas embrionas turi išlinkusį stuburą (skoliozė) ir perikardo edemą (*).

3 paveikslas

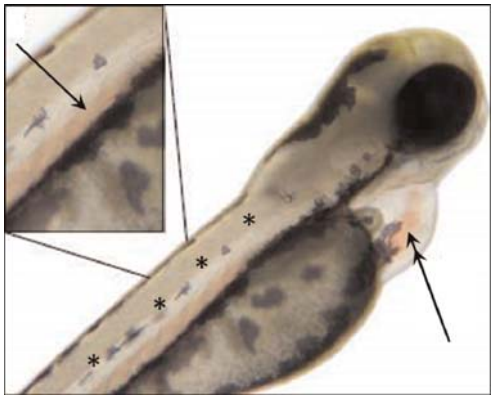
Uodegos pumpuro neatsiskyrimo



vaizdas iš šono (a: →96 h amžiaus zebrinės danijos embrionas). Atkreipiamas dėmesys į tai, kad nėra akies pūslelės (*).

4 paveikslas

Širdies plakimo nebuvimas



Atsižvelgiant į apibrėžtį aišku, kad tai būtų sunku pavaizduoti mikrofotografijoje. Širdies plakimo nebuvimą rodo širdies nesusitraukimas (dviguba rodyklė). Kraujo ląstelių nejudrumas, pvz., pilvo aortos (→įklijoje) nėra širdies plakimo nebuvimo rodiklis. Taip pat reikia atkreipti dėmesį į tai, kad nesusidaro šio embriono somitai (*, raumenų audiniai labiau vientisi, o ne segmentuoti). Stebėjimo trukmė širdies plakimo nebuvimui registruoti turėtų būti ne mažesnė kaip viena minutė, esant ne mažesniam kaip 80× didinimui.

▼M7

C.50. TOKSIŠKUMO MYRIOPHYLLUM SPICATUM BANDYMAS SISTEMOJE BE NUOSĖDŲ

ĮVADAS

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO bandymų gaires (TG) 238 (2014). Jis sukurtas siekiant įvertinti cheminių medžiagų toksiškumą varpotajai plunksnalapei *Myriophyllum spicatum*, po vandeniu augančiam plunksnalapių šeimos dviskilčiam augalui. Bandymų metodas pagrįstas ASTM taikomu bandymų metodu (1), modifikuotu kaip sistema be nuosėdų (2), kad būtų įvertintas bandomųjų cheminių medžiagų būdingasis ekotoksiškumas (neatsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos pasiskirstymo tarp vandens ir nuosėdų pobūdį). Bandymo sistema be nuosėdų analizės požiūriu yra nesudėtinga (tik vandens fazėje), o rezultatai gali būti nagrinėjami lygiagrečiai ir (arba) lyginant su gautais atliekant *Lemna sp.* bandymą (3); be to, dėl reikiamų sterilių sąlygų yra visiškai sumažintas mikroorganizmų ir dumblių poveikis (cheminės medžiagos sugertis ir (arba) skaidymas ir kt). Šis bandymas nepakeičia kitų toksiškumo vandeninei terpei bandymų; jis greičiau turėtų juos papildyti taip, kad būtų galima išsamiau įvertinti pavojų vandens augalams ir riziką. Bandymų metodo tinkamumas buvo patvirtintas atliekant tarplaboratorinį bandymą (4).

2. Išsamiai aprašytas bandymas su bandymo tirpalo atnaujinimu (pusiau statinis) ir be atnaujinimo (statinis). Atsižvelgiant į bandymo tikslus ir reglamentavimo reikalavimus, rekomenduojama atsižvelgti į galimybę taikyti pusiau statinį metodą, pvz., jei cheminės medžiagos greitai pasišalina iš tirpalo dėl lakumo, adsorbcijos, fotocheminio skaidymo, nusėdimo arba biologinio skaidymo. Papildomi nurodymai pateikti (5). Šis bandymų metodas taikomas cheminėms medžiagoms, kurioms jis buvo patvirtintas (daugiau duomenų pateikta tarplaboratorinio bandymo ataskaitoje (4)), arba preparatams ar žinomiems mišiniams; jei bandomas mišinys, jo sudedamosios dalys turėtų būti kiek įmanoma geriau identifikuotos ir kiekybiškai nustatytos. Šis sistemos be nuosėdų *Myriophyllum spicatum* bandymų metodas papildo toksiškumo *Myriophyllum spicatum* bandymą vandens ir nuosėdų sistemoje (6). Prieš taikant bandymų metodą mišiniui numatomo reglamentavimo tikslais, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, tai dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį.

BANDYMO PRINCIPAS

3. Nuolat augančios (tik modifikuotoje Andrews terpėje, žr. 2 priedėlį) *Myriophyllum spicatum* augalinės kultūros auginamos kaip monokultūra, 14 parų jas veikiant įvairios koncentracijos bandomąja chemine medžiaga bandymo sistemoje be nuosėdų. Bandymo tikslas – su chemine medžiaga susijusio poveikio vegetatyviniam augimui šiuo laikotarpiu kiekybinis įvertinimas, pagrįstas pasirinktų matuojamų kintamųjų įvertinimu. Matuojami kintamieji yra augančių ūglių, šoninių šakų ir šaknų ilgis, taip pat žaliosios ir sausos medžiagos masės didėjimas ir žiedų vainikų skaičiaus didėjimas. Be to, atsižvelgiama į būdingus kokybinius bandymo organizmų pokyčius, pvz., defektus arba chlorozę ar nekrozę, kurias rodo pageltimas arba balta ir ruda spalva. Siekiant kiekybiškai nustatyti su cheminė medžiaga susijusį poveikį, augimas bandymo tirpaluose lyginamas su augimu kontroliniuose ėminiuose ir nustatoma x % augimo slopinimą sukelianti koncentracija, išreiškiama EC_x; kai *x* gali būti kuri nors vertė, atsižvelgiant į reglamentavimo reikalavimus, pvz., EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Reikėtų pažymėti, kad EC_{10} ir EC_{20} įverčių vertės yra patikimos ir tinka atliekant tik tokius bandymus, kurių kontroliniams augalams nustatyti variacijos koeficientai yra mažesni nei vertinamas poveikio lygis, t. y. variacijos koeficientai turėtų būti < 20 %, kad EC_{20} įvertis būtų statistiškai patikimas.

4. Reikėtų nustatyti apdorotų ir neapdorotų augalų vidutinį savitąjį augimo greitį (apskaičiuotą pagal pagrindinio ūglio ilgio ir trijų papildomų matuojamų kintamųjų vertinimo duomenis) ir išeigą (apskaičiuotą pagal pagrindinio ūglio ilgio

▼M7

ir trijų papildomų matuojamų kintamųjų padidėjimo duomenis). Savitasis augimo greitis (r) ir išeiga (y) vėliau naudojami E_rC_x (pvz., E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) ir E_yC_x (pvz., E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}) nustatyti.

5. Be to, gali būti statistiškai nustatyta mažiausia stebimo poveikio koncentracija (LOEC) ir nestebimo poveikio koncentracija (NOEC).

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

6. Turėtų būti atitinkamo jautrio analizės metodas bandomosios cheminės medžiagos kiekiui bandymo terpėje kiekybiškai nustatyti. Informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą, kuri gali būti naudinga bandymo sąlygoms nustatyti, sudaro struktūrinė formulė, grynumas ir priemaišos, tirpumas vandenyje, patvarumas veikiant vandeniui ir šviesai, rūgšties disociacijos konstanta (pK_a), pasiskirstymo tarp oktanolio ir vandens koeficientas (K_{ow}), garų slėgis ir biologinis skaidumas. Tirpumas ir garų slėgis gali būti naudojami Henrio dėsnio konstantai apskaičiuoti, kuri rodytų, ar atliekant bandymą gali būti didelių bandomosios cheminės medžiagos garavimo nuostolių. Tai padėtų nustatyti, ar reikėtų imtis konkrečių priemonių tokiems nuostoliams kontroliuoti. Jei duomenys apie bandomosios cheminės medžiagos tirpumą ir patvarumą yra neapibrėžti, šias savybes rekomenduojama įvertinti bandymo sąlygomis, t. y. bandymui naudotos auginimo terpės, temperatūros, apšvietimo režimo sąlygomis.

7. Bandymo terpės pH kontrolė yra ypač svarbi, pvz., kai bandomi metalai arba cheminės medžiagos, kurios yra nestabilios dėl hidrolizės. Kiti nurodymai, kaip bandyti chemines medžiagas, kurių fizikinės ir cheminės savybės apsunkina šią užduotį, pateikti EBPO rekomendaciniame dokumente (5).

BANDYMO TINKAMUMAS

8. Bandymo tinkamumui patvirtinti kontrolinio ėminio pagrindinio ūglio ilgio dvigubėjimo trukmė turi būti trumpesnė kaip 14 parų. Šiame bandymų metode aprašytomis terpių ir bandymo sąlygomis šį kriterijų galima atitikti naudojant statinio ar pusiau statinio bandymo režimą.

9. Kontrolinių kultūrų kartotinių ėminių išeigos, pagrįstos ūglių žaliosios medžiagos masės matavimais (t. y. nuo bandymo pradžios iki jo pabaigos) ir papildomais matuojamais kintamaisiais (žr. 37 pastraipą), vidutinis variacijos koeficientas yra ne didesnis kaip 35 %.

10. Visą 14 parų veikimo laikotarpį daugiau kaip 50 % kontrolinės grupės kartotinių ėminių laikoma steriliomis sąlygomis, kurios reiškia, kad nėra matomos taršos kitais organizmais, pvz., dumbliais, grybeliais ir bakterijomis (skaidrus tirpalas). *Pastaba*. Nurodymai dėl sterilumo vertinimo pateikti tarplaboratorinio tyrimo ataskaitoje (4).

ETALONINĖ CHEMINĖ MEDŽIAGA

11. Galima bandyti etaloninę (-es) cheminę (-es) medžiagą (-as), pvz., 3,5-dichlorfenolį, naudotą atliekant tarplaboratorinį tyrimą (4), kaip priemonę bandymo procedūrai patikrinti; pagal tarplaboratorinio tyrimo duomenis 3,5-dichlorfenolio vidutinė EC_{50} vertė, gauta skirtingiems atsako kintamiesiems (žr. šio bandymų metodo 37–41 pastraipą), yra nuo 3,2 mg/l iki 6,9 mg/l (šių verčių pasikliovimo intervalo duomenys pateikti tarplaboratorinio tyrimo ataskaitoje). Patartina etaloninę cheminę medžiagą bandyti bent du kartus per metus arba vienu metu su bandomosios cheminės medžiagos toksiškumo nustatymu, jei bandymai atliekami rečiau.

▼M7

METODO APRAŠYMAS

Aparatūra

12. Visa įranga, kuri liečiasi su bandymo terpe, turėtų būti pagaminta vien tik iš stiklo arba kitos chemiškai inertinės medžiagos. Stikliniai indai, skirti kultūroms auginti ir bandymams atlikti, turėtų būti išvalyti nuo cheminių medžiagų priemaišų, kurios galėtų būti išplautos į bandymo terpę, ir jie turėtų būti sterilūs. Bandymo indai turėtų būti pakankamai ilgi, kad kontrolinių ėminių indų ūgliai galėtų augti vandeninėje fazėje ir bandymo pabaigoje nepasiektų bandymo terpės paviršiaus. Rekomenduojama naudoti aliuminio dangteliais uždengiamus storasienius borosilikatinio stiklo mėgintuvėlius be snapelių, kurių vidinis skersmuo būtų apie 20 mm, ilgis – apie 250 mm.

13. Kadangi modifikuota Andrews terpė turi sacharozės (kuri skatina grybelių ir bakterijų augimą), bandymo tirpalai turi būti ruošiami sterilumo sąlygomis. Visus skysčius ir visą įrangą prieš naudojant reikia sterilizuoti. Sterilizuojama 4 h apdorojant karštu oru (210 °C) arba 20 min autoklave 121 °C temperatūroje. Be to, visos kolbos, lėkštės, dubenys ir kita įranga prieš pat naudojimą apdorojami liepsna ant sterilaus darbastalio.

14. Kultūros ir bandymo indai neturėtų būti laikomi kartu. Geriausia tai būtų pasiekti naudojant atskiras klimatines auginimo kameras, inkubatorius arba patalpas. Turėtų būti įmanoma kontroliuoti ir užtikrinti pastovaus lygio apšvietimą ir temperatūrą.

Bandymo organizmas

15. Varpotoji plunksnalapė *Myriophyllum spicatum* – po vandeniu augantis plunksnalapių šeimos dviskiltis augalas. Neryškios rožinės spalvos gėlės pasirodo virš vandens paviršiaus nuo birželio iki rugpjūčio mėnesio. Augalai turi į gruntą įleidžiamą tvirtą šakniastiebių sistemą, jų galima rasti viso šiaurės pusrutulio eutrofiniuose, bet ne užterštuose ir daugiau kalkėtuose stovinčio vandens telkiniuose su dumblo substratu. *Myriophyllum spicatum* labiau patinka gėlas vanduo, bet augalų randama ir sūrokame vandenyje.

16. Atliekant toksiškumo bandymą sistemoje be nuosėdų, reikia naudoti sterilius augalus. Jei bandymų laboratorija neturi nuolat auginamų *Myriophyllum spicatum* kultūrų, sterilią augalinę medžiagą galima gauti iš kitos laboratorijos arba (nesterili) augalinė medžiaga gali būti paimta iš lauko arba gauta iš privataus tiekėjo; jei naudojami laukiniai augalai, reikėtų numatyti taksonominį rūšies patikrinimą. Jei kultūra renkama lauke arba gaunama iš privataus tiekėjo, augalus reikėtų sterilizuoti (1) ir ne trumpiau kaip aštuonias savaites prieš bandymą reikėtų laikyti toje pačioje terpėje, kuri naudojama bandymams. Pradinėms kultūroms rinkti naudojamose lauko vietose neturi būti akivaizdžių užkrėtimo šaltinių. Reikėtų imtis visų atsargumo priemonių, kurios padėtų užtikrinti, kad lauko sąlygomis būtų renkama tinkama *Myriophyllum spicatum* rūšis, ypač tuose regionuose, kuriuose ji gali kryžmintis su kitomis *Myriophyllum* rūšimis. Jei kultūros gaunamos iš kitos laboratorijos, jos turėtų būti panašiai laikomos bent tris savaites. Ataskaitoje turėtų būti visuomet nurodytas bandymams naudojamos augalinės medžiagos šaltinis ir rūšis.

17. Bandymui naudojamų augalų kokybė ir vienodumas darys didelę įtaką bandymo rezultatui, todėl jie turėtų būti kruopščiai atrenkami. Turėtų būti naudojami jauni, greitai augantys augalai, neturintys matomų pažeidimų arba spalvos pokyčio (chlorozės). Išsami informacija apie bandymo organizmo paruošimą pateikta 4 priedėlyje.

Auginimas

18. Siekiant sumažinti kultūros priežiūros dažnumą (pvz., jei tam tikrą laiką neplanuojama atlikti bandymo su *Myriophyllum*), kultūras galima laikyti esant sumažintam apšvietimui ir žemesnėje temperatūroje (50 μE $m^{0\ 2}\ s^{-1}$, 20 ± 2 °C). Išsami informacija apie kultūros auginimą pateikta 3 priedėlyje.

▼M7

19. Ne vėliau kaip 14–21 parą prieš bandymą pakankamas sterilių bandymo organizmų kiekis steriliai pernešamas į naują sterilią terpę, kurioje kultūra auginama bandymo sąlygomis 14–21 parą. Išsami informacija apie iš anksto ruošiamos kultūros paruošimą pateikta 4 priedėlyje.

Bandymo terpė

20. Bandymo sistemai be nuosėdų rekomenduojama tik viena *Myriophyllum spicatum* skirta mitybinė terpė, aprašyta 2 priedėlyje. *Myriophyllum spicatum* auginti ir bandyti rekomenduojama modifikuota Andrews terpė, aprašyta (1). Modifikuota Andrews terpė gaunama iš penkių atskirai paruoštų mitybinių pradinių tirpalų, pridedant 3 % sacharozės. Išsami informacija apie terpės paruošimą pateikta 2 priedėlyje.

21. Dešimteriopos koncentracijos modifikuota Andrews terpė reikalinga bandymo tirpalams gauti (tinkamai atskiedžiant). Šios terpės sudėtis pateikta 2 priedėlyje.

Bandymo tirpalai

22. Bandymo tirpalai paprastai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Bandomosios cheminės medžiagos pradiniai tirpalai paprastai ruošiami cheminę medžiagą tirpinant demineralizuotame (t. y. distiliuotame arba dejonizuotame) vandenyje. Maistinėmis medžiagomis papildoma naudojant dešimteriopos koncentracijos modifikuotą Andrews terpę.

23. Bandomosios cheminės medžiagos pradinius tirpalus galima sterilizuoti 20 min autoklave 121 °C temperatūroje arba atliekant sterilųjį filtravimą, jei sterilizavimo metodas nepakeičia bandomosios cheminės medžiagos natūralių savybių. Bandymo tirpalus taip pat galima paruošti steriliomis sąlygomis steriliame demineralizuotame vandenyje arba terpėje. Renkantis bandomosios cheminės medžiagos pradinių tirpalų sterilizavimo procedūrą, reikėtų atsižvelgti į jos terminį stabilumą ir adsorbciją ant įvairių paviršių. Dėl tos priežasties pradinius tirpalus rekomenduojama ruošti steriliame vandenyje ir steriliomis sąlygomis, t. y. naudojant sterilias priemones bandomajai cheminei medžiagai tirpinti steriliomis sąlygomis (pvz., sterilizuoti liepsna, naudoti laminarinius boksus ir kt.). Šis sterilių pradinių tirpalų ruošimo metodas tinka cheminėms medžiagoms ir mišiniams.

24. Didžiausia bandyta bandomosios cheminės medžiagos koncentracija paprastai neturėtų būti didesnė nei koncentracija, atitinkanti jos tirpumą vandenyje bandymo sąlygomis. Jei bandomosios cheminės medžiagos mažai tirpsta vandenyje, koncentruotą pradinį tirpalą arba cheminės medžiagos dispersiją gali tekti ruošti naudojant organinį tirpiklį arba dispergentą, kad būtų lengviau įterpti tikslius bandomosios cheminės medžiagos kiekius į bandymo terpę ir palengvinti jos dispergavimą ir tirpinimą. Reikia kiek įmanoma vengti naudoti tokias medžiagas. Neturi būti fitotoksiškumo dėl tokių pagalbinių tirpiklių arba dispergentų naudojimo. Pvz., dažniausiai naudojami tirpikliai, kurie nesukelia fitotoksiškumo, kai jų koncentracija ne didesnė kaip 100 µl/l, yra acetonas ir dimetilformamidas. Jei naudojamas tirpiklis arba dispergentas, jo galutinė koncentracija turėtų būti nurodyta ataskaitoje ir būti kuo mažesnė ($\leq$ 100 µl/l), be to, tirpiklio arba dispergento koncentracija turėtų būti vienoda visuose apdorotuose ir kontroliniuose ėminiuose. Papildomi nurodymai dėl dispergentų naudojimo pateikti (5).

Bandymo ir kontrolinių ėminių grupės

25. Išankstiniai bandomosios cheminės medžiagos toksiškumo *Myriophyllum spicatum* duomenys, gauti atliekant intervalo nustatymo bandymą, padėtų pasirinkti tinkamas bandymo koncentracijos vertes. Atliekant galutinį toksiškumo bandymą, paprastai turėtų būti nuo penkių (kaip atliekant *Lemna* augimo slopinimo bandymą, šio priedo C.26 skyrius) iki septynių koncentracijos verčių, išdėstytų geometrine progresija; jas reikėtų pasirinkti taip, kad

▼M7

NOEC ir EC_{50} vertės patektų į šio koncentracijos verčių intervalą (žr. toliau). Pageidautina, kad bandymo koncentracijos verčių skirtumo faktorius būtų ne didesnis kaip 3,2, bet ši vertė gali būti didesnė, jei koncentracijos ir atsako priklausomybės kreivė yra gulsčia. Reikėtų pagrįsti mažesnio nei penkių koncentracijos verčių skaičiaus naudojimą. Kiekvienai koncentracijai turėtų būti naudojami bent penki kartotiniai ėminiai.

26. Nustatant bandymo koncentracijos verčių intervalą (intervalo nustatymo ir (arba) galutinio toksiškumo bandymo), reikėtų atsižvelgti į šias aplinkybes:

Norint nustatyti EC_x vertę, ji turėtų būti tarp bandymo koncentracijos verčių reikiamam pasikliovimo lygiui užtikrinti. Pvz., jei įvertinama EC_{50}, didžiausia bandymo koncentracija turėtų būti didesnė nei EC_{50} vertė. Jei EC_{50} vertė yra už bandymo koncentracijos verčių intervalo ribų, susiję pasikliovimo intervalai bus dideli ir gali būti neįmanomas tinkamas statistinio modelio atitikties vertinimas.

Jei reikia įvertinti LOEC ir (arba) NOEC, mažiausia bandymo koncentracija turėtų būti pakankamai maža, kad augimas nebūtų gerokai mažesnis nei kontroliniuose ėminiuose. Be to, didžiausia bandymo koncentracija turėtų būti gana didelė, kad augimas būtų gerokai mažesnis nei kontroliniuose ėminiuose. Jei taip nėra, bandymą reikės pakartoti taikant kitą koncentracijos verčių intervalą (išskyrus kai didžiausia koncentracija atitinka ribinę tirpumo vandenyje koncentraciją arba didžiausią reikiamą ribinę koncentraciją, pvz., 100 mg/l).

27. Į kiekvieną bandymą reikėtų įtraukti kontrolinius ėminius, kuriuos sudaro ta pati kaip bandymo indų mitybinė terpė, bandymo organizmas (pasirenkant kiek įmanoma labiau vienalytę augalinę medžiagą, žalias iš anksto paruoštų kultūrų šonines šakas, sutrumpintas iki 2,5 cm nuo pagrindo), aplinkos sąlygos ir procedūros, bet be bandomosios cheminės medžiagos. Jei naudojamas pagalbinis tirpiklis arba dispergentas, reikėtų įtraukti papildomą kontrolinį ėminį, turintį tirpiklio ir (arba) dispergento, kurių koncentracija atitiktų naudojamą induose su bandomąja chemine medžiaga. Kartotinių kontrolinių ėminių indų skaičius (ir tirpiklio indų, jei taikoma) turėtų būti ne mažiau kaip dešimt.

28. Jei nereikia nustatyti NOEC, bandymo schema gali būti pakeista padidinant koncentracijos verčių skaičių ir sumažinant kiekvienos bandymo koncentracijos kartotinių ėminių skaičių. Tačiau visais atvejais kartotinių kontrolinių ėminių skaičius turėtų būti ne mažesnis kaip dešimt.

Veikimas bandomąja medžiaga

29. Žalios iš anksto paruoštos kultūros šoninės šakos, sutrumpintos iki 2,5 cm atstumu nuo pagrindo, atsitiktinai paskirstomos tarp bandymo indų steriliomis sąlygomis; kiekviename bandymo inde turėtų būti viena 2,5 cm ilgio šoninė šaka, kuri viename gale turėtų viršūninę meristemą. Pasirinkta augalinė medžiaga turėtų būti vienodos kokybės visuose bandymo induose.

30. Reikia taikyti atsitiktinio bandymo indų išdėstymo inkubatoriuje schemą, siekiant kiek įmanoma sumažinti padėties erdvėje, šviesos intensyvumo arba temperatūros skirtumų įtaką. Taip pat reikėtų taikyti blokinę schemą arba atsitiktinį indų vietos pakeitimą (arba dažnesnį vietos pakeitimą), kai atliekami stebėjimai.

31. Jei parengiamasis stabilumo bandymas rodo, kad neįmanoma užtikrinti bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos visą bandymo trukmę (14 parų) (t. y. išmatuotoji koncentracija sumažėja iki mažesnės nei 80 % išmatuotos pradinės koncentracijos), rekomenduojamas pusiau statinis bandymo

▼M7

režimas. Šiuo atveju bent kartą bandymo laikotarpiu (pvz., 7 parą) augalus reikėtų veikti tik ką paruoštais bandymo ir kontrolinių ėminių tirpalais. Veikiamosios terpės keitimo į naują terpę dažnumas priklausys nuo bandomosios cheminės medžiagos stabilumo; dažniau gali tekti keisti labai nepatvarių arba lakiųjų cheminių medžiagų tirpalus, siekiant užtikrinti beveik pastovias koncentracijos vertes.

32. Veikimo per lapus (purškiant) scenarijus pagal šį bandymų metodą netaikomas.

Bandymo sąlygos

33. Reikėtų naudoti šiltą ir (arba) šaltą baltos spalvos fluorescencinių lempų apšvietimą, kurio energinė apšvieta būtų apie 100–150 μE m^{-2} s^{-1}, kai matuojama kaip aktyvioji fotosintezės spinduliuotė (400–700 nm) vienodu atstumu nuo šviesos šaltinio, pvz., bandymo indų apačioje (atitinka maždaug 6 000–9 000 liuksų), ir taikomas šviesos bei tamsos 16:8 h ciklas. Šviesos aptikimo ir matavimo metodas, ypač jutiklio tipas, turės įtakos išmatuotai vertei. Sferiniai jutikliai (kurie reaguoja į šviesą, krintančią iš visų kampų aukščiau ir žemiau matavimo plokštumos) ir „kosinusiniai“ jutikliai (kurie reaguoja į šviesą, krintančią iš visų kampų aukščiau matavimo plokštumos) yra geresni nei vienos krypties jutikliai, ir šiame bandyme aprašytam daugiataškio šviesos šaltinio tipui bus gaunami didesni rodmenys.

34. Temperatūra bandymo induose turėtų būti 23 ± 2 °C. Reikia imtis papildomų atsargumo priemonių dėl pH kitimo atskirais atvejais, pvz., bandant nepatvarias chemines medžiagas arba metalus; pH visą laiką turėtų būti 6–9 intervale. Papildomi nurodymai pateikti (5).

Trukmė

35. Bandymas baigiamas praėjus 14 parų nuo augalų pernešimo į bandymo indus.

Matavimai ir analiziniai nustatymai

36. Bandymo organizmo pagrindinio ūglio ilgis bandymo pradžioje yra 2,5 cm (žr. 29 pastraipą); jis matuojamas su liniuote (žr. 4 priedėlį) arba darant nuotraukas ir atliekant vaizdų analizę. Tai, ar bandymo organizmo pagrindinio ūglio ilgis yra normalus ar nenormalus, turi būti nustatyta bandymo pradžioje, taip pat bent vieną kartą per 14 parų veikimo laikotarpį ir bandymo pabaigoje. Pastaba. Tie, kurie neturi vaizdo analizės sistemos, kaip alternatyvą gali naudoti sterilią liniuotę pagrindinio ūglio ilgiui matuoti bandymo pradžioje ir bandymo metu, jei, prieš dedant augalus į bandymo indus, darbastalis yra sterilizuotas. Turėtų būti pažymėti augalų vystymosi pokyčiai, pvz., ūglių deformacija, išvaizda, nekrozės, chlorozės, smulkėjimo arba plūdrumo netekimo požymiai, šaknų ilgis ir išvaizda. Be to, reikėtų pažymėti reikšmingas bandymo terpės savybes (pvz., neištirpusios medžiagos buvimą, dumblių, grybelių ir bakterijų augimą bandymo inde).

37. Be pagrindinio ūglio ilgio nustatymo atliekant bandymą, taip pat reikėtų įvertinti bandomosios cheminės medžiagos poveikį trim (arba daugiau) iš šių matuojamų kintamųjų:

i. bendram šoninių šakų ilgiui;

ii. bendram ūglių ilgiui;

iii. bendram šaknų ilgiui;

iv. žaliosios medžiagos masei;

v. sausos medžiagos masei;

vi. žiedų vainikų skaičiui.

▼M7

1 pastaba. Stebėjimai atliekant intervalo nustatymo bandymą gali padėti pasirinkti reikiamus papildomus matavimus iš šešių pirmiau išvardytų kintamųjų.

2 pastaba. Ypač pageidautina, kad būtų nustatyta žaliosios ir sausos medžiagos masė (iv ir v parametrai).

3 pastaba. Atsižvelgiant į tai, kad sacharozė ir šviesa (dėl šaknų ekspozicijos šviesai bandymo metu) gali turėti įtakos auksino (augalų augimo hormono) pernešėjams ir kad kai kurių cheminių medžiagų veikimo mechanizmas gali būti panašus į auksino, šaknų vertinamųjų baigčių (iii parametro) įtraukimas kelia abejonių.

4 pastaba. Tarplaboratorinio tyrimo rezultatai rodo, kad bendro šoninių šakų ilgio (i parametro) variacijos koeficientai yra labai dideli (> 60 %). Bendras šoninių šakų ilgis yra bet kuriuo atveju įtrauktas į bendro ūglių ilgio matmenį (ii parametrą), kuriam gaunami labiau priimtini < 30 % variacijos koeficientai.

5 pastaba. Atsižvelgiant į pirmiau pateiktus argumentus, rekomenduojamos šios pagrindinės matavimų vertinamosios baigtys: bendras ūglių ilgis, žaliosios ir sausos medžiagos masė (ii, iv ir v parametrai); vi parametras, žiedų vainikų skaičius paliekamas bandytojo nuožiūrai.

38. Pirmenybė teikiama pagrindinio ūglio ilgiui ir žiedų vainikų skaičiui, nes juos galima nustatyti kiekviename bandymo ir kontrolinio ėminio inde bandymo pradžioje, jo metu ir bandymą baigus, darant nuotraukas ir atliekant vaizdų analizę, nors taip pat galima naudoti (sterilią) liniuotę.

39. Bendras šoninių šakų ilgis, bendras šaknų ilgis (kaip visų šoninių šakų ar šaknų ilgio suma) ir bendras ūglių ilgis (kaip pagrindinio ūglio ilgio ir visų šoninių šakų ilgio suma) gali būti išmatuotas liniuote veikimo pabaigoje.

40. Žaliosios ir (arba) sausos medžiagos masę reikėtų nustatyti bandymo pradžioje, imant bandymui pradėti naudojamos iš anksto paruoštos kultūros reprezentatyvųjį ėminį ir bandymo pabaigoje nustatant kiekvieno bandymo ir kontrolinio ėminio indo augalinės medžiagos masę.

41. Bendras šoninių šakų ilgis, bendras ūglių ilgis, bendras šaknų ilgis, žaliosios medžiagos masė, sausos medžiagos masė ir žiedų vainikų skaičius gali būti nustatytas taip:

i. bendras šoninių šakų ilgis: šoninių šakų ilgis gali būti nustatytas liniuote matuojant visas šonines šakas veikimo pabaigoje. Bendras šoninių šakų ilgis yra kiekvieno bandymo ir kontrolinio ėminio indo visų šoninių šakų ilgio suma;

ii. bendras ūglių ilgis: pagrindinio ūglio ilgis gali būti nustatytas atliekant vaizdo analizę arba matuojant liniuote. Bendras ūglių ilgis yra kiekvieno bandymo ir kontrolinio ėminio indo visų šoninių šakų ilgio ir pagrindinio ūglio ilgio veikimo pabaigoje suma;

iii. bendras šaknų ilgis: šaknų ilgis gali būti nustatytas liniuote matuojant visas šonines šakas veikimo pabaigoje. Bendras šaknų ilgis yra kiekvieno bandymo ir kontrolinio ėminio indo visų šoninių šakų ilgio suma;

iv. žaliosios medžiagos masė: žaliosios medžiagos masė gali būti nustatyta pasveriant bandymo organizmus veikimo pabaigoje. Visa kiekvieno bandymo bei kontrolinio ėminio indo augalinė medžiaga plaunama distiliuotu vandeniu ir sausai nušluostoma popieriumi iš celiuliozės. Taip

▼M7

paruoštos žaliosios medžiagos masė nustatoma sveriant. Pradinis biomasės kiekis (žaliosios medžiagos masė) nustatomas sveriant bandymo organizmų ėminį, paimtą iš tos pačios partijos, kurios sėjinukai buvo dedami į bandymo indus;

v. sausos medžiagos masė: po paruošiamųjų darbų žaliosios medžiagos masei nustatyti bandymo organizmai džiovinami 60 °C temperatūroje iki pastoviosios masės. Ši masė yra sausos medžiagos masė. Pradinis biomasės kiekis (sausos medžiagos masė) nustatomas sveriant bandymo organizmų ėminį, paimtą iš tos pačios partijos, kurios sėjinukai buvo dedami į bandymo indus;

vi. žiedų vainikų skaičius: suskaičiuojami visi žiedų vainikai išilgai pagrindinio ūglio.

Matavimų ir analizinių nustatymų dažnumas

42. Jei taikoma statinio bandymo schema, kiekvieno apdoroto ėminio pH vertė turėtų būti matuojama bandymo pradžioje ir pabaigoje. Jei taikoma pusiau statinio bandymo schema, turėtų būti matuojama kiekvienos „naujos“ bandymo tirpalo partijos pH vertė prieš kiekvieną atnaujinimą ir dar atitinkamo „panaudoto“ tirpalo pH vertė.

43. Šviesos intensyvumas turėtų būti matuojamas tose auginimo kameros, inkubatoriaus arba patalpos vietose, kurios yra pusiaukelėje tarp šviesos šaltinio ir bandymo organizmų. Matuojama bent vieną kartą bandymo laikotarpiu. Terpės temperatūra pakaitiniame inde, kuris laikomas tokiomis pačiomis auginimo kameros, inkubatoriaus arba patalpos sąlygomis, turėtų būti registruojama bent kartą per dieną (arba nuolat duomenų registravimo įtaisu).

44. Bandomosios (-ųjų) cheminės (-ių) medžiagos (-ų) koncentracijos vertės nustatomos bandymo metu reikiamu dažnumu. Atliekant statinius bandymus, koncentraciją reikia matuoti bent bandymo pradžioje ir pabaigoje.

45. Atliekant pusiau statinius bandymus, kai nesitikima, kad bandomosios (-ųjų) cheminės (-ių) medžiagos (-ų) koncentracijos vertės galėtų visą laiką būti lygios nominaliajai koncentracijai ± 20 %, būtina analizuoti visus naujai paruoštus bandymo tirpalus ir tuos pačius tirpalus kiekvieno atnaujinimo momentu. Tačiau atliekant tuos bandymus, kurių išmatuota pradinė bandomosios (-ųjų) cheminės (-ių) medžiagos (-ų) koncentracija neatitinka nominaliosios koncentracijos ± 20 % verčių, bet galima pateikti pakankamai įrodymų, kad pradinės koncentracijos vertės yra pakartojamos ir stabilios (t. y. yra lygios 80–120 % pradinės koncentracijos), galima nustatyti tik didžiausią ir mažiausią bandymo koncentraciją. Visais atvejais bandymo koncentracijos vertes reikia nustatyti tik viename kiekvienos bandymo koncentracijos kartotinio ėminio inde (arba analizuoti sujungtų kartotinių ėminių turinį).

46. Jei yra įrodymų, kad visą bandymo trukmę galima patenkinamai užtikrinti nominaliąją ar išmatuotą pradinę koncentraciją ± 20 % tikslumu, rezultatų analizė gali būti pagrįsta nominaliomis ar išmatuotomis pradinėmis vertėmis. Jei nuokrypis nuo nominaliosios arba išmatuotos pradinės koncentracijos yra didesnis kaip ± 20 %, rezultatų analizę reikėtų pagrįsti veikimo laikotarpio koncentracijos geometriniu vidurkiu arba reikėtų taikyti modelius, kurie apibūdintų bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos mažėjimą (5).

Ribinis bandymas

47. Kai kuriomis aplinkybėmis, pvz., kai parengiamasis bandymas rodo, kad toksinio poveikio nėra, jei bandomosios cheminės medžiagos koncentracija yra mažesnė kaip 100 mg/l arba mažesnė kaip jos tirpumo bandymo terpėje ribinė koncentracija ar preparatų dispersijos ribinė koncentracija, galima atlikti ribinį bandymą, lyginant kontrolinės grupės ir vienos apdorotų ėminių

▼M7

grupės (100 mg/l arba tirpumo ribinei vertei lygios koncentracijos) atsakus. Labai rekomenduojama, kad jis būtų patvirtintas analizuojant veikimo koncentraciją. Ribiniam bandymui taikomos visos anksčiau aprašytos bandymo sąlygos ir tinkamumo kriterijai, išskyrus tai, kad kartotinių apdorotų ėminių turėtų būti du kartus daugiau. Augimą kontrolinių ir apdorotų ėminių grupėse galima analizuoti taikant statistinį kriterijų, pvz., Stjudento t kriterijų, vidurkiams palyginti.

DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS

Atsako kintamieji

48. Bandymo tikslas – nustatyti bandomosios cheminės medžiagos poveikį *Myriophyllum spicatum* vegetatyviniam augimui. Šiame bandymų metode aprašyti du atsako kintamieji.

a) Vidutinis savitasis augimo greitis: šis atsako kintamasis yra apskaičiuojamas pagal kontrolinių ėminių ir kiekvienos apdorotų ėminių grupės pagrindinio ūglio ilgio logaritmo, be to, kitų matuojamų parametrų, t. y. bendro ūglių ilgio, žaliosios medžiagos masės, sausos medžiagos masės arba žiedų vainikų skaičiaus laikinį kitimą (išreiškiamą parai). Pastaba. ei matavimo parametrai yra bendras šoninių šakų ilgis ir bendras šaknų ilgis, jų vidutinio savitojo augimo greičio išmatuoti negalima. Bandymo pradžioje bandomasis organizmas neturi šoninių šakų ir jokių šaknų (taip yra todėl, kad ruošiama imant iš anksto paruoštą kultūrą); vidutinio savitojo augimo greičio skaičiavimas nuo nulinės vertės nėra apibrėžtas.

b) Išeiga: šis atsako kintamasis yra apskaičiuojamas pagal kontrolinių ėminių ir kiekvienos bandymo grupės ėminių pagrindinio ūglio ilgio pokytį, be to, pagal kitų matuojamų parametrų, t. y. bendro ūglių ilgio, kaip pageidautino parametro, žaliosios medžiagos masės, sausos medžiagos masės arba žiedų vainikų skaičiaus, pokytį bei kitų parametrų, jei manoma, kad tai būtų naudinga, pokytį iki bandymo pabaigos.

49. Toksiškumo įverčius reikėtų pagrįsti pagrindinio ūglio ilgiu ir trimis papildomais matuojamais kintamaisiais (t. y. bendru ūglių ilgiu, kaip pageidautinu parametru, žaliosios medžiagos mase, sausos medžiagos mase arba žiedų vainikų skaičiumi, žr. 37 pastraipą ir jos 2, 4 ir 5 pastabas), nes kai kurių cheminių medžiagų įtaka kitiems matuojamiems kintamiesiems gali būti didesnė nei pagrindinio ūglio ilgiui. Šis poveikis nebūtų aptiktas apskaičiuojant vien tik pagrindinio ūglio ilgį.

Vidutinis savitasis augimo greitis

50. Kontrolinių ir apdorotų grupių kiekvieno kartotinio ėminio vidutinis savitasis augimo greitis tam tikru laikotarpiu apskaičiuojamas kaip augimo kintamųjų – pagrindinio ūglio ilgio ir trijų papildomų matuojamų kintamųjų (t. y. bendro ūglių ilgio, žaliosios medžiagos masės, sausos medžiagos masės ar žiedų vainikų skaičiaus) logaritminis padidėjimas taikant šią formulę:

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

čia:

μ_{i-j} vidutinis savitasis augimo greitis per laiką nuo i iki j;

N_i bandymo arba kontrolinio indo matuojamas kintamasis laiko momentu i;

N_j bandymo arba kontrolinio indo matuojamas kintamasis laiko momentu j;

t laikotarpis nuo i iki j.

▼M7

Kiekvienai apdorotų ir kontrolinių ėminių grupei apskaičiuojama augimo greičio vidutinė vertė ir dispersijos įverčiai.

51. Turėtų būti apskaičiuotas viso bandymo laikotarpio (pirmiau pateiktoje formulėje i yra bandymo pradžios laikas, j – bandymo pabaigos laikas) vidutinis savitasis augimo greitis. Kiekvienai bandymo koncentracijai ir kontroliniam ėminiui apskaičiuojama vidutinio savitojo augimo greičio vidutinė vertė ir dispersijos įverčiai. Be to, turėtų būti įvertintas augimo greitis atskirais laikotarpiais, kad būtų galima įvertinti bandomosios cheminės medžiagos poveikį veikimo laikotarpiu (pvz., nagrinėjant logaritmines augimo kreives).

52. Kiekvienos bandymo koncentracijos (apdorotų ėminių grupės) augimo greičio mažėjimas procentais (I_r) gali būti apskaičiuotas pagal šią lygtį:

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

čia:

$\%\ I_r$ vidutinio savitojo augimo greičio mažėjimas procentais;

μC kontrolinio ėminio vidutinė μ vertė;

μT apdorotų ėminių grupės μ vidutinė vertė.

Išeiga

53. Poveikis išeigai nustatomas kiekvienam bandymo indui pagal bandymo pradžioje ir pabaigoje matuojamą kintamąjį – pagrindinio ūglio ilgį ir tris papildomus matuojamus kintamuosius (t. y. bendrą ūglių ilgį, kaip pageidautiną parametrą, žaliosios medžiagos masę, sausos medžiagos masę arba žiedų vainikų skaičių). Jei matuojama žaliosios medžiagos masė ar sausos medžiagos masė, pradinis biomasės kiekis nustatomas sveriant bandymo organizmų ėminį, paimtą iš tos pačios partijos, kurios sėjinukai buvo dedami į bandymo indus. Kiekvienai bandymo koncentracijai ir kontroliniam ėminiui apskaičiuojama išeigos vidutinė vertė ir dispersijos įverčiai. Kiekvienos apdorotų ėminių grupės vidutinį išeigos mažėjimą procentais (% I_y) galima apskaičiuoti taip:

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

čia:

% I_y išeigos mažėjimas procentais;

b_C kontrolinių ėminių grupės galutinės ir pradinės biomasės skirtumas;

b_T apdorotų ėminių grupės galutinės ir pradinės biomasės skirtumas.

Dvigubėjimo trukmė

54. Norint nustatyti pagrindinio ūglio ilgio dvigubėjimo trukmę (T_d) ir atitiktį šiam tinkamumo kriterijui (žr. 8 pastraipą), gautiems kontrolinių ėminių duomenims taikoma ši formulė:

$T_d = \ln 2/\mu$,

kurioje μ yra vidutinis savitasis augimo greitis, nustatytas kaip aprašyta 50–52 pastraipose.

▼M7

Koncentracijos ir atsako priklausomybės kreivių gavimas

55. Reikėtų gauti koncentracijos ir atsako kreives, kurios susieja atsako kintamojo vidutinį mažėjimą procentais (I_r ar I_y, apskaičiuotą, kaip nurodyta 53 pastraipoje) ir bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos logaritmą.

EC_x įvertinimas

56. EC_x įverčius reikėtų gauti pagal vidutinį savitąjį augimo greitį (E_rC_x) ir išeigą (E_yC_x), kurių kiekvieną reikėtų gauti pagal pagrindinio ūglio ilgį ir, galbūt, pagal papildomus matuojamus kintamuosius (t. y. bendrą ūglių ilgį, kaip pageidautiną parametrą, žaliosios medžiagos masę, sausos medžiagos masę ar žiedų vainikų skaičių). Tai daroma dėl tos priežasties, kad yra bandomųjų cheminių medžiagų, kurios skirtingai veikia pagrindinio ūglio ilgį ir kitus matuojamus kintamuosius. Todėl reikiami toksiškumo parametrai yra kiekvienam slopinimo lygiui x apskaičiuotos keturios EC_x vertės: E_rC_x (pagrindinio ūglio ilgio); E_rC_x (t. y. bendro ūglių ilgio, kaip pageidautino parametro, žaliosios medžiagos masės, sausos medžiagos masės ar žiedų vainikų skaičiaus); E_yC_x (pagrindinio ūglio ilgis) ir E_yC_x (t. y. bendro ūglių ilgio, kaip pageidautino parametro, žaliosios medžiagos masės, sausos medžiagos masės ar žiedų vainikų skaičiaus).

57. Reikėtų pažymėti, kad negalima lyginti EC_x verčių, apskaičiuotų taikant šiuos du atsako kintamuosius, ir į šį skirtumą atsižvelgiama naudojant bandymo rezultatus. Jei laikomasi šio bandymų metodo sąlygų, EC_x vertės, gautos pagal savitąjį augimo greitį (E_rC_x), paprastai bus didesnės nei išeiga pagrįsti rezultatai (E_yC_x, dėl atitinkamo metodo matematinio pagrindimo. Tai reikėtų aiškinti kaip dviejų atsako kintamųjų jautrio skirtumą, tiesiog vertės skiriasi matematiškai.

Statistinės procedūros

58. Tikslas – gauti kiekybinę koncentracijos ir atsako priklausomybę, taikant regresinę analizę. Galima taikyti svertinę tiesinę regresiją, atlikus atsako duomenų tiesinamąjį transformavimą, pvz., taikant probit, logit arba Weibullo modelius (7), bet geresnės yra netiesinės regresijos metodų procedūros, kurias taikant geriau apdorojami neišvengiami duomenų netolygumai ir nukrypimai nuo tolygiųjų skirstinių. Artėjant į nulinį arba visišką slopinimą, tokie netolygumai dėl transformavimo gali padidėti ir trukdyti analizei (7). Reikėtų pažymėti, kad tipiniai analizės metodai, taikant probit, logit arba Weibullo transformaciją, yra skirti dichotominiams (pvz., mirtingumas arba išgyvenamumas) duomenims ir turėtų būti modifikuojami, norint juos pritaikyti augimo arba išeigos duomenims. Specifinės EC_x verčių nustatymo pagal tolydžiuosius duomenis procedūros pateiktos (8)(9) ir (10).

59. Kiekvienam analizuojamam atsako kintamajam naudojama koncentracijos ir atsako priklausomybė EC_x verčių taškiniams įverčiams apskaičiuoti. Kai įmanoma, turėtų būti nustatytos kiekvieno įverčio 95 % pasikliovimo ribos. Atsako duomenų suderintumas su regresijos modeliu turėtų būti įvertintas grafiškai arba statistiškai. Regresinė analizė turėtų būti atliekama naudojant atskirus kartotinių ėminių atsakus, bet ne apdorotų ėminių grupių vidurkius.

60. Be to, jei turimi regresijos modeliai ar metodai netinka duomenims, EC_{50} įverčiai ir pasikliovimo ribos gali būti gautos taikant tiesinį interpoliavimą su saviranka (įkėla) (10).

61. Norint įvertinti LOEC, taigi ir NOEC, reikia palyginti apdorotų ėminių vidutines vertes, taikant dispersinės analizės (ANOVA) metodus. Tuomet kiekvienai koncentracijai gautas vidurkis lyginamas su kontrolinio ėminio vidurkiu, taikant atitinkamą kartotinių palyginimų arba tendencijų kriterijaus metodą. Gali būti naudingas Dunnett arba Williams kriterijus (12)(13)(14)(15)(16). Būtina įvertinti, ar galioja ANOVA dispersijos vienalytiškumo prielaida. Šį įvertinimą galima atlikti grafiškai arba taikant formalųjį kriterijų (15). Tinkami kriterijai yra Levene arba Bartlett kriterijai. Neatitiktį prielaidai dėl dispersijų vienalytiškumo kartais galima pataisyti atliekant

▼M7

duomenų logaritminį transformavimą. Jei dispersijos nevienalytiškumas yra labai didelis ir jo neįmanoma pataisyti transformavimo keliu, reikėtų nagrinėti galimybę taikyti kitus analizės metodus, pvz., taikant Jonkheere tendencijos kriterijų mažėjimo tvarka. Papildomus nurodymus dėl NOEC nustatymo galima rasti (10).

62. Atsižvelgiant į naujus mokslo pasiekimus, rekomenduojama atsisakyti NOEC sąvokos ir ją pakeisti regresija pagrįstais EC_x taškiniais įverčiais. Atliekant *Myriophyllum* bandymą, nebuvo nustatyta jokia tinkama x vertė. Tačiau atrodo, kad tiktų į 10–20 % intervalas (atsižvelgiant į pasirinktą atsako kintamąjį), ir pageidautina, kad ataskaitoje būtų pateikta EC_{10} ir EC_{20} vertės.

Ataskaitos teikimas

63. Bandymo ataskaitą sudaro ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga

Vienkomponentė cheminė medžiaga:

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;

— cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt. (įskaitant organinės anglies kiekį, jei tinka).

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišinys:

— kiek įmanoma išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.

Bandymo rūšis:

— mokslinis pavadinimas ir šaltinis.

Bandymo sąlygos

— taikyta bandymo procedūra (statinio ar pusiau statinio bandymo);

— bandymo pradžios data ir jų trukmė;

— bandymo terpė;

— bandymo schemos aprašymas: bandymo indai ir dangčiai, tirpalų tūriai, vieno bandymo indo pagrindinio ūglio ilgis bandymo pradžioje;

— bandymo koncentracijos vertės (nominaliosios ir išmatuotos, jei tinka) vienos koncentracijos kartotinių ėminių skaičius;

— pradinių ir bandymo tirpalų ruošimo metodai, įskaitant naudojamus tirpiklius ar dispergentus;

— bandymo temperatūra;

— šviesos šaltinis, šviesos intensyvumas ir vienalytiškumas;

— apdorotų ir kontrolinių ėminių terpės pH vertės;

— bandomosios cheminės medžiagos analizės metodas ir atitinkami jo kokybės vertinimo duomenys (tinkamumo patvirtinimo tyrimai, analizės rezultatų standartiniai nuokrypiai arba pasikliovimo ribos);

▼M7

— pagrindinio ūglio ilgio ir kitų matuojamų kintamųjų, pvz., bendro šoninių šakų ilgio, bendro ūglių ilgio, bendro šaknų ilgio, žaliosios medžiagos masės, sausos medžiagos masės arba žiedų vainikų skaičiaus, nustatymo metodai;

— kiekvieno bandymo ir kontrolinio ėminio indo kultūros būsena (sterili ar nesterili) kiekvieno stebėjimo metu;

— visi nukrypimai nuo šio bandymų metodo.

Rezultatai

— neapdoroti duomenys: kiekvieno bandymo ir kontrolinio indo pagrindinio ūglio ilgis ir kiti matuojami kintamieji kiekvienu matavimo ir analizės atveju,

— kiekvieno matuojamo kintamojo vidurkis ir standartinis nuokrypis,

— kiekvieno matuojamo kintamojo augimo kreivės;

— apskaičiuoti kiekvieno apdoroto kartotinio ėminio atsako kintamieji, jų vidutinės vertės ir kartotinių ėminių variacijos koeficientas;

— grafinis koncentracijos ir poveikio priklausomybės vaizdas;

— toksiškumo vertinamųjų baigčių įverčiai pagal atsako kintamuosius, pvz., EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, ir atitinkami pasikliovimo intervalai. Jei buvo apskaičiuotos, LOEC ir NOEC vertės ir jų nustatymo statistiniai metodai;

— jei buvo taikytas dispersinės analizės metodas ANOVA, poveikio, kurį galima aptikti, dydis (pvz., mažiausiais reikšmingas skirtumas);

— augimo skatinimas, nustatytas kurios nors koncentracijos ėminiui,

— visi stebimi fitotoksiškumo požymiai ir bandymo tirpalų stebėjimo duomenys;

— rezultatų aptarimas, įskaitant poveikį bandymo rezultatams dėl nukrypimų nuo šio bandymų metodo.

LITERATŪRA

(1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.

(1) Maletzki, D. *et al*. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch,* No. 22, pp. 702–710.

(2) Šio priedo C.26 skyrius. *Lemna spp.* augimo inhibavimo bandymas.

(3) OECD (2014), „*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris.

(4) OECD (2000), „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

(5) Šio priedo C.51 skyrius. Toksiškumo *Myriophyllum spicatum* bandymas vandens ir nuosėdų sistemoje.

(6) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.

▼M7

(7) Nyholm, N. *et al*. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chem*istry, Vol. 11/2, pp. 157-167.

(8) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, pp. 1485-1494.

(9) OECD (2006), „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

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

(11) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

(12) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.

(13) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(14) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.

(15) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp. 93-96.

▼M7

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Biomasė – populiacijos gyvosios medžiagos masė, išreiškiama kaip žaliosios ir (arba) sausos medžiagos masė. Šiame bandyme biomasė yra pagrindinio ūglio, visų šoninių šakų ir visų šaknų masė.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Chlorozė – bandymo organizmo, ypač žiedų vainikų, spalvos pasikeitimas iš žalios į gelsvą.

EC_x – bandymo terpėje ištirpusios bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant *Myriophyllum spicatum* augimo greitis per nustatytą veikimo laikotarpį (jo trukmę būtina tiksliai nurodyti, jei skiriasi nuo visos ar įprastinės bandymo trukmės) sumažėja x % (pvz., 50 %). EC vertei, gautai pagal augimo greitį arba pagal išeigą, vienareikšmiškai žymėti vartojami simboliai „E_rC“ augimo greičiui ir „E_yC“ išeigai, toliau nurodant naudotą matuojamą kintamąjį, pvz., E_rC (pagrindinio ūglio ilgis).

Augimas – matuojamo kintamojo didėjimas, pvz., pagrindinio ūglio ilgio, bendro šoninių šakų ilgio, bendro ūglių ilgio, bendro šaknų ilgio, žaliosios medžiagos masės, sausos medžiagos masės arba žiedų vainikų skaičiaus, bandymo laikotarpiu.

Augimo greitis (vidutinis savitasis augimo greitis) – matuojamo kintamojo logaritminis padidėjimas veikimo laikotarpiu. *Pastaba*. Su augimo greičiu susiję atsako kintamieji nepriklauso nuo bandymo trukmės, jei neveikiamų kontrolinių organizmų augimo schema yra eksponentinė.

Mažiausia stebimo poveikio koncentracija (LOEC) – mažiausia bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant medžiagos poveikis augimo mažėjimui per nustatytą veikimo laikotarpį yra statistiškai reikšmingas palyginti su kontroliniais ėminiais (kai $p < 0,05$). Tačiau esant visoms didesnėms nei LOEC bandymo koncentracijos vertėms, kenksmingas poveikis turėtų būti lygus arba didesnis nei poveikis, kuris būtų esant LOEC. Kai negalima įvykdyti šių dviejų sąlygų, turėtų būti pateiktas išsamus paaiškinimas, kaip buvo pasirinkta LOEC (taigi ir NOEC) vertė.

Matuojami kintamieji – visų tipų kintamieji, kurie yra matuojami bandymo vertinamajai baigčiai išreikšti, naudojant vieną arba daugiau skirtingų atsako kintamųjų. Šiame bandymų metode matuojami kintamieji yra pagrindinio ūglio ilgis, bendras šoninių šakų ilgis, visas ūglių ilgis, bendras šaknies ilgis, žaliosios medžiagos masė, sausos medžiagos masė ir žiedų vainikų skaičius.

Monokultūra – vienos rūšies augalų kultūra.

Nekrozė – bandymo organizmo žuvęs audinys (t. y. baltas arba tamsiai rudas).

Nestebimo poveikio koncentracija (NOEC) – vos mažesnė nei LOEC bandymo koncentracija.

Atsako kintamasis – toksiškumui įvertinti naudojamas kintamasis, gautas pagal bet kurį nors iš matuojamų kintamųjų, skirtingais apskaičiavimo metodais apibūdinančių biomasę. Šiame bandymų metode augimo greitis ir išeiga yra atsako kintamieji, gauti pagal matuojamus kintamuosius, pvz., pagrindinio ūglio ilgį, bendrą ūglių ilgį, žaliosios medžiagos masę, sausos medžiagos masę ar žiedų vainikų skaičių.

Pusiau statinis (atnaujinimo) bandymas – bandymas, kurį atliekant bandymo tirpalas periodiškai keičiamas po tam tikro laiko tarpo.

▼M7

Statinis bandymas – bandymų metodas, kai bandymo tirpalas neatnaujinamas atliekant bandymą.

Bandomoji cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys, bandyti pagal šį bandymų metodą.

Bandymo vertinamoji baigtis – bendrasis veiksnys, kurio pokytis veikiant bandomąja chemine medžiaga palyginti su kontroliniu ėminiu yra bandymo tikslas. Šiame bandymų metode vertinamoji baigtis yra augimo slopinimas, kuris gali būti išreikštas skirtingais atsako kintamaisiais, pagrįstais vienu arba daugiau matuojamų kintamųjų.

Bandymo terpė – visiškai paruošta sintetinė kultūros terpė, kurioje auga bandymo augalai, kai jie veikiami bandomąja chemine medžiaga. Bandomoji cheminė medžiaga paprastai yra ištirpinta bandymo terpėje.

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

Išeiga – matuojamo kintamojo, naudojamo biomasės kiekiui išreikšti, vertės veikimo pabaigoje ir jo vertės veikimo pradžioje skirtumas. Pastaba. Kai neveikiamų organizmų augimo schema yra eksponentinė, išeiga pagrįsti atsako kintamieji bandymo eigoje mažės.

▼M7

2 priedėlis

MODIFIKUOTA ANDREWS TERPĖ, SKIRTA PRADINEI KULTŪRAI IR IŠ ANKSTO PARUOŠTAI KULTŪRAI

Iš penkių atskirai paruoštų pradinių mitybinių tirpalų, pridedant 3 % sacharozės, ruošiama modifikuota Andrews terpė, skirta pradinei kultūrai ir iš anksto paruoštai kultūrai.

1 lentelė

Andrews mitybinio tirpalo sudėtis (ASTM žymuo E 1913-04)

Pradinio mitybinio tirpalo gamyba			Mitybinio tirpalo gamyba
Pradinis tirpalas	Cheminė medžiaga	Pradinė masė/1 000 ml	ml/5 l mitybinio tirpalo
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO_3	8,08 g	
	$Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$	18,88 g	
2	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	9,86 g	50
3	žr. pradinį tirpalą 3.1		50
4	KH_2PO_4	2,72 g	50
5	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0,278 g	50
	$Na_2EDTA \times 2\ H_2O$	0,372 g	

Pradinius tirpalus galima laikyti šaldytuve 6 mėnesius (5–10 °C). Tik pradinio tirpalo Nr. 5 laikymo trukmė yra trumpesnė (du mėnesiai).

2 lentelė

Pradinis tirpalas 3.1, iš kurio ruošiamas pradinis tirpalas 3

Cheminė medžiaga	Pradinė masė g/100 ml
$MnSO_4 \times 4\ H_2O$	0,223
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	0,115
H_3BO_3	0,155
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,0125
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4\ H_2O$	0,0037

Paruoštas pradinis tirpalas 3.1 (2 lentelė) užšaldomas maždaug 11 ml alikvotinėmis dalimis (ne aukštesnėje kaip – 18 °C temperatūroje). Padalytą užšaldytą tirpalą galima laikyti penkerius metus.

Pradinis tirpalas 3 gaminamas iš atitirpinto tirpalo 3.1, kurio 10 ml įpilama į 1 l matavimo kolbą ir skiedžiama iki žymės ypač švariu vandeniu.

Andrews modifikuotai terpei gauti į 5 l matavimo kolbą įpilama maždaug 2 500 ml ypač švaraus vandens. Įpilama po 50 ml kiekvieno pradinio tirpalo, skiedžiama ypač švariu vandeniu iki 90 % matavimo kolbos tūrio ir nustatoma pH vertė 5,8.

▼M7

Įpilama 150 g ištirpintos sacharozės (3 % nuo 5 l tūrio) ir matavimo kolbos turinys skiedžiamas iki žymės ypač švariu vandeniu. Mitybinis tirpalas išpilstomas į 1 l Schott kolbas, kurios 20 min apdorojamos autoklave 121 °C temperatūroje.

Taip gautą mitybinį tirpalą galima laikyti steriliai šaldytuve (5–10 °C) tris mėnesius.

Modifikuota Andrews terpė, skirta toksiškumo bandymui sistemoje be nuosėdų

Iš 1 ir 2 lentelėse nurodytų penkių pradinių mitybinių tirpalų, pridedant 30 % sacharozės, ruošiama dešimteriopos koncentracijos modifikuota Andrews terpė, kurios reikia bandymo tirpalams gauti. Terpei gauti į 1 l matavimo kolbą įpilama maždaug 100 ml ypač švaraus vandens. Įpilus po 100 ml kiekvieno pradinio tirpalo, nustatoma pH vertė 5,8. Paskui įpilama 30 % sacharozės tirpalo (300 g/1 000 ml) ir matavimo kolbos turinys skiedžiamas iki žymės ypač švariu vandeniu.

Mitybinis tirpalas išpilstomas į 0,5 l Schott kolbas, kurios 20 min apdorojamos autoklave 121 °C temperatūroje.

Taip gautą dešimteriopos koncentracijos modifikuotą mitybinį tirpalą galima laikyti steriliai šaldytuve (5–10 °C) tris mėnesius.

▼M7

3 priedėlis

PRADINĖS KULTŪROS PRIEŽIŪRA

Šiame 3 priedėlyje aprašyta pradinė kultūra *Myriophyllum spicatum* L ([1]) po vandeniu augantis plunksnalapių šeimos dviskiltis augalas. Neryškios rožinės spalvos gėlės pasirodo virš vandens paviršiaus nuo birželio iki rugpjūčio mėnesio. Augalai turi į gruntą įleidžiamą tvirtą šakniastiebių sistemą, jų galima rasti viso šiaurės pusrutulio eutrofiniuose, bet ne užterštuose ir daugiau kalkėtuose stovinčio vandens telkiniuose su dumblo substratu. *Myriophyllum spicatum* labiau patinka gėlas vanduo, bet augalų randama ir sūrokame vandenyje.

Reikia naudoti sterilius augalus pradinei kultūrai be nuosėdų auginti laboratorinėmis sąlygomis. Sterilių augalų turi Vokietijos federalinės aplinkos agentūros ekotoksikologijos laboratorija.

Arba bandymo organizmus galima paruošti iš nesterilių augalų pagal ASTM E 1913-04 standartą. Lauko sąlygomis surinktos *Myriophyllum sibiricum* kultūros auginimo procedūra aprašyta šioje ASTM standarto ištraukoje:

„Jei pradedama nuo iš lauko sąlygomis surinktų nesterilių augalų, rudenį reikia rinkti *M. sibiricum* lapaūglius. Lapaūgliai dedami į 20 l akvariumą, turintį 5 cm storio sterilių nuosėdų sluoksnį, padengtą kvarciniu smėliu arba, pvz., Turface®, ir 18 l distiliuoto vandens. Akvariumas aeruojamas 15 °C temperatūroje esant 200 iki 300 μmol m^{-2} s^{-1} apšvietai 16 h per parą. Augalų kultūra akvariume gali būti prižiūrima kaip atsarginis augalų šaltinis tam atvejui, kai sterilios augalų kultūros sunaikinamos dėl mechaninės trikties auginimo kameroje, užteršimo arba dėl kitos priežasties. Akvariume auginami augalai nėra sterilūs ir kultūrų sterilumo negalima užtikrinti naudojant kultūros auginimo partijomis sistemą. Kultūrai sterilizuoti augalai paimami iš akvariumo ir apie 0,5 h plaunami tekančiu dejonizuotu vandeniu.Steriliomis laminarinio bokso sąlygomis augalai yra dezinfekuojami trumpiau nei 20 min (kol didžioji dalis augalų audinių išbalinama ir žalia lieka tik auganti viršūnė) 3 % (m/V) natrio hipochlorito tirpale, kuriame yra 0,01 % tinkamos paviršinio aktyvumo medžiagos. Dezinfekantas ir augalinė medžiaga maišomi. Segmentai su keliais bambliais pernešami į sterilius kultūros mėgintuvėlius su 45 ml sterilizuotos modifikuotos Andrews terpės ir mėgintuvėliai uždengiami paprastais kultūros mėgintuvėlio dangčiais. Į kiekvieną bandymo kamerą dedamas tik vienas augalo segmentas. Dangčiui pritvirtinti prie kultūros indo naudojama laboratorinė lipnioji plėvelė. Gavus sterilią kultūrą, augalų segmentus su keliais bambliais kas dešimt ar dvylika parų reikėtų pernešti į naujas bandymų kameras su nauja skystąja mitybine terpe. Auginant agaro lėkštelėse buvo įrodyta, kad augalai turi būti sterilūs ir lieka sterilūs aštuonias savaites prieš pradedant bandymus.“

Kadangi modifikuota Andrews terpė turi sacharozės (kuri skatina grybelių ir bakterijų augimą), visos medžiagos, bandymo tirpalai ir kultūros turi būti ruošiamos sterilumo sąlygomis. Visus skysčius ir visą įrangą reikia sterilizuoti prieš naudojant. Sterilizuojama 4 h apdorojant karštu oru (210 °C) arba 20 min autoklave 121 °C temperatūroje.Be to, visos kolbos, lėkštės, dubenys ir kita įranga prieš pat naudojimą apdorojami liepsna ant sterilaus darbastalio.

Pradines kultūras galima laikyti ilgesnį laiką žemesnėje temperatūroje (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C) ir nereikia rekultivuoti. *Myriophyllum* auginimo terpė turėtų

([1]) Carl von Linné (gimė 1707 m. gegužės 23 d. Elmhulte; mirė 1778 m.sausio 10 dieną Upsaloje).

▼M7

būti tokia pat, kaip ir bandymo terpė, bet pradinėms kultūroms galima naudoti kitų mitybinių medžiagų turinčias terpes.

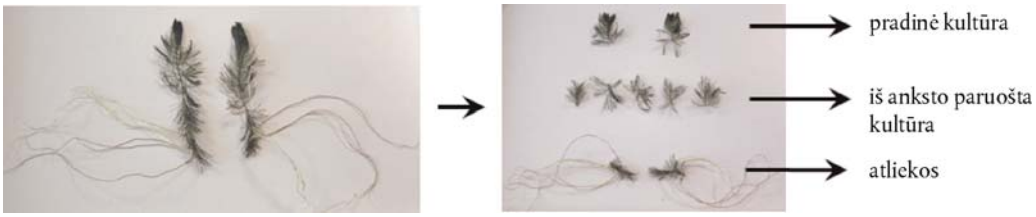
Augalų segmentai sterilumo sąlygomis paskirstomi į kelias 500 ml kūgines arba (ir) 2 000 ml Fernbacho kolbas, kurių kiekvienoje yra 450 arba 1 000 ml modifikuotos Andrews terpės. Kolbos sterilumo sąlygomis užkemšamos celiuliozės pluošto kamščiais.

Be to, prieš pat pradedant naudoti įrangą, ji būtinai turi būti kruopščiai apdorota liepsna ant sterilaus darbastalio. Atsižvelgiant į augalų skaičių ir dydį, jie turi būti pernešami į naują mitybinį tirpalą maždaug kas tris savaites.

Šiai atnaujintai kultūrai galima naudoti viršūnes, taip pat stiebo vidurinės dalies segmentus. Perneštų augalų (ar augalų segmentų) skaičius ir dydis priklauso nuo reikiamo augalų skaičiaus. Pvz., į vieną Fernbach kolbą galima pernešti penkis ūglių segmentus, o į vieną kūginę kolbą – tris ūglius, kurių kiekvienas yra 5 cm ilgio. Reikia atmesti visus įsišaknijusias, žydinčias, nuvytusias ar kitaip išsiskiriančias dalis.

1 paveikslas.

Augalų pjaustymas pradinei ir iš anksto paruoštai kultūrai gauti po trijų savaičių auginimo



Augalų kultūras reikia auginti 500 ml kūginėse kolbose ir 2 000 ml Fernbacho kolbose, laikomose aušinimo inkubatoriuje 20 ± 2 °C temperatūroje ir nuolat apšviestose maždaug 100–150 μE m^{-2} s^{-1} arba 6 000–9 000 liuksų šviesa (kameros apšvietimas, kurio spalvos temperatūra atitinka „šiltą baltą šviesą“).

2 paveikslas.

Augalų kultūrų auginimas aušinimo inkubatoriuje su kameros apšvietimu.



Kultūroms auginti turėtų būti naudojami chemiškai švarūs (rūgštimi išplauti) ir sterilūs stikliniai indai, ir taikomi sterilaus apdorojimo metodai. Jei pradinė kultūra užteršiama, pvz., dumbliais, grybeliais ir (arba) bakterijomis, reikėtų paruošti naują kultūrą arba reikėtų naudoti pradinę kultūrą iš kitos laboratorijos kultūrai atnaujinti.

▼M7

4 priedėlis

IŠ ANKSTO PARUOŠTOS KULTŪROS PRIEŽIŪRA IR BANDYMO ORGANIZMO PARUOŠIMAS BANDYMAMS

Norint gauti iš anksto paruoštą kultūrą, pradinės kultūros ūgliai supjaustomi į segmentus su dviem žiedų vainikais, segmentai sudedami į Fernbacho kolbas, pripildytas modifikuota Andrews terpe (turinčia 3 % masės sacharozės). Kiekvienoje kolboje gali būti 50 ūglių segmentų. Tačiau reikėtų užtikrinti, kad segmentai būtų gajūs ir neturėtų jokių šaknų ir šoninių šakų ar jų pumpurų (žr. 3 priedėlio 1 paveikslą).

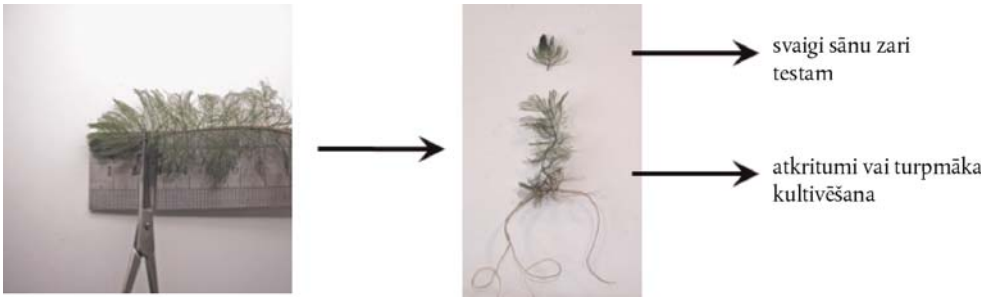
Iš anksto paruoštos kultūros organizmai auginami steriliomis sąlygomis klimatinėje kameroje 14– 21 parą, esant 16 h šviesos ir 8 h tamsos tarpsniams. Pasirenkamas šviesos intensyvumas yra 100–150 μE m^{-2} s^{-1}. Temperatūra bandymo induose turėtų būti 23 ± 2 °C.

Kadangi modifikuota Andrews terpė turi sacharozės (kuri skatina dumblių, grybelių ir bakterijų augimą), bandomosios cheminės medžiagos tirpalus reikėtų ruošti ir kultūras auginti sterilumo sąlygomis. Visus skysčius ir visą įrangą reikia sterilizuoti prieš naudojant. Sterilizuojama 4 h apdorojant karštu oru (210 °C) arba 20 min autoklave 121 °C temperatūroje. Be to, visos kolbos, lėkštės, dubenys ir kita įranga prieš pat naudojimą apdorojami liepsna ant sterilaus darbastalio.

Ūgliai išimami iš kolbų su iš anksto paruošta kultūra sterilumo sąlygomis, pasirenkant kuo vienalytiškesnę medžiagą. Kiekvienam bandymui reikia turėti ne mažiau kaip 60 bandymo organizmų (bandoma aštuonių koncentracijos verčių cheminė medžiaga). Bandymams imamos iš anksto paruoštos kultūros žaliosios šoninės šakos, kurios sutrumpinamos iki 2,5 cm nuo pagrindo (matuojant liniuote) ir pernešamos į stiklinę su sterilia modifikuota Andrews terpe. Šios šoninės šakos gali būti naudojamos atliekant toksiškumo *Myriophyllum spicatum* bandymą sistemoje be nuosėdų.

2 paveikslas.

Iš anksto paruoštos kultūros augalų pjaustymas, atliekant toksiškumo Myriophyllum spicatum bandymą sistemoje be nuosėdų.



▼M7

C.51. TOKSIŠKUMO MYRIOPHYLLUM SPICATUM BANDYMAS VANDENS IR NUOSĖDŲ SISTEMOJE

ĮVADAS

1. Šis bandymų metodas atitinka OECD bandymo gaires 239 (2014). Tai yra vandens paviršiuje augančio vienaskilčio augalo *Lemna* rūšiai (1) ir dumblių rūšiai (2) taikomi bandymų metodai. Paprastai šie metodai taikomi siekiant gauti duomenų apie riziką, kurią bandomosios cheminės medžiagos, ypač herbicidinių savybių turinčios cheminės medžiagos, kelia netikslinių vandens augalų rūšims. Tačiau kai kuriais atvejais gali prireikti duomenų apie kitas makrofitų rūšis. Aplinkos toksikologijos ir chemijos draugijos (angl. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*) Vandens mikrofitams pesticidų keliamos rizikos vertinimo (angl. *Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides*, AMRAP) darbo grupės neseniai paskelbtose gairėse pateikiama prielaida, kad gali prireikti duomenų apie cheminių medžiagų poveikį įsišaknijusių makrofitų rūšims, jei yra žinoma, kad *Lemna* ir dumbliai nėra jautrūs veikimo būdui arba jei susirūpinimą kelia pasiskirstymas tarp vandens ir nuosėdų, dėl ko jie paveikiami per sugertį šaknimis (3). Atsižvelgiant į turimas žinias ir patirtį, *Myriophyllum* spp buvo pasirinkta kaip tinkamiausia rūšis tais atvejais, kai reikia duomenų apie po vandeniu augančių plunksnalapių šeimos dviskilčių augalų rūšį (4) (5) (6). Šis bandymas nepakeičia kitų toksiškumo vandeninei terpei bandymų; jis greičiau turėtų juos papildyti taip, kad būtų galima išsamiau įvertinti pavojų vandens augalams ir riziką. *Myriophyllum spicatum* bandymo vandens ir nuosėdų sistemoje metodas papildo toksiškumo *Myriophyllum spicatum* bandymą sistemoje be nuosėdų (7).

2. Šiame dokumente aprašytas bandymų metodas, kuriuo galima įvertinti bandomosios cheminės medžiagos poveikį *Myriophyllum spicatum*, vandens ir nuosėdų sistemoje augančių įsišaknijusių vandens augalų rūšiai. Bandymų metodas yra pagrįstas iš dalies esamais metodais (1) (2) (8) ir jame atsižvelgiama į naujausius mokslinius tyrimus, susijusius su rizikos vandens augalams vertinimu (3). Bandymo vandens ir nuosėdų sistemoje metodas buvo patvirtintas atliekant tarptautinį tarplaboratorinį tyrimą, atliktą su statinėmis sąlygomis auginama *Myriophyllum* rūšimi, veikiama bandomąja chemine medžiaga ją įterpiant per vandens sluoksnį (9). Tačiau bandymo sistemą nesunku pritaikyti, kad būtų veikiama per sodrintas nuosėdas arba per vandeninę fazę taikant pusiau statinį ar kintamos dozės scenarijų, nors šių scenarijų tarplaboratorinis tyrimas nebuvo oficialiai atliekamas. Be to, bendrasis metodas gali būti taikomas kitoms įsišaknijusioms, povandeninėms ir vandens paviršiuje augančioms rūšims, įskaitant kitas *Myriophyllum* rūšis (pvz., *Myriophyllum aquaticum*) ir *Glyceria maxima* (10). Naudojant alternatyvias rūšis, gali tekti keisti bandymo sąlygas, schemą ir trukmę. Visų pirma, būtini papildomi tyrimai reikiamoms *Myriophyllum aquaticum* taikomoms procedūroms nustatyti. Šios pasirinktys nėra išsamiai pateiktos šiame bandymų metode, kuriame aprašomas standartinis *Myriophyllum spicatum* veikimo metodas statinėje sistemoje per vandeninę fazę.

3. Šis bandymų metodas taikomas cheminėms medžiagoms, kurioms bandymų metodas buvo patvirtintas (išsami informacija pateikta tarplaboratorinio tyrimo ataskaitoje (9)), arba preparatams ar žinomos sudėties mišiniams. *Myriophyllum* bandymas gali būti atliekamas, kad būtų įvykdytas 1 pakopos duomenų reikalavimas dėl galimo bandomosios cheminės medžiagos pasiskirstymo tarp vandens ir nuosėdų ar dėl veikimo būdo ir (arba) selektyvumo problemų. Taip pat gali prireikti atlikti *Myriophyllum* laboratorinį bandymą, kaip aukštesnės pakopos strategijos dalį, sprendžiant su rizika vandens augalams susijusius klausimus. Konkreti priežastis atlikti bandymą – nustatyti poveikio kelią (t. y. per vandenį ar nuosėdas). Prieš taikant bandymų metodą numatomam mišiniui reglamentuoti, reikėtų panagrinėti, ar metodu galima pasiekti tą tikslą atitinkančius rezultatus ir, jei taip, tai dėl kokios priežasties. Tokie svarstymai nereikalingi, kai yra reglamentavimo reikalavimas bandyti mišinį.

▼M7

BANDYMO PRINCIPAS

4. Šio bandymo tikslas – įvertinti cheminės medžiagos poveikį standartizuotose terpėse (vandens, nuosėdų ir maistinių medžiagų) augančių *Myriophyllum* augalų vegetatyviniam augimui. Šiam tikslui nežydinčių sveikų augalų ūglių viršūnės sodinamos į standartizuotas dirbtines nuosėdas, kurios papildomai gauna maistinių medžiagų, kad būtų užtikrintas tinkamas augalų augimas, ir vėliau jos laikomos Smart ir Barko terpėje (1 priedėlis). Pasibaigus prigijimo laikotarpiui, per kurį susidarytų šaknys, augalai veikiami kelių koncentracijos verčių bandomąja chemine medžiaga, įterpiama per vandens sluoksnį. Arba galima modeliuoti veikimą per dirbtines nuosėdas, jas sodrinant bandomąja chemine medžiaga ir persodinant augalus į šias sodrintas nuosėdas. Abiem atvejais augalai vėliau 14 parų laikomi kontroliuojamomis aplinkos sąlygomis. Poveikis augimui yra nustatomas kiekybiškai įvertinant ūglių ilgį ir žaliosios bei sausos medžiagos masę, taip pat atliekami kokybiniai stebėjimai chlorozės, nekrozės ar augimo defektų požymiams nustatyti.

5. Siekiant kiekybiškai nustatyti su chemine medžiaga susijusį poveikį, augimas bandymo tirpaluose lyginamas su kontrolinių augalų augimu ir nustatoma tam tikrą x % augimo slopinimą sukelianti koncentracija, išreiškiama EC_x; kai *x* gali būti kuri nors vertė, atsižvelgiant į reglamentavimo reikalavimus, pvz., EC_{10}, EC_{20} ir EC_{50}. Reikėtų pažymėti, kad EC_{10} ir EC_{20} įverčių vertės yra patikimos ir tinka atliekant tik tokius bandymus, kurių kontroliniams augalams nustatyti variacijos koeficientai yra mažesni nei vertinamas poveikio lygis, t. y. variacijos koeficientai turėtų būti < 20 %, kad EC_{20} įvertis būtų statistiškai patikimas.

6. Reikėtų nustatyti neapdorotų ir apdorotų augalų vidutinį savitąjį augimo greitį (apskaičiuotą pagal ūglio ilgio, ūglio žaliosios medžiagos masės ir sausos medžiagos masės vertinimą) ir išeigą (apskaičiuotą pagal ūglio ilgio, ūglio žaliosios medžiagos masės ir sausos medžiagos masės padidėjimą). Savitasis augimo greitis (r) ir išeiga (y) vėliau naudojami E_rC_x (pvz., E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) ir E_yC_x (pvz., E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}) nustatyti.

7. Prireikus pagal vidutinio savitojo augimo greičio ir išeigos įverčius gali būti statistiškai nustatyta mažiausia stebimo poveikio koncentracija (LOEC) ir nestebimo poveikio koncentracija (NOEC).

INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ CHEMINĘ MEDŽIAGĄ

8. Turėtų būti atitinkamo jautrio analizės metodas cheminių medžiagų kiekiui bandymo terpėje kiekybiškai nustatyti.

9. Informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą, kuri gali būti naudinga bandymo sąlygoms nustatyti, sudaro struktūrinė formulė, sudėtis, jei tiriamos daugiakomponentės medžiagos, UVCB, mišiniai ar preparatai, grynumas, tirpumas vandenyje, patvarumas veikiant vandeniui ir šviesai, rūgšties disociacijos konstanta (pK_a), pasiskirstymo tarp oktanolio ir vandens koeficientas (K_{ow}), pasiskirstymo tarp vandens ir nuosėdų koeficientas K_d, jei žinomas, garų slėgis ir biologinis skaidumas. Tirpumas ir garų slėgis gali būti naudojami Henrio dėsnio konstantai apskaičiuoti, kuri rodytų, ar atliekant bandymą gali būti didelių bandomosios cheminės medžiagos garavimo nuostolių. Jei tikėtina, kad bus bandomosios cheminės medžiagos nuostolių, juos reikėtų kiekybiškai įvertinti, o vėlesnius tokių nuostolių kontrolės veiksmus reikėtų dokumentuoti. Jei duomenys apie bandomosios (-ųjų) cheminės (-ų) medžiagos (ų) tirpumą ir patvarumą yra abejotini, šias savybes rekomenduojama įvertinti bandymo sąlygomis, t. y. bandymui naudotinos auginimo terpės, temperatūros, apšvietimo režimo sąlygomis. *Pastaba*. Kai bandomi šviesos veikiami peroksidiniai herbicidai, laboratorijos apšvietimas turėtų atitikti natūralios saulės šviesos ultravioletinę spinduliuotę.

▼M7

10. Bandymo terpės pH vertė turėtų būti matuojama ir reguliuojama tinkamu būdu. Bandymo terpės pH kontrolė yra ypač svarbi, pvz., kai bandomi metalai arba cheminės medžiagos, kurios yra nestabilios dėl hidrolizės. Kiti nurodymai, kaip bandyti chemines medžiagas, kurių fizikinės ir cheminės savybės apsunkina šią užduotį, pateikti EBPO rekomendaciniame dokumente (11).

BANDYMO TINKAMUMAS

11. Bandymo rezultatų tinkamumas patvirtinamas, jei bandymo veikimo laikotarpiu kontrolinių augalų vidutinis bendras ūglių ilgis ir vidutinė bendra žaliosios medžiagos masė bent padvigubėja. Be to, neturi būti jokių matomų kontrolinių augalų chlorozės požymių ir matomo užteršimo kitais organizmais, pvz., neturėtų būti dumblių ar ir (arba) bakterijų plėvelės ant augalų, nuosėdų paviršiuje ir bandymo terpėje.

12. Kontrolinių kultūrų kartotinių ėminių išeigos, pagrįstos ūglių žaliosios medžiagos masės matavimais (t. y. nuo bandymo pradžios iki jo pabaigos), vidutinis variacijos koeficientas yra ne didesnis kaip 35 %.

ETALONINĖ CHEMINĖ MEDŽIAGA

13. Reikėtų periodiškai bandyti etaloninę (-es) cheminę (-es) medžiagą (-as), pvz., 3,5-dichlorfenolį, naudotą atliekant tarplaboratorinį tyrimą (9), kaip priemonę bandymo procedūros charakteristikoms patikrinti laikui bėgant. Tarplaboratorinio tyrimo duomenys rodo, kad 3,5-dichlorfenolio vidutinė EC_{50} vertė, gauta skirtingiems atsako kintamiesiems, yra nuo 4,7 mg/l iki 6,1 mg/l (šių verčių pasikliovimo intervalo duomenys pateikti tarplaboratorinio tyrimo ataskaitoje). Patartina etaloninę cheminę medžiagą bandyti bent du kartus per metus arba vienu metu su bandomosios cheminės medžiagos galutiniais toksiškumo nustatymo bandymais, jei bandymai atliekami rečiau. Tikėtinos 3,5-dichlorfenolio EC_{50} vertės yra pateiktos tarptautinio tarplaboratorinio tyrimo statistinių duomenų ataskaitoje (9).

METODO APRAŠYMAS

Bandymų aparatūra

14. Bandymas turėtų būti atliekamas kontroliuojamomis aplinkos sąlygomis, t. y. auginimo kameroje, auginimo kambaryje ar laboratorijoje, reguliuojant šviesiojo laikotarpio trukmę, apšvietimą ir temperatūrą (žr. skirsnį *Bandymo sąlygos*, 56–58 skirsniai). Pradines kultūras reikėtų laikyti atskirai nuo bandymo indų.

15. Tyrimas turėtų būti atliekamas naudojant stiklinius bandymo indus, pvz., akvariumus ar chemines stiklines; paprastai naudojamos 2 l stiklinės (maždaug 24 cm aukščio ir 11 cm skersmens). Tačiau galbūt tiktų kiti (t. y. didesni) indai, jei vandens gylio pakanka augalams neribotai augti ir visą bandymo trukmę būti pasinėrusiems po vandeniu.

16. Plastikiniai ar stikliniai augalų vazonai (maždaug 9 cm skersmens, 8 cm aukščio ir 500 ml talpos) gali būti naudojami kaip indai augalams į nuosėdas sodinti. Arba galima naudoti chemines stiklines, kurioms kartais teikiama pirmenybė (pvz., bandant hidrofobines ar didelį K_{ow} turinčias chemines medžiagas).

17. Vazono ar stiklinės dydis pasirenkamas atsižvelgiant į pasirinktus bandymo indus ir pageidaujamą bandymo schemą (žr. toliau). Jei naudojama A bandymo schema (vienas ūglis viename vazone ir trys vazonai viename inde), gali prireikti mažesnių vazonų ar didesnių indų. Jei naudojama B bandymo schema (trys ūgliai viename vazone ir vienas vazonas viename inde), nurodyti vazonų ir indų dydžiai turėtų atitikti vienas kitą. Visais atvejais mažiausias vandens gylis turėtų būti 12 cm virš nuosėdų viršaus, o santykį tarp nuosėdų paviršiaus ploto bei tūrio santykio ir vandens paviršiaus ploto bei tūrio santykio reikėtų registruoti.

▼M7

Bandymo organizmas

18. Šiame bandymų metodo aprašyme aprašytus bendruosius aspektus galima taikyti įvairioms vandens augalų rūšims bandyti. Tačiau šiame bandymų metodo aprašyme apibrėžtos sąlygos specialiai pritaikytos plunksnalapių rūšiai *Myriophyllum spicatum* bandyti. Ši rūšis priklauso *Haloragaceae* dviskilčių šeimai.

19. *Myriophyllum spicatum* (Eurazinė plunksnalapė) yra po vandeniu auganti įsišaknijanti rūšis, kuri gali augti įvairiomis sąlygomis ir ją galima aptikti stovinčio ir tekančio vandens telkiniuose. *M. spicatum* yra daugiametis augalas, kuris per žiemą nuvysta iki šaknų. Augalai paprastai žydi ir laisvai barsto sėklas, nors dažnai pagrindinis dauginimosi būdas yra vegetatyvinis dauginimasis iš pažastinių pumpurų arba kamieninių fragmentų, kurie atsiskiria natūraliai arba kai būna pažeisti.

Bandymo organizmo auginimas

20. Augalus galima gauti iš natūralių populiacijų arba per vandens augalų tiekėjus. Abiem atvejais reikėtų dokumentuoti augalų šaltinį ir patikrinti rūšies tapatybę. Reikėtų ypač atidžiai žiūrėti, kad renkant *Myriophyllum spicatum* lauko sąlygomis būtų renkama reikiama rūšis, ypač tuose regionuose, kuriuose ji gali būti sukryžminta su kitomis *Myriophyllum* rūšimis. Jei abejojama, rekomenduojama naudoti patikrintas laboratorines kultūras iš žinomų šaltinių. Atliekant šį bandymą neturėtų būti naudojami augalai, kurie buvo veikiami cheminiais teršalais arba buvo surinkti iš akivaizdžiai užterštų vietų.

21. Regionuose, kuriuose *M. spicatum* nėra lengva gauti žiemos mėnesiais, gali tekti užsiimti ilgalaike pradinių kultūrų priežiūra šiltnamio ar laboratorijos sąlygomis. Pradines kultūras reikėtų laikyti tokiomis sąlygomis, kurios būtų panašios į bandymo sąlygas, nors energinę apšvietą ir temperatūrą galima sumažinti, kad kultūrą reikėtų rečiau prižiūrėti (pvz., kai *Myriophyllum* bandymai kuriam laikui nebūtų numatyti). Rekomenduojama naudoti didesnius nei bandymams skirtus akvariumus ir augalų vazonus, kad būtų galima užtikrinti didesnę dauginimosi erdvę. Nuosėdų ir vandens terpės sudėtis turėtų atitikti naudojamą atliekant bandymus, nors galima pritaikyti alternatyvius nuosėdų tręšimo metodus (pvz., naudoti pirktinius lėtai įsisavinamų trąšų preparatus).

22. Pradinių kultūrų augalai iš pažiūros neturėtų būti užteršti kitais organizmais, įskaitant sraiges, siūlinius dumblius, grybelius ir vabzdžius, pvz., drugio *Paraponyx stratiotata* kiaušinėliais ir lervomis ir ilgasnapių *Eubrychius velutus* lervomis ar suaugusiais vabalais. Augalinę medžiagą gali tekti plauti gėlame vandenyje, kad būtų galima pašalinti matomus teršalus. Be to, reikėtų imtis priemonių, kurios padėtų sumažinti taršos vienaląsčiais dumbliais ir bakterijomis plitimą, nors visiškas augalinės medžiagos sterilumas nėra būtinas. Pradines kultūras reikėtų stebėti ir persodinti, jei reikia, kad būtų išvengta taršos vienaląsčiais dumbliais ir bakterijomis plitimo. Gali būti naudinga pradines kultūras aeruoti, jei tarša dumbliais ir bakterijomis keltų didelių problemų.

23. Visais atvejais, prieš augalus naudojant bandymams, jie pakankamai ilgai (t. y. > 2 savaites) auginami ir (arba) aklimatizuojami tokiomis sąlygomis, kurios būtų panašios į bandymo sąlygas, bet nebūtinai tokios pat.

24. Žydinčios pradinės kultūros neturėtų būti naudojamos bandymams, nes žydėjimo metu ir augalams nužydėjus vegetacinio augimo greitis paprastai mažėja.

▼M7

Nuosėdos

25. Šiam bandymui atlikti rekomenduojamos tokios sudėties nuosėdos, gautos pagal šio priedo C.28 skyriuje naudojamas dirbtines nuosėdas (8). Nuosėdos ruošiamos kaip aprašyta C.28 bandymų metode, išskyrus tai, kad dedama šių maistinių medžiagų:

a) 4–5 % durpių (sausos medžiagos masės, kad būtų 2 ± 0,5 % organinės anglies), kurių pH būtų kuo arčiau pH 5,5–6,0 vertės; svarbu naudoti miltelių pavidalo durpes, smulkiai sumaltas (tinkamas dalelių dydis < 1 mm) ir džiovintas tik ore;

b) 20 % (sausos medžiagos masės) kaolino molio (kaolinito kiekis turėtų būti didesnis kaip 30 %);

c) 75–76 % (sausos medžiagos masės) kvarcinio smėlio (smulkusis smėlis turėtų sudaryti didžiausią dalį, daugiau negu 50 % dalelių dydis 50–200 μm);

d) įpilama vandeninės mitybinės terpės, kad galutinės sudėties nuosėdų partijoje amonio chlorido ir natrio fosfato būtų po 200 mg/kg sausų nuosėdų masės, o drėgmės kiekis galutiniame mišinyje būtų 30–50 %;

e) įdedama chemiškai gryno kalcio karbonato ($CaCO_3$), kad galutinio nuosėdų mišinio pH vertė būtų 7,0 ± 0,5.

26. Durpių, kaolino molio ir smėlio šaltinis turėtų būti žinomas ir dokumentuotas. Jei kilmė nežinoma ar kelia tam tikrą susirūpinimą, atitinkamus komponentus reikėtų patikrinti dėl cheminės taršos (pvz., ar nėra sunkiųjų metalų, organinių chloro junginių, organinių fosforo junginių).

27. Sausos sudedamosios nuosėdų dalys, prieš nuosėdas kruopščiai įmaišant į vandeninį maistinių medžiagų tirpalą, turėtų būti labai gerai sumaišytos. Drėgnas nuosėdas reikėtų paruošti bent prieš dvi dienas iki naudojimo, kad durpės galėtų visiškai įmirkti ir hidrofobinės durpių dalelės negalėtų išplaukti į paviršių, kai ant nuosėdų užpilama terpė; prieš naudojant, drėgnas nuosėdas galima laikyti tamsoje.

28. Atliekant bandymą, nuosėdos pernešamos į tinkamo dydžio talpyklas, pvz., į tokio skersmens augalų vazonus, kurie tilptų į stiklinius indus (nuosėdų paviršiaus plotas turėtų sudaryti maždaug 70 % indo paviršiaus ploto arba daugiau). Jei talpykla turi skyles apačioje, į jos dugną įdėtas filtravimo popieriaus gabalas neleis nuosėdoms byrėti iš talpyklos. Nuosėdos pilamos į vazonus taip, kad sudarytų lygų paviršių, ant kurio beriamas plonas (~ 2–3 mm) inertinės medžiagos, pvz., smėlio, smulkaus sode naudojamo žvyro (arba smulkinto klintinio kiauto) sluoksnis, kad nuosėdos negalėtų pakilti.

Bandymo terpė

29. Kaip *Myriophyllum spicatum* auginimo ir bandymo terpė rekomenduojama Smart ir Barko terpė (12). Šios terpės paruošimas aprašytas 1 priedėlyje. Terpių (vandeninės fazės) pH vertė bandymo pradžioje turėtų būti 7,5–8,0, kad augalai galėtų optimaliai augti.

Bandymo schema

30. Atliekant bandymą reikėtų naudoti ne mažiau kaip šešis neapdorotų kartotinių ėminių indus ir ne mažiau kaip keturis kiekvienos iš ne mažiau kaip penkių koncentracijos verčių kartotinių ėminių indus.

31. Jei nereikia nustatyti NOEC, bandymo schema gali būti pakeista padidinant koncentracijos verčių skaičių ir sumažinant kiekvienos bandymo koncentracijos kartotinių ėminių skaičių.

▼M7

32. Kiekvienas bandymo indas yra kartotinis ėminys su trimis ūgliais. Yra dvi trijų ūglių auginimo viename bandymo inde pasirinktys:

— A bandymo schema: vienas ūglis viename vazone ir trys vazonai viename inde;

— B bandymo schema: trys ūgliai viename vazone ir vienas vazonas viename inde;

— priimtina vieno ūglio viename vazone vienam bandymo indui schema, jei pasirinktas toks kartotinių ėminių skaičius, kuris užtikrintų atitiktį tinkamumo kriterijams.

33. Atskiri bandymo indai turėtų būti atsitiktinai priskirti apdorojimo grupėms. Reikia taikyti atsitiktinio bandymo indų išdėstymo bandymo plote schemą, kad būtų kiek įmanoma sumažinta erdvinės padėties, šviesos intensyvumo arba temperatūros skirtumų įtaka.

Bandomosios cheminės medžiagos koncentracija ir kontrolinės grupės

34. Koncentracijos vertės paprastai turėtų atitikti geometrinę progresiją, kurios vardiklis turėtų būti ne didesnis kaip 3,2. Tinkamas bandymo koncentracijos vertes padėtų pasirinkti išankstiniai bandomosios cheminės medžiagos toksiškumo duomenys, gauti atliekant intervalo nustatymo bandymą.

35. Norint nustatyti EC_x vertę, ji turėtų būti tarp bandymo koncentracijos verčių reikiamam pasikliovimo lygiui užtikrinti. Pvz., jei įvertinama EC_{50}, didžiausia bandymo koncentracija turėtų būti didesnė nei EC_{50} vertė. Jei EC_{50} vertė nepatenka į bandymo koncentracijos verčių intervalą, susiję pasikliovimo intervalai bus dideli ir gali būti neįmanomas tinkamas statistinio modelio atitikties vertinimas. Naudojant daugiau koncentracijos verčių apie gaunamą EC_x vertę bus geresnis pasikliovimo intervalas.

36. Jei reikia nustatyti LOEC ir (arba) NOEC (neprivalomas vertinamąsias baigtis), mažiausia bandymo koncentracija turėtų būti pakankamai maža, kad augimas reikšmingai nesiskirtų nuo kontrolinių augalų augimo. Be to, didžiausia bandymo koncentracija turėtų būti gana didelė, kad augimas būtų gerokai mažesnis nei kontroliniuose ėminiuose. Jei bus naudojama daugiau kartotinių ėminių, padidės poveikio nesukeliančios koncentracijos modelio ir dispersinės analizės statistinė galia.

Ribinis bandymas

37. Tais atvejais, kai intervalo nustatymo bandymas rodo, kad nėra bandomosios cheminės medžiagos neigiamo poveikio, jei jos koncentracija yra mažesnė kaip 100 mg/l arba mažesnė kaip jos tirpumo bandymo terpėje ribinė koncentracija ar preparatų dispersijos ribinė koncentracija, galima atlikti ribinį bandymą, kad būtų lengviau palyginti kontrolinės grupės ir vienos apdorotų ėminių grupės, 100 mg/l arba tirpumo ribinei vertei lygios koncentracijos arba ar 1 000 mg/kg sausų nuosėdų koncentracijos, atsakus. Atliekant šį bandymą reikėtų laikytis standartinio dozės ir atsako priklausomybės bandymo bendrųjų principų, išskyrus tai, kad mažiausią kontrolinių ir koncentracijos kartotinių ėminių indų skaičių patariama padidinti iki šešių. Augimą kontrolinių ir apdorotų ėminių grupėse galima analizuoti taikant statistinį kriterijų, pvz., Stjudento t kriterijų, vidurkiams palyginti.

Bandymo tirpalai

38. Bandymo tirpalai paprastai ruošiami skiedžiant demineralizuotu (t. y. distiliuotu ar dejonizuotu) vandeniu pradinį tirpalą, gautą bandomąją cheminę medžiagą tirpinant arba disperguojant Smart ir Barko terpėse (žr. 1 priedėlį).

▼M7

39. Didžiausia bandymo koncentracija paprastai neturėtų būti didesnė nei bandomosios cheminės medžiagos tirpumo vandenyje koncentracija, arba, jei tai preparatai – neturėtų būti didesnė nei disperguojamumas bandymo sąlygomis.

40. Jei bandomosios cheminės medžiagos mažai tirpsta vandenyje, koncentruotą pradinį tirpalą arba cheminės medžiagos dispersiją gali tekti ruošti naudojant organinį tirpiklį arba dispergentą, kad būtų lengviau įterpti tikslius bandomosios cheminės medžiagos kiekius į bandymo terpę ir palengvinti jos dispergavimą ir tirpinimą. Tačiau turėtų būti imamasi visų priemonių, kad šios medžiagos nebūtų naudojamos. Neturi būti fitotoksiškumo dėl tokių pagalbinių tirpiklių arba dispergentų naudojimo. Pvz., dažniausiai naudojami tirpikliai, kurie nesukelia fitotoksiškumo, kai jų koncentracija ne didesnė kaip 100 µl/l, yra acetonas ir dimetilformamidas. Jei naudojamas tirpiklis arba dispergentas, jo galutinė koncentracija turėtų būti pateikta ataskaitoje ir būti kuo mažesnė (≤ 100 µl/l). Šiomis aplinkybėmis visų apdorotų ėminių ir (tirpiklio) kontrolinių ėminių tirpiklio ar dispergento koncentracija turėtų būti vienoda. Į taikomą bandymo schemą turėtų būti įtraukti neapdoroti kartotiniai kontroliniai ėminiai, kuriuose nėra tirpiklio arba dispergento. Papildomi nurodymai dėl dispergentų naudojimo pateikti EBPO rekomendaciniame dokumente (11).

BANDYMO PROCEDŪRA

41. Bandymo procedūra skiriasi atsižvelgiant į bandomosios cheminės medžiagos įterpimo būdą (t. y. per vandeninę ar nuosėdų fazę). Reikėtų atsižvelgti į galimą bandomosios cheminės medžiagos elgesį vandens ir nuosėdų sistemoje, kad būtų galima pasirinkti bandant naudojamą veikimo režimą (t. y. statinį ar pusiau statinio atnaujinimo, sodrinto vandens ar sodrintų nuosėdų). Kartais sodrintų nuosėdų bandymams gali būti teikiama pirmenybė, jei prognozuojama, kad yra reikšmingas cheminių medžiagų pasiskirstymas tarp vandens ir nuosėdų.

Prigijimo tarpsnis

42. Sveikų ūglių viršūnės ar galai, t. y. be šoninių ūglių, atpjaunami nuo pradinės kultūros augalų 6 cm (± 1 cm) ilgio ūgliams gauti. Taikant A bandymo schemą (vienas ūglis viename vazone ir trys vazonai viename inde), į kiekvieną vazoną sodinama po vieną augalo viršūnę. Taikant B bandymo schemą (trys ūgliai viename vazone ir vienas vazonas viename inde), į kiekvieną vazoną su nuosėdomis sodinamos keturios ar penkios augalų viršūnės.

43. Abiem atvejais reikėtų sodinti į papildomus vazonus, kad bandymo pradžiai būtų galima atrinkti vienodus augalus, taip pat turėti atsarginių augalų šaknų augimui patikrinti prieš pat apdorojimą ir atsarginių augalų, kurie būtų nupjauti ūglių biomasei ir ilgiui matuoti nulinę parą.

44. Ūgliai sodinami maždaug į trijų centimetrų gylį žemiau nuosėdų paviršiaus, kad būtų užkasti bent du bambliai.

45. Vazonai pernešami į bandymo indus veikimo tarpsnį atitinkančiomis aplinkos sąlygomis ir septynias paras laikomi Smart ir Barko terpėje, kad pradėtų susidaryti šaknys.

46. Praėjus šiam laikui, reikėtų paimti kelis augalus iš atsarginių vazonų šaknų augimui patikrinti. Jei šaknų augimo požymių nesimato (t. y. nesimato šaknų galų), prigijimo tarpsnį reikėtų pratęsti tiek, kad būtų pastebėtas šaknų augimas. Šis veiksmas yra rekomenduojamas siekiant užtikrinti, kad augalai aktyviai augtų bandymo pradžioje.

▼M7

Vienodos augalinės medžiagos parinkimas

47. Taikant A bandymo schemą (vienas ūglis viename vazone ir trys vazonai viename inde), vazonai atrenkami prieš bandymo pradžią pagal augalų vienodumą. Taikant B bandymo schemą (trys ūgliai viename vazone ir vienas vazonas viename inde), pertekliniai augalai pašalinami, paliekant tris augalus, kurie yra vienodo dydžio ir išvaizdos.

Veikimas per vandeninę fazę

48. Pagal vienodus augalus atrinkti vazonai statomi į bandymo indus, atsižvelgiant į reikiamą bandymo schemą. Į bandymo indus įpilama Smart ir Barko terpės. Reikėtų imtis priemonių, kad būtų išvengta nuosėdų susidrumstimo. Todėl terpę galima pilti į bandymo indus per piltuvą arba ją pilant nuosėdas uždengti plastikiniu disku, jei įpylus terpės diskas būtų nedelsiant išimtas. Arba vazonus su augalais galima statyti į bandymo indus įpylus terpės. Abiem atvejais naujos terpės galima įpilti veikimo tarpsnio pradžioje, jei būtina kiek įmanoma sumažinti galimą dumblių ir bakterijų augimą arba kad būtų galima ruošti atskiras kartotinių ėminių bandymo tirpalų partijas.

49. Ūglių ilgis virš nuosėdų matuojamas prieš įpilant terpę ar jos įpylus.

50. Atitinkami bandomosios cheminės medžiagos kiekiai gali būti įdėti į bandymo terpę prieš ją pilant į bandymo indus. Arba bandomąją cheminę medžiagą galima įdėti į terpę, kai ji jau įpilta į bandymo indus. Šiuo atveju reikėtų imtis priemonių užtikrinti, kad bandomoji cheminė medžiaga vienodai pasiskirstytų po visą bandymo sistemą ir nuosėdos nebūtų sudrumstos.

51. Visais atvejais bandymo pradžioje registruojama terpės išvaizda (pvz., skaidri, drumsta ir kt.).

Veikimas per nuosėdas

52. Pasirinktos koncentracijos sodrintos nuosėdos paprastai ruošiamos tiesiogiai į nuosėdas įpilant bandomosios cheminės medžiagos tirpalo. Dejonizuotame vandenyje ištirpintas bandomosios cheminės medžiagos pradinis tirpalas maišomas su dirbtinėmis nuosėdomis valciniu malūnu, pašarų maišikliu arba rankiniu būdu. Jei bandomoji cheminė medžiaga mažai tirpsta vandenyje, ją galima ištirpinti kuo mažesniame tinkamo organinio tirpiklio (pvz., heksano, acetono ar chloroformo) tūryje. Šis tirpalas maišomas su maždaug 10 g smulkaus kvarco smėlio vienam bandymo indui. Palaukiama, kol išgaruos tirpiklis, ir smėlis sumaišomas su vienai bandymo stiklinei numatytu nuosėdų kiekiu. Galima naudoti tik labai lakias medžiagas bandomajai cheminei medžiagai soliubilizuoti, disperguoti ar emulguoti. Reikėtų turėti omenyje, kad į bandomąja chemine medžiaga sodrinto smėlio tūrį ar masę būtina atsižvelgti galutinai ruošiant nuosėdas (t. y. jas reikėtų ruošti imant mažiau smėlio). Reikėtų imtis priemonių užtikrinti, kad į nuosėdas įterpta bandomoji cheminė medžiaga būtų visiškai ir tolygiai paskirstyta nuosėdose.

53. Sodrintos nuosėdos supilamos į vazonus (kaip aprašyta pirmiau). Dėl vienodumo ir tinkamos šaknų sistemos pasirinkti augalai išimami iš prigijimo tarpsniu naudotų vazonų ir persodinami į sodrintas nuosėdas, kaip aprašyta pirmiau.

54. Vazonai pagal reikiamą bandymo schemą statomi į bandymo indus. Atsargiai įpilama Smart ir Barko terpės (t. y. per piltuvą), kad nuosėdos nesusidrumstų. Ūglių ilgis virš nuosėdų matuojamas prieš įpilant terpę ar jos įpylus.

▼M7

Vandens lygio užtikrinimas visą bandymo trukmę

55. Turi būti registruojamas galutinis vandens tūris ir ant kiekvieno bandymo indo pažymimas vandens lygis. Jei atliekant bandymą išgaruoja daugiau nei 10 % vandens, vandens lygis turėtų būti reguliuojamas distiliuotu vandeniu. Prireikus chemines stiklines galima nesandariai pridengti permatomu dangčiu, pvz., skaidriais plastikiniais dangčiais, kad būtų kuo mažesnis garavimas ir užteršimas dumblių sporomis.

Bandymo sąlygos

56. Reikėtų naudoti šiltą ir (arba) šaltą baltos spalvos fluorescencinių lempų apšvietimą, kurio energinė apšvieta būtų apie 140 (± 20) $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$, kai matuojama kaip aktyvioji fotosintezės spinduliuotė (400–700 nm) vandens paviršiuje ir taikomas šviesos bei tamsos 16:8 h santykis. Energinės apšvietos virš bandymo vietos skirtumas neturėtų būti didesnis kaip ± 15 % pasirinktos vertės.

57. Temperatūra bandymo induose yra 20 ± 2 °C.

58. Bandymo metu kontrolinių ėminių terpės pH neturėtų padidėti daugiau kaip 1,5 vieneto. Tačiau didesnis nei 1,5 vieneto nuokrypis nesumažintų bandymo vertės, jei būtų galima įrodyti, kad vykdomi pirmiau nurodyti tinkamumo kriterijai.

Bandymo trukmė

59. Veikimo trukmė – 14 parų.

Matavimai ir analiziniai nustatymai

60. Pasibaigus prigijimo tarpsniui ir prieš pat apdorojimą (t. y. 0 parą), atsarginiai augalai iš penkių atsitiktinai atrinktų vazonų, taikant trijų augalų viename vazone schemą, ar iš 15 vazonų, taikant vieno augalo viename vazone schemą, yra nupjaunami ūglių ilgiui ir žaliosios bei sausos medžiagos masei įvertinti, kaip aprašyta toliau.

61. Veikimo tarpsniui skirti augalai vertinami taip, kaip pateikta 1 lentelėje:

— pagrindinio ūglio ilgis ir šoninių ūglių skaičius registruojamas bent veikimo laikotarpio pabaigoje (pvz., 14 parą);

— augalų sveikata vizualiai įvertinama veikimo laikotarpiu bent tris kartus (pvz., 0, 7 ir 14 parą);

— ūglių žaliosios ir sausos medžiagos masė įvertinama bandymo pabaigoje (pvz., 14 parą).

62. Ūglių ilgis matuojamas liniuote. Jei yra šoninių ūglių, juos reikėtų suskaičiuoti ir išmatuoti jų ilgį.

63. Augalų sveikata įvertinama vizualiai, registruojant augalų išvaizdą ir bendrąją bandymo terpės būseną. Reikėtų pažymėti tokius pastebėtus dalykus:

— nekrozę, chlorozę arba spalvos pakitimą, pvz., didesnį paraudimą palyginti su kontroliniais augalais;

— bakterijų arba dumblių taršos plitimą;

— augimo sutrikimus, pvz., lėtą augimą, pakitusį tarpubamblių ilgį, deformuotus ūglius ir (arba) lapus, šoninių ūglių skaičiaus didėjimą, lapų kritimą, turgorą ir stiebo fragmentavimą;

▼M7

— šaknų sveikumą, kuris vizualiai stebimas baigus bandymą, atsargiai nuplovus nuosėdas nuo šaknų, kad būtų galima stebėti šaknų sistemą. Siūloma tokia vertinimo palyginti su kontroliniais augalais skalė:

1) šaknų nėra;

2) kelios šaknys;

3) vidutiniškai išsivysčiusios šaknys;

4) labai gerai išsivysčiusios šaknys, panašiai kaip kontrolinių augalų.

64. Žaliosios medžiagos masė vertinama bandymo pradžioje ir pabaigoje, nupjaunant ūglį nuosėdų lygyje ir jį pasveriant, sausai nušluosčius filtravimo popieriumi. Reikėtų imtis priemonių pašalinti nuosėdų daleles, kurios gali prilipti prie ūglio pagrindo. Paskui ūglių medžiaga dedama į džiovinimo spintą, kurios temperatūra maždaug 60 °C, džiovinama iki pastoviosios masės ir registruojama sausos medžiagos masė.

65. Biologinio vertinimo atliekant bandymus minimalių reikalavimų santrauka pateikta 1 lentelėje.

1 lentelė

Vertinimo tvarkaraštis

Para po apdorojimo (PPA)	*Myriophyllum spicatum*			
	Ūglių ilgis, šoninių ūglių ilgis ir skaičius	Vizualus ūglių vertinimas	Ūglių žaliosios ir sausos medžiagos masė, vizualus šaknų vertinimas	pH O_2
0	V	V	V	V
4	—	—	—	—
7	—	V	—	V
14	V	V	V	V

V – rodo, kad tai yra vertinimo laikas;
— – rodo, kad matavimų nereikia atlikti.

Matavimų ir analizinių nustatymų dažnumas

66. Terpės temperatūra papildomame inde, kuris laikomas tokiomis pačiomis auginimo kameros, inkubatoriaus arba patalpos sąlygomis, turėtų būti registruojama bent kartą per dieną (arba nuolat duomenų registravimo įtaisu).

67. Bandymo terpės pH ir ištirpusio deguonies koncentracija turėtų būti tikrinama visuose kartotinių ėminių induose bandymo pradžioje, ne mažiau kaip vieną kartą tyrimo metu ir jį baigus. Kiekvieną kartą reikėtų matuoti tuo pačiu paros metu. Jei kiekvienos bandymo koncentracijos tirpalams paruošti naudojami pradiniai tirpalai, pakanka išmatuoti tik pradinių tirpalų koncentraciją nulinę parą.

68. Energinę apšvietą reikėtų matuoti augimo kameroje, inkubatoriuje ar patalpoje vandens paviršiaus lygį atitinkančiuose taškuose. Matuojama bent vieną kartą bandymo pradžioje arba bandymo metu. Šviesos aptikimo ir matavimo metodas, ypač jutiklio tipas, turės įtakos išmatuotai vertei. Sferiniai jutikliai

▼M7

(kurie reaguoja į šviesą, krintančią iš visų kampų aukščiau ir žemiau matavimo plokštumos) ir „kosinusiniai“ jutikliai (kurie reaguoja į šviesą, krintančią iš visų kampų aukščiau matavimo plokštumos) yra geresni nei vienos krypties jutikliai, ir šiame bandyme aprašytam daugiataškio šviesos šaltinio tipui bus gaunami didesni rodmenys.

Bandomosios cheminės medžiagos analiziniai matavimai

69. Reikėtų ne tik tinkamai įterpti bandomąją cheminę medžiagą, bet ir atlikti jos koncentracijos analizinius matavimus.

70. Vandens ėminiai turėtų būti imami bandomosios cheminės medžiagos kiekvienai koncentracijai nustatyti netrukus po bandymo pradžios (t. y. per pirmą patvarių bandomųjų cheminių medžiagų įterpimo parą arba per vieną valandą, jei cheminės medžiagos nepatvarios) ir baigus bandymą.

71. Koncentracija nuosėdose ir nuosėdų porų vandenyje turėtų būti nustatoma bandymo pradžioje ir jį baigus, bent jau didžiausia bandymo koncentracija, nebent būtų žinoma, kad bandomosios cheminės medžiagos yra patvarios vandenyje (> 80 % nominaliosios koncentracijos). Koncentracijos matavimų nuosėdose ir nuosėdų porų vandenyje gali neprireikti, jei bandomosios cheminės medžiagos pasiskirstymas tarp vandens ir nuosėdų buvo aiškiai nustatytas, atlikus vandens ir nuosėdų sistemos tyrimą palyginamomis sąlygomis (pvz., nuosėdų ir vandens santykis, įterpimo būdas, nuosėdų tipas).

72. Nuosėdų ėminių ėmimas bandymo pradžioje gali sutrikdyti bandymo sistemą. Todėl gali prireikti papildomų bandymo indų analizės matavimams palengvinti bandymo pradžioje ir pabaigoje. Panašiai, jei manoma, kad būtinas tarpinis įvertinimas, t. y. 7 parą, ir analizuoti reikia didelius nuosėdų ėminius, kuriuos nėra paprasta paimti iš bandymo sistemos, analizinius matavimus reikėtų atlikti naudojant papildomus bandymo indus, kurie apdorojami tuo pačiu būdu, kaip biologiniam vertinimui naudojami indai.

73. Jei reikia atskirti porų vandenį, rekomenduojama procedūra yra 30 min trukmės centrifugavimas, pvz., esant 10 000 *g* ir 4 °C temperatūroje. Tačiau galima filtruoti, jei įrodoma, kad filtras nesugeria bandomosios cheminės medžiagos. Tam tikrais atvejais gali būti neįmanoma analizuoti porų vandens koncentracijos, nes ėminys yra per mažas.

74. Jei atliekant pusiau statinius bandymus (t. y. veikimą per vandeninę fazę) nesitikima, kad atitinkamos (-ų) bandomosios (-ųjų) cheminės (-ių) medžiagos (-ų) koncentraciją būtų galima užtikrinti 20 % tikslumu visą bandymo trukmę, neatnaujinant bandymo tirpalų, su kiekvienu atnaujinimu reikėtų paimti panaudotų ir naujai paruoštų bandymo tirpalų ėminius bandomosios cheminės medžiagos analizei atlikti.

75. Tais atvejais kai išmatuota pradinė bandomosios medžiagos koncentracija neatitinka nominaliosios koncentracijos 20 % tikslumu, bet galima pateikti pakankamai įrodančių duomenų, kad pradinės koncentracijos vertės yra atkartojamos ir pastovios (t. y. atitinka 80–120 % pradinės koncentracijos intervalą), galima atlikti tik didžiausios ir mažiausios bandymo koncentracijos tirpalų cheminę analizę.

76. Visais atvejais bandomosios cheminės medžiagos koncentracija turi būti nustatoma tik viename kiekvienos bandymo koncentracijos kartotinio ėminio inde. Arba kiekvienos koncentracijos visų kartotinių ėminių bandymo tirpalai gali būti sujungti analizei atlikti.

77. Jei yra įrodymų, kad nominalioji ar išmatuota pradinė bandomosios cheminės medžiagos koncentracija visą bandymo trukmę buvo užtikrinta 20 % tikslumu, rezultatų analizė ir vėliau atliekamas vertinamųjų verčių gavimas gali būti pagrįstas nominaliomis ar išmatuotomis pradinėmis vertėmis.

▼M7

78. Šiais atvejais poveikio koncentracijos vertės turėtų būti pagrįstos nominaliomis ar išmatuotomis koncentracijos vandenyje pradinėmis vertėmis.

79. Tačiau, jei yra įrodymų, kad koncentracija bandymo metu sumažėjo (nuokrypis nuo nominaliosios arba išmatuotos pradinės koncentracijos apdorojimo skyriuje yra didesnis kaip 20 %), rezultatų analizė turėtų būti pagrįsta veikimo laikotarpio koncentracijos geometriniu vidurkiu arba reikėtų taikyti modelius, kurie aprašytų bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos apdorojimo skyriuje mažėjimą (11).

DUOMENŲ ĮVERTINIMAS

80. Jei reikia naudoti tirpiklį arba dispergentą, tirpiklio ir neapdorotų kontrolinių ėminių duomenis galima sujungti, kad būtų galima atlikti statistinę analizę, kai tirpiklio ir neapdorotų kontrolinių ėminių atsakų skirtumas nėra statistiškai reikšmingas.

Atsako kintamieji

81. Bandymo tikslas – nustatyti cheminės medžiagos poveikį bandymo rūšies vegetatyviniam augimui, naudojant du atsako kintamuosius, vidutinį savitąjį augimo greitį ir išeigą, taip:

Vidutinis savitasis augimo greitis

82. Šis atsako kintamasis yra pagrįstas kontrolinių ėminių ir kiekvienos apdorotų ėminių grupės bendro ūglių ilgio, bendros žaliosios medžiagos masės ir bendros sausos medžiagos masės logaritmo laikiniu kitimu. Šis kintamasis yra apskaičiuojamas kiekvienos kontrolinės ir apdorotų ėminių grupės kiekvienam kartotiniam ėminiui. Trijų augalų vienam bandymo indui (kartotinio ėminio) vidutinį ilgį bei masę ir vėliau kiekvieno kartotinio ėminio augimo greitį reikėtų apskaičiuoti taikant šią formulę:

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

čia:

μ_{i-j} – vidutinis savitasis augimo greitis per laiką nuo i iki j;

N_i – bandymo arba kontrolinio indo matuojamas kintamasis laiku i;

N_j – bandymo arba kontrolinio indo matuojamas kintamasis laiku j;

t – laikotarpis nuo i iki j.

83. Pagal kartotinių ėminių atsakus reikėtų apskaičiuoti kiekvienos apdorotų ėminių ir kontrolinės grupės augimo greičio vidutinę vertę ir dispersijos įverčius.

84. Turėtų būti apskaičiuotas viso bandymo laikotarpio (pirmiau pateiktoje formulėje i yra bandymo pradžios laikas, j – bandymo pabaigos laikas) vidutinis savitasis augimo greitis. Kiekvienai bandymo koncentracijai ir kontroliniam ėminiui apskaičiuojama vidutinio savitojo augimo greičio vidutinė vertė ir dispersijos įverčiai.

▼M7

85. Kiekvienos bandymo koncentracijos (apdorotų ėminių grupės) augimo greičio mažėjimas procentais (I_r) gali būti apskaičiuotas pagal šią lygtį:

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

čia:

% I_r vidutinio savitojo augimo greičio mažėjimas procentais;

μ_C kontrolinio ėminio vidutinė μ vidutinė vertė;

T apdorotų ėminių grupės μ vidutinė vertė.

Išeiga

86. Šis atsako kintamasis yra pagrįstas kontrolinių ėminių ir kiekvienos apdorotų ėminių grupės bendro ūglių ilgio, bendros žaliosios medžiagos masės ir bendros sausos medžiagos masės laikinis kitimas. Kiekvienos apdorotų ėminių grupės vidutinį išeigos mažėjimą procentais (% I_y) galima apskaičiuoti taip:

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

čia:

% I_y išeigos mažėjimas procentais;

b_C kontrolinių ėminių grupės galutinės ir pradinės biomasės skirtumas;

b_T apdorotų ėminių grupės galutinės ir pradinės biomasės skirtumas.

Koncentracijos ir atsako priklausomybės kreivių gavimas

87. Reikėtų gauti koncentracijos ir atsako kreives, kurios susieja atsako kintamojo vidutinį mažėjimą procentais (I_r ar I_y, apskaičiuotą, kaip nurodyta pirmiau) ir bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos logaritmą.

EC_x įvertinimas

88. EC_x įverčius (pvz., EC_{50}) reikėtų gauti pagal vidutinį savitąjį augimo greitį (E_rC_x) ir išeigą (E_yC_x), kurių kiekvieną reikėtų gauti pagal ūglio bendrą žaliosios medžiagos masę, ūglio bendrą sausos medžiagos masę ir bendrą ūglių ilgį.

89. Reikėtų pažymėti, kad negalima lyginti EC_x verčių, apskaičiuotų taikant šiuos du atsako kintamuosius, ir į šį skirtumą atsižvelgiama naudojant bandymo rezultatus. Jei laikomasi šio bandymų metodo sąlygų, EC_x vertės, gautos pagal savitąjį augimo greitį (E_rC_x), paprastai bus didesnės nei išeiga pagrįsti rezultatai (E_yC_x, dėl atitinkamo metodo matematinio pagrindimo. Tai reikėtų aiškinti kaip dviejų atsako kintamųjų jautrio skirtumą, tiesiog vertės skiriasi matematiškai.

Statistinės procedūros

90. Tikslas – gauti kiekybinę koncentracijos ir atsako priklausomybę, taikant regresinę analizę. Galima taikyti svertinę tiesinę regresiją, atlikus atsako duomenų tiesinamąjį transformavimą, pvz., į probito, logito arba Weibullo vienetus (13), bet geresnės yra netiesinės regresijos metodų procedūros, kurias taikant geriau apdorojami neišvengiami duomenų netolygumai ir nukrypimai nuo tolygiųjų skirstinių. Artėjant į nulinį arba visišką slopinimą, tokie

▼M7

netolygumai dėl transformavimo gali padidėti ir trukdyti analizei (13). Reikėtų pažymėti, kad tipiniai analizės metodai, taikant probit, logit arba Weibullo transformaciją, yra skirti dichotominiams (pvz., mirtingumas arba išgyvenamumas) duomenims ir turėtų būti modifikuojami, norint juos pritaikyti augimo arba išeigos duomenims. Specifinės EC_x verčių nustatymo pagal tolydžiuosius duomenis procedūros yra pateiktos (14)(15) (16) (17).

91. Kiekvienam analizuojamam atsako kintamajam naudojama koncentracijos ir atsako priklausomybė EC_x verčių taškiniams įverčiams apskaičiuoti. Nustatomos kiekvieno įverčio 95 % pasikliovimo ribos, o atsako duomenų suderintumas su regresijos modeliu turėtų būti įvertintas grafiškai arba statistiškai. Regresinė analizė turėtų būti atliekama naudojant atskirus kartotinių ėminių atsakus, bet ne apdorotų ėminių grupių vidurkius.

92. Be to, jei turimi regresijos modeliai ar metodai netinka duomenims, EC_{50} įverčiai ir pasikliovimo ribos gali būti gautos taikant tiesinį interpoliavimą su saviranka (įkėla)(18).

93. Norint įvertinti LOEC, taigi ir NOEC, reikia palyginti apdorotų ėminių vidutines vertes, taikant dispersinės analizės (ANOVA) metodus. Tuomet kiekvienai koncentracijai gautas vidurkis lyginamas su kontrolinio ėminio vidurkiu, taikant atitinkamą tikrinimo metodą (pvz., Dunnett, Williams kriterijus) (19) (20) (21) (22). Būtina įvertinti, ar galioja ANOVA normalaus pasiskirstymo ir dispersijos vienalytiškumo prielaida. Šį vertinimą reikėtų atlikti taikant Shapiro-Wilks kriterijų (dėl normalaus pasiskirstymo) ar Levene kriterijų (dėl dispersijų vienalytiškumo). Neatitiktį prielaidai dėl normalaus pasiskirstymo ir dispersijų vienalytiškumo kartais galima pataisyti atliekant duomenų logaritminį transformavimą. Jei dispersijos nevienalytiškumas ir (arba) nukrypimas nuo normalaus pasiskirstymo yra labai didelis ir jo neįmanoma pataisyti transformavimo keliu, reikėtų nagrinėti galimybę taikyti kitus analizės metodus, pvz., taikant Bonferroni-Welch t kriterijų, Jonkheere Terpstra kriterijų mažėjimo tvarka ir Bonferroni medianos kriterijų. Papildomus nurodymus dėl NOEC nustatymo galima rasti (16).

ATASKAITOS RENGIMAS

94. Bandymo ataskaitą sudaro ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga

Vienkomponentė cheminė medžiaga:

— fizinė išvaizda, tirpumas vandenyje ir papildomos būdingos fizikinės ir cheminės savybės;

— cheminio identifikavimo duomenys, pvz., IUPAC ar CAS pavadinimas, CAS numeris, SMILES žymėjimas ar InChI kodas, struktūrinė formulė, grynumas, cheminis priemaišų pavadinimas, jei tinka bei praktiškai įmanoma ir kt.;

Daugiakomponentė medžiaga, UVCB ir mišiniai:

— kuo išsamesnis sudedamųjų dalių apibūdinimas, nurodant cheminį pavadinimą (žr. pirmiau), kiekybinį paplitimą ir būdingas fizikines ir chemines savybes.

Bandymo rūšis

— mokslinis pavadinimas ir šaltinis.

Bandymo sąlygos

— prigijimo tarpsnio trukmė ir sąlygos;

— taikyta bandymo procedūra (statinio ar pusiau statinio bandymo);

▼M7

— bandymo pradžios data ir jų trukmė;

— bandymo terpė, t. y. nuosėdos ir skystoji mitybinė terpė;

— bandymo schemos aprašymas: auginimo kamera ar patalpa arba laboratorija, bandymo indai ir dangčiai, tirpalų tūriai, vieno bandymo indo bandymo augalų ilgis ir masė bandymo pradžioje; nuosėdų paviršiaus ir vandens paviršiaus santykis, nuosėdų ir vandens tūrio santykis;

— bandymo koncentracijos vertės (nominaliosios ir išmatuotos, jei tinka) vienos koncentracijos kartotinių ėminių skaičius;

— pradinių ir bandymo tirpalų ruošimo metodai, įskaitant naudojamus tirpiklius ar dispergentus;

— temperatūra bandymo metu,

— šviesos šaltinis, energinė apšvieta ($\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$);

— apdorotų ir kontrolinių ėminių terpės pH vertės, taip pat bandymo terpių išvaizda bandymo pradžioje ir pabaigoje;

— deguonies koncentracija;

— analizės metodas ir atitinkami jo kokybės vertinimo duomenys (tinkamumo patvirtinimo tyrimai, analizės rezultatų standartiniai nuokrypiai arba pasikliovimo ribos);

— matuojamų kintamųjų, pvz., ilgio, sausos medžiagos masės, žaliosios medžiagos masės, nustatymo metodai;

— visi nukrypimai nuo šio bandymų metodo.

Rezultatai

— neapdoroti duomenys: vieno vazono augalų ūglių ilgis ir ūglių masė ir kiti kiekvieno bandymo ir kontrolinio indo matuojami kintamieji kiekvienu stebėjimo momentu ir analizės pagal 1 lentelėje pateiktą vertinimo tvarkaraštį data;

— kiekvieno matuojamo kintamojo vidurkis ir standartinis nuokrypis,

— kiekvienai koncentracijai gautos augimo kreivės;

— kontroliniams augalams gauta dvigubėjimo trukmė ir (arba) augimo greitis, nustatytas pagal ūglių ilgį ir žaliosios medžiagos masę, įskaitant žaliosios medžiagos masės išeigos variacijos koeficientą;

— apskaičiuoti kiekvieno apdoroto kartotinio ėminio atsako kintamieji, jų vidutinės vertės ir kartotinių ėminių variacijos koeficientas;

— grafinis koncentracijos ir poveikio priklausomybės vaizdas;

— toksiškumo vertinamųjų baigčių įverčiai pagal atsako kintamuosius, pvz., EC_{50}, ir susiję pasikliovimo intervalai. Jei buvo apskaičiuotos, LOEC ir NOEC vertės ir jų nustatymo statistiniai metodai;

— jei buvo taikytas dispersinės analizės metodas ANOVA, poveikio, kurį galima aptikti, dydis (pvz., mažiausiais reikšmingas skirtumas);

— augimo skatinimas, nustatytas kurios nors koncentracijos ėminiui,

▼M7

— visi stebimi fitotoksiškumo požymiai ir bandymo tirpalų stebėjimo duomenys;

— rezultatų aptarimas, įskaitant poveikį bandymo rezultatams dėl nukrypimų nuo šio bandymų metodo.

LITERATŪRA

(1) Šio priedo C.26 skyrius. *Lemna rūšių augalų augimo slopinimo bandymas*.

(2) Šio priedo C.3 skyrius. Gėlavandenių dumblių ir melsvabakterių augimo slopinimo bandymas.

(3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008.

(4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, pp. 199-206.

(5) ISO 16191:2013 Water quality – Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of Myriophyllum aquaticum.

(6) Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, Vol. 62/8, pp. 715-722.

(7) Šio priedo C.50 skyrius. Toksiškumo *Myriophyllum spicatum* bandymas sistemoje be nuosėdų.

(8) Šio priedo C.28 skyrius. Toksiškumo bandymas su chironomidais nuosėdose ir vandenyje, naudojant vandenį su įterpta bandomąja chemine medžiaga.

(9) Ratte, M., H. Ratte (2014), „Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using M. aquaticum and M. spicatum grown in a water-sediment system“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris.

(10) Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, pp. 231 – 237.

(11) OECD (2000), „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

(12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, Vol. 21/3, pp. 251-263.

(13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, Vol. 18/9, pp. 713-718.

(14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/2, pp. 157-167.

(15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/10, 1485-1494.

(16) OECD (2006), „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

(17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, Vol. 29/2, pp/ 93-96.

▼**M7**

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

(19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of the American Statistical Association, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

(20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, Vol. 20/3, pp. 482-491.

(21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, Vol. 28/2, pp. 519-531.

▼**M7**

1 priedėlis

SMART IR BARKO TERPĖS SUDĖTIS

Komponentas	Į vandenį įdėto reagento kiekis (*) (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	91,7
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	69,0
$NaHCO_3$	58,4
$KHCO_3$	15,4
pH (pusiausvyroje su oru)	7,9

(*) demineralizuotas (t. y. distiliuotas ar dejonizuotas) vanduo.

▼M7

2 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Biomasė – populiacijos gyvosios medžiagos masė, išreiškiama kaip žaliosios ir (arba) sausos medžiagos masė. Šiame bandyme biomasė yra pagrindinio ūglio, visų šoninių šakų ir visų šaknų masė.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

Chlorozė – bandymo organizmo, ypač žiedų vainikų, spalvos pasikeitimas iš žalios į gelsvą.

EC_x – bandymo terpėje ištirpusios bandomosios cheminės medžiagos koncentracija, kuriai esant *Myriophyllum spicatum* augimo greitis per nustatytą veikimo laikotarpį (jo trukmę būtina tiksliai nurodyti, jei skiriasi nuo visos ar įprastinės bandymo trukmės) sumažėja x % (pvz., 50 %). EC vertei, gautai pagal augimo greitį arba pagal išeigą, vienareikšmiškai žymėti vartojami simboliai „E_rC“ augimo greičiui ir „E_yC“ išeigai, toliau nurodant naudotą matuojamą kintamąjį, pvz., E_rC (pagrindinio ūglio ilgis).

Augimas – matuojamo kintamojo didėjimas, pvz., pagrindinio ūglio ilgio, bendro šoninių šakų ilgio, bendro ūglių ilgio, bendro šaknų ilgio, žaliosios medžiagos masės, sausos medžiagos masės arba žiedų vainikų skaičiaus, bandymo laikotarpiu.

Augimo greitis (vidutinis savitasis augimo greitis) – matuojamo kintamojo logaritminis padidėjimas veikimo laikotarpiu. *Pastaba*. Su augimo greičiu susiję atsako kintamieji nepriklauso nuo bandymo trukmės, jei neveikiamų kontrolinių organizmų augimo schema yra eksponentinė.

Mažiausia stebimo poveikio koncentracija (LOEC) – mažiausia bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant medžiagos poveikis augimo mažėjimui per nustatytą veikimo laikotarpį yra statistiškai reikšmingas palyginti su kontroliniais ėminiais (kai $p < 0,05$). Tačiau esant visoms didesnėms nei LOEC bandymo koncentracijos vertėms, kenksmingas poveikis turėtų būti lygus arba didesnis nei poveikis, kuris būtų esant LOEC. Kai negalima įvykdyti šių dviejų sąlygų, turėtų būti pateiktas išsamus paaiškinimas, kaip buvo pasirinkta LOEC (taigi ir NOEC) vertė.

Matuojami kintamieji – visų tipų kintamieji, kurie yra matuojami bandymo vertinamajai baigčiai išreikšti, naudojant vieną arba daugiau skirtingų atsako kintamųjų. Šiame bandymų metode matuojami kintamieji yra pagrindinio ūglio ilgis, bendras šoninių šakų ilgis, visas ūglių ilgis, bendras šaknies ilgis, žaliosios medžiagos masė, sausos medžiagos masė ir žiedų vainikų skaičius.

Monokultūra – vienos rūšies augalų kultūra.

Nekrozė – bandymo organizmo žuvęs audinys (t. y. baltas arba tamsiai rudas).

Nestebimo poveikio koncentracija NOEC – vos mažesnė nei LOEC bandymo koncentracija.

Atsako kintamasis – toksiškumui įvertinti naudojamas kintamasis, gautas pagal bet kurį nors iš matuojamų kintamųjų, skirtingais apskaičiavimo metodais apibūdinančių biomasę. Šiame bandymų metode augimo greitis ir išeiga yra atsako kintamieji, gauti pagal matuojamus kintamuosius, pvz., pagrindinio ūglio ilgį, bendrą ūglių ilgį, žaliosios medžiagos masę, sausos medžiagos masę ar žiedų vainikų skaičių.

Pusiau statinis (atnaujinimo) bandymas – bandymas, kurį atliekant bandymo tirpalas periodiškai keičiamas po tam tikro laiko tarpo.

Statinis bandymas – bandymų metodas, kai bandymo tirpalas neatnaujinamas atliekant bandymą.

▼M7

Bandomoji cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys, bandyti pagal šį bandymų metodą.

Bandymo vertinamoji baigtis – bendrasis veiksnys, kurio pokytis veikiant bandomąja chemine medžiaga palyginti su kontroliniu ėminiu yra bandymo tikslas. Šiame bandymų metode vertinamoji baigtis yra augimo slopinimas, kuris gali būti išreikštas skirtingais atsako kintamaisiais, pagrįstais vienu arba daugiau matuojamų kintamųjų.

Bandymo terpė – visiškai paruošta sintetinė kultūros terpė, kurioje auga bandymo augalai, kai jie veikiami bandomąja chemine medžiaga. Bandomoji cheminė medžiaga paprastai yra ištirpinta bandymo terpėje.

UVCB – nežinomos ar kintamos sudėties medžiagos, sudėtingųjų reakcijų produktai ar biologinės medžiagos.

Išeiga – matuojamo kintamojo, naudojamo biomasės kiekiui išreikšti, vertės veikimo pabaigoje ir jo vertės veikimo pradžioje skirtumas. Pastaba. Kai neveikiamų organizmų augimo schema yra eksponentinė, išeiga pagrįsti atsako kintamieji bandymo eigoje mažės.