Šis dokumentas yra skirtas tik informacijai, ir institucijos nėra teisiškai atsakingos už jo turinį

►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

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)

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 2006 m. gruodžio 18 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH), įsteigiantį Europos cheminių medžiagų agentūrą, iš dalies keičiantį Direktyvą 1999/45/EB bei panaikinantį 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 ([1]), ypač į jo 13 straipsnio 3 dalį,

kadangi:

(1) Remiantis Reglamentu (EB) Nr. 1907/2006, Bendrijos lygmeniu reikia nustatyti bandymų metodus, kurie būtų taikomi tais atvejais, kai norint surinkti informaciją apie cheminių medžiagų savybes būtina atlikti cheminių medžiagų bandymus.

(2) 1967 m. birželio 27 d. Tarybos direktyvos 67/548/EEB dėl įstatymų ir kitų teisės aktų, reglamentuojančių pavojingų medžiagų klasifikavimą, pakavimą ir ženklinimą etiketėmis, suderinimo ([2]) V priede nustatyti cheminių medžiagų bei preparatų fizikinių ir cheminių savybių, toksiškumo ir ekotoksiškumo nustatymo metodai. Direktyvos 67/548/EEB V priedas išbrauktas Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2006/121/EB, kuri bus taikoma nuo 2008 m. birželio 1 d.

(3) Direktyvos 67/548/EEB V priede nurodytus bandymų metodus reikėtų įtraukti į šį reglamentą.

(4) Šiuo reglamentu neuždraudžiama taikyti ir kitų bandymų metodų su sąlyga, kad jie būtų taikomi atsižvelgiant į Reglamento 1907/2006 13 straipsnio 3 dalį.

([1]) OL L 396, 2006 12 30, p. 1, pataisyta OL L 136, 2007 5 29, p. 3.
([2]) OL 196, 1967 8 16, p. 1. Direktyva su paskutiniais pakeitimais, padarytais Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2006/121/EB (OL L 396, 2006 12 30, p. 850, pataisyta OL L 136, 2007 5 29, p. 281) – *įrašyti atitinkamas nuorodas, kai bus paskelbtas 30-asis derinimas su technine pažanga*.

▼C1

(5) Kuriant bandymų metodus reikėtų labai gerai atsižvelgti į bandymų su gyvūnais pakeitimo, patobulinimo ir jų skaičiaus sumažinimo principus, visų pirma tais atvejais, kai tinkamais patvirtintais metodais galima pakeisti, patobulinti bandymus su gyvūnais arba sumažinti jų skaičių.

(6) Šio reglamento nuostatos atitinka pagal Reglamento (EB) Nr. 1907/2006 133 straipsnį įsteigto komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

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

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

▼M4

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

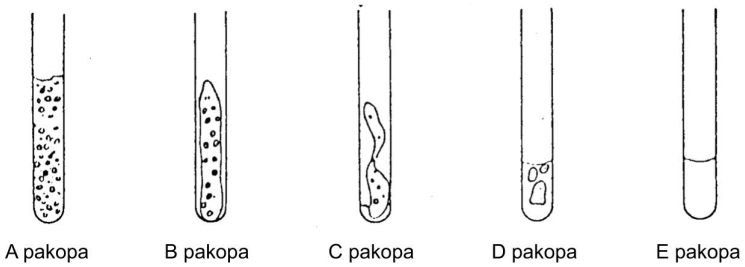
Beveik visų bandymo metodų darbo eiga yra aprašyta tarptautiniuose ir nacionaliniuose standartuose (žr. 1 priedėlį).

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



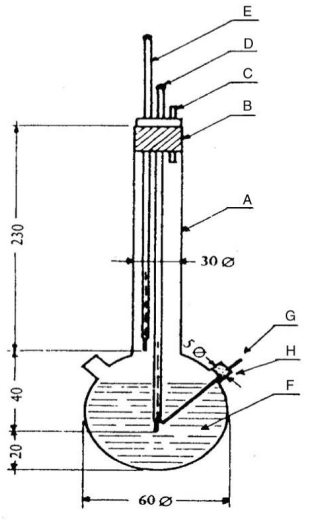
A pakopa	(lydymosi pradžia): smulkūs lašeliai vienodai prilimpa prie vidinės kapiliarinio vamzdelio sienelės
B pakopa	tarp mėginio ir vidinės sienelės atsiranda tarpas dėl lydinio suslūgimo.
C pakopa	suslūgęs mėginys pradeda smukti žemyn ir skystėti.
D pakopa	paviršiuje susidaro meniskas, bet likęs mėginys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



A: Matavimo indas
B: Kamštis
C: Ventiliacijos anga
D: Termometras
E: Papildomas termometras
F: Vonios skystis
G: Stiklinis kapiliaras, 80-100 mm ilgio, vidinis skersmuo - 1,0 ± 0,2 mm sienelės storis-0,2 -0,3 mm
H: Šoninis vamzdelis

▼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,

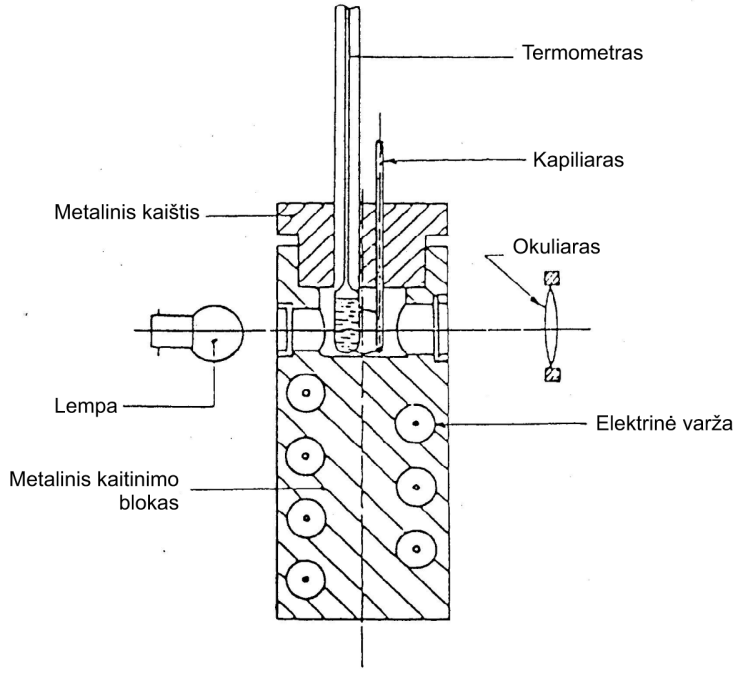
— keturi langeliai iš šilumai atsparaus stiklo išorinėse kameros sienose, esantys visiškai priešingose pusėse statmenai vienas kitam. Priešais vieną iš šių langelių yra mikroskopo okuliaras kapiliariniam vamzdeliui stebėti. Kiti trys langeliai naudojami aparato vidui apšviesti lempomis,

— 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)**

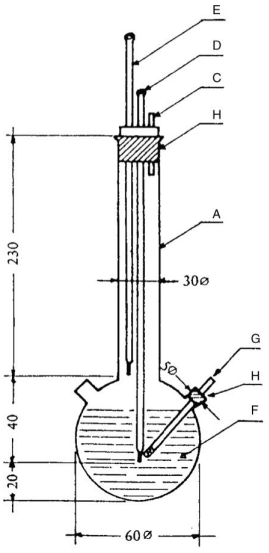
Žr. priedėlį.

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



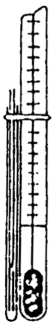
A: Matavimo indas
B: Kamštis
C: Ventiliacijos anga
D: Termometras
E: Papildomas termometras
F: Vonios skystis
G: Mėgintuvėlio vamzdelis, didžiausias išorinis skersmuo - 5 mm; kuriame yra apie 100 mm ilgio kapiliaras, vidinis skersmuo apie 1 mm, o sienelės storis - apie 0,2 - 0,3 mm
H: Šoninis vamzdelis

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

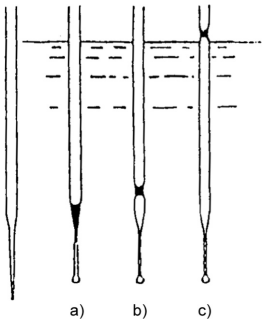
2 pav.

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:

Δp = (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 × 10-6 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 × 10-6 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.

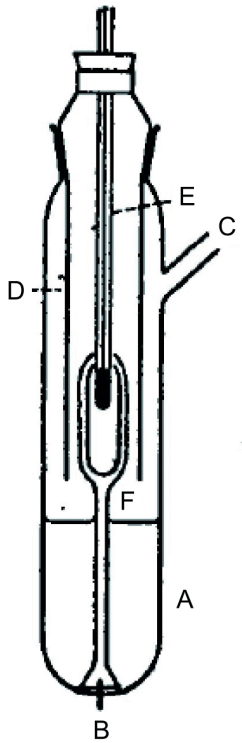
1.5. METODŲ APRAŠYMAS

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

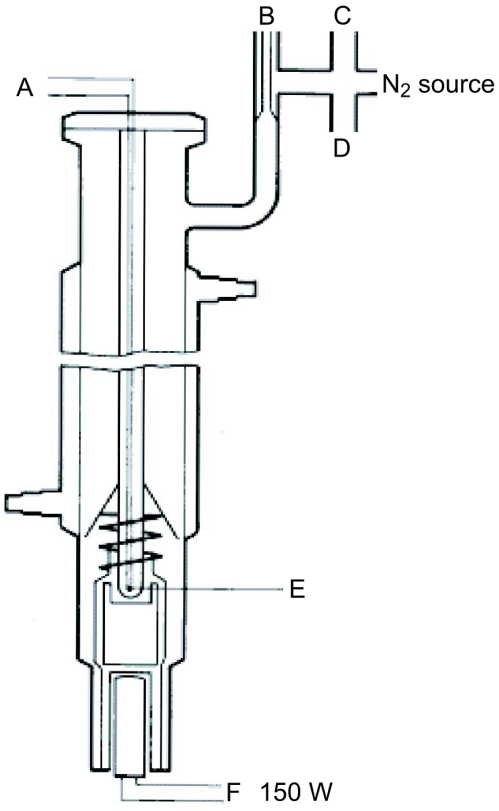
1.5.1.1. *Metodo esmė*

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**

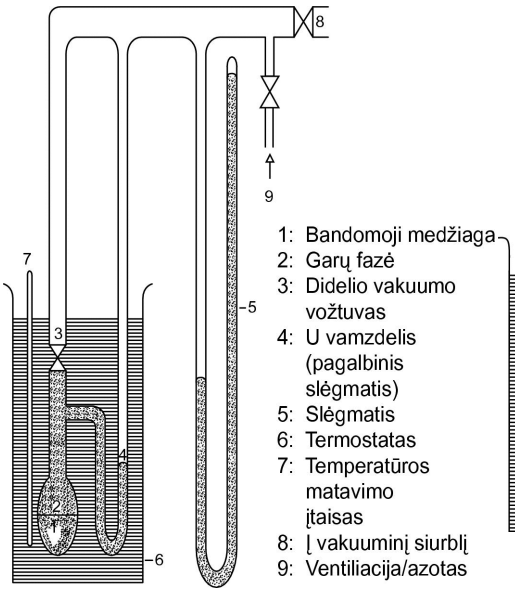
1.5.2.2. *Aparatūra*

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.

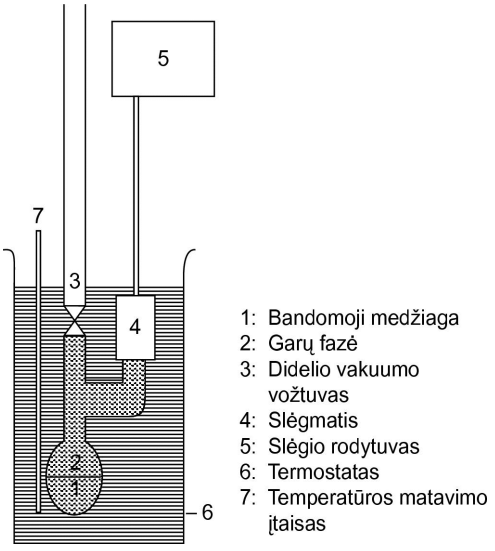
1.5.2.3. *Darbo eiga*

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*

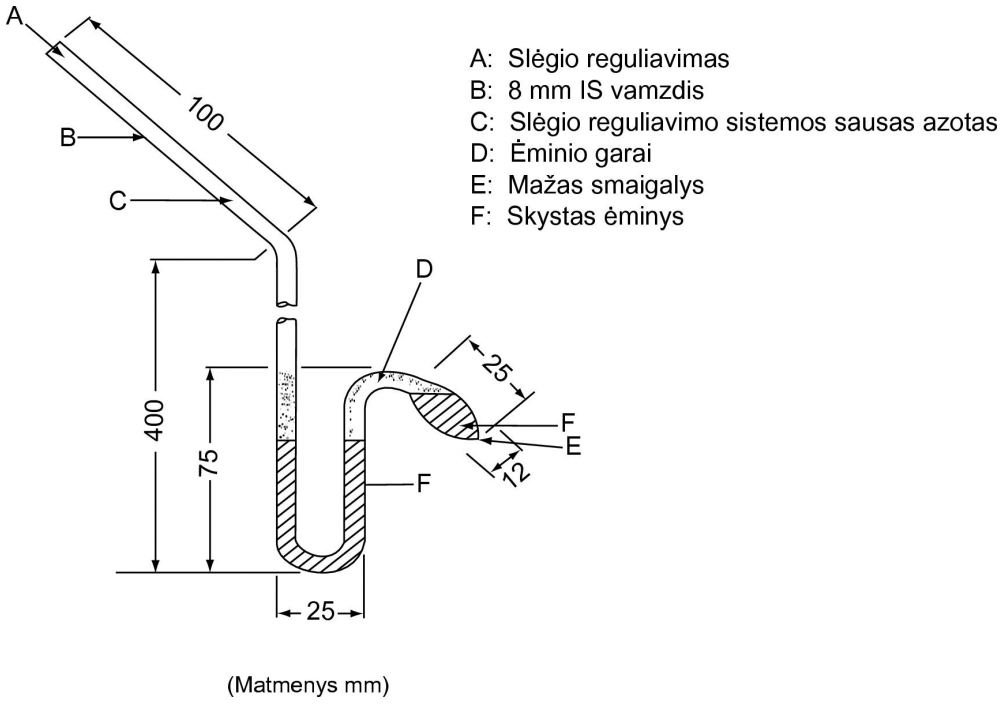
Matavimo įtaiso pavyzdys pavaizduotas 4 paveiksle. Visą aprašymą galima rasti ASTM D 2879–86 (6).

▼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})

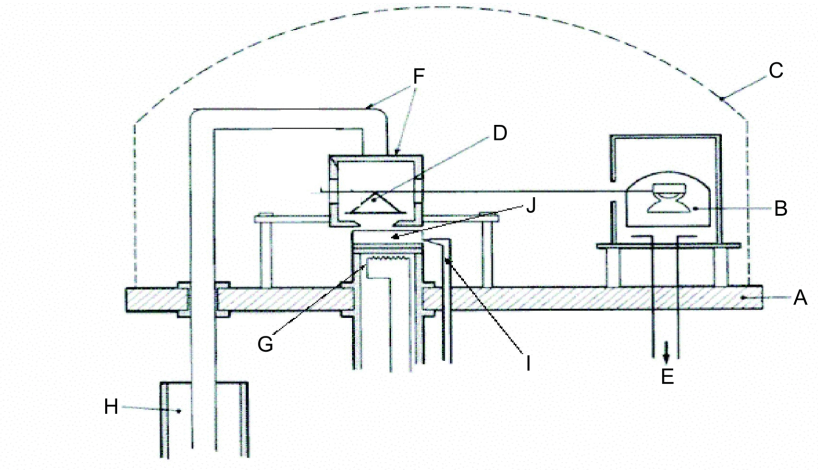
P = garų slėgis (Pa)

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**

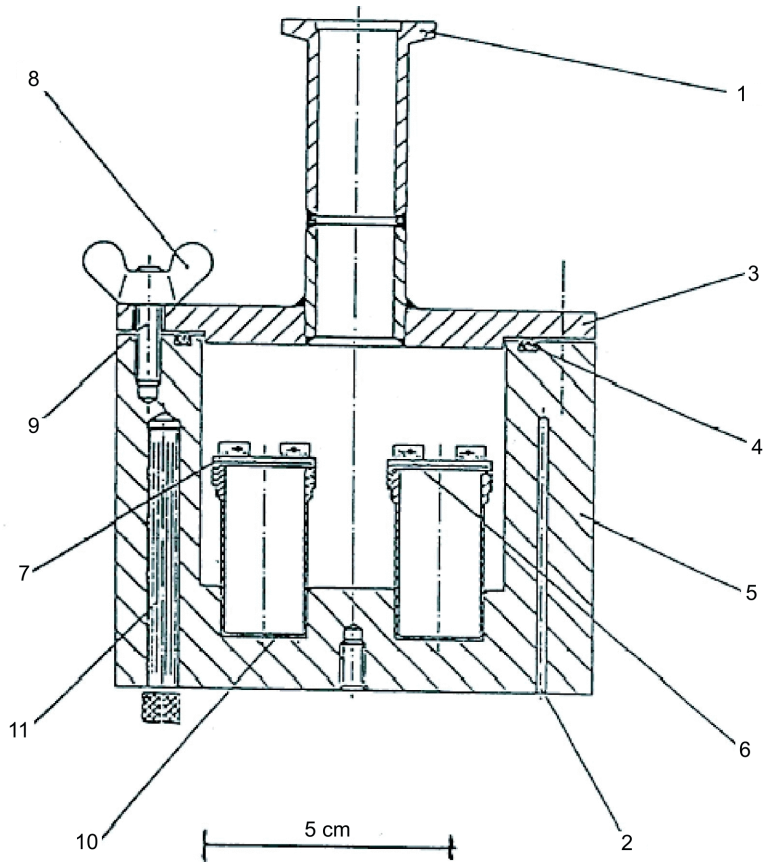
1.5.5.1. *Metodo esmė*

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**

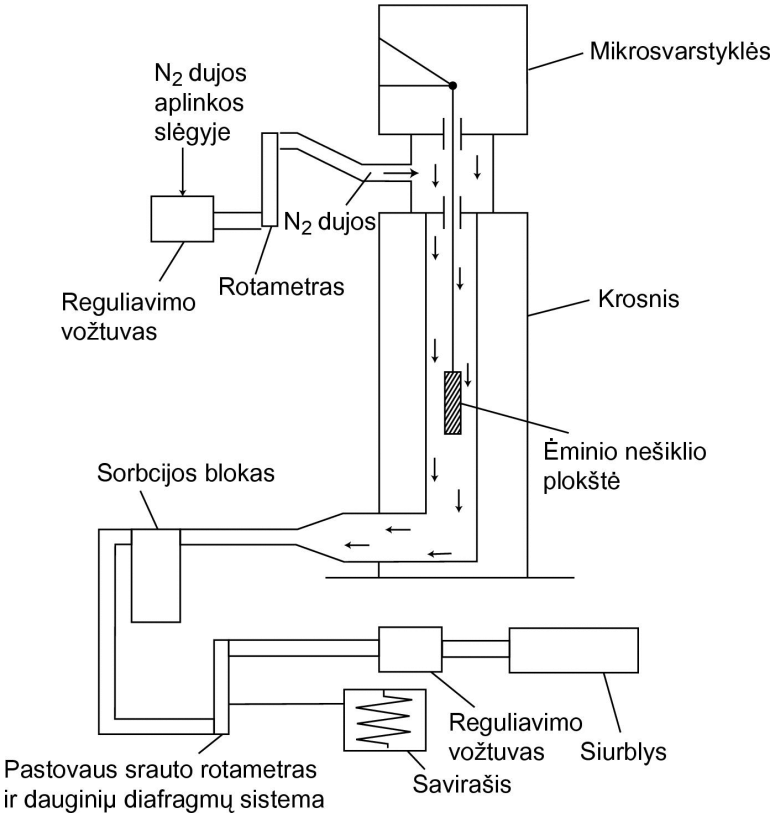
1.5.6.1. *Metodo esmė*

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:

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

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.

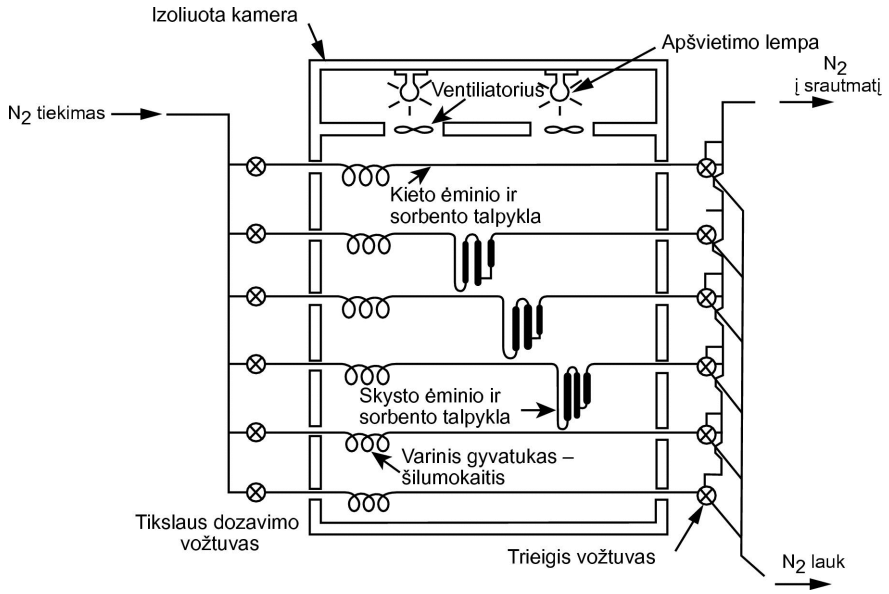
Dujų soties metodas tinka kietosioms arba skystosioms cheminėms medžiagoms. Jis gali būti taikomas garų slėgiui iki 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). Metodo patikimumas didžiausias, kai garų slėgis yra mažesnis kaip 10^3 Pa. Kai jis yra didesnis kaip 10^3 Pa, paprastai gaunamos padidintos garų slėgio 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**

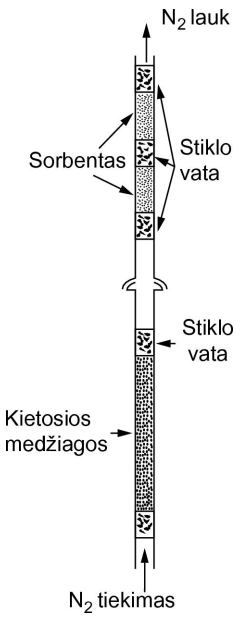
8 paveikslas



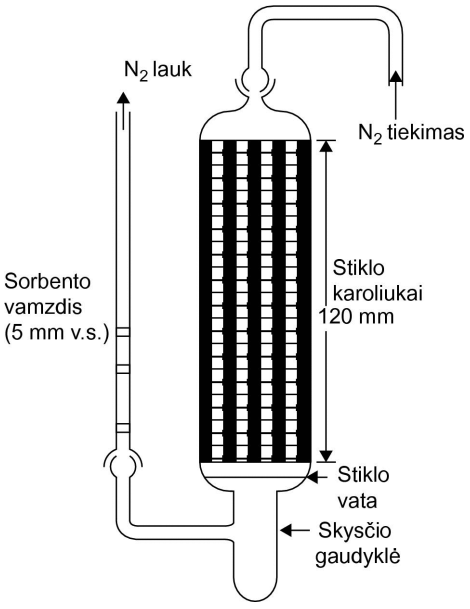
Dažniausiai kaip inertinis nešiklis naudojamos azoto dujos, bet kartais gali tekti naudoti kitas dujas (24). Nešiklio dujos turi būti sausos. Dujų srautas dalijamas į 6 srautus, reguliuojamus adatiniais vožtuvais (anga maždaug 0,79 mm), ir teka į kamerą per 3,8 mm v. s. varinius vamzdžius. Pasiekus temperatūros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

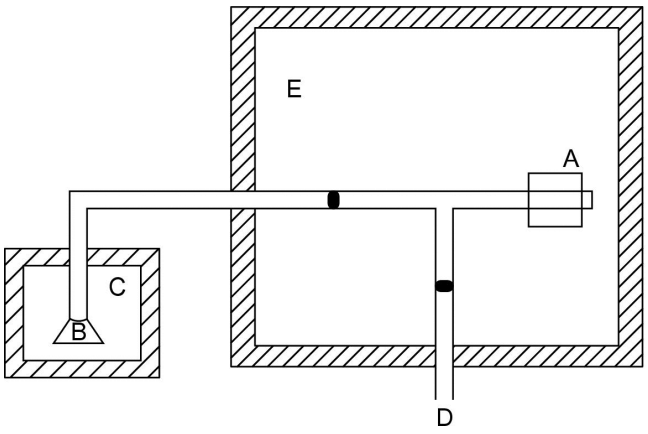
1.5.8.1. *Metodo esmė*

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



A: Sukamojo rotoriaus jutiklio galvutė
B: Ėminio kiuvetė
C: Termostatas
D: Vakuumo linija (turbininis siurblys)
E: Oro termostatas

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:

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

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

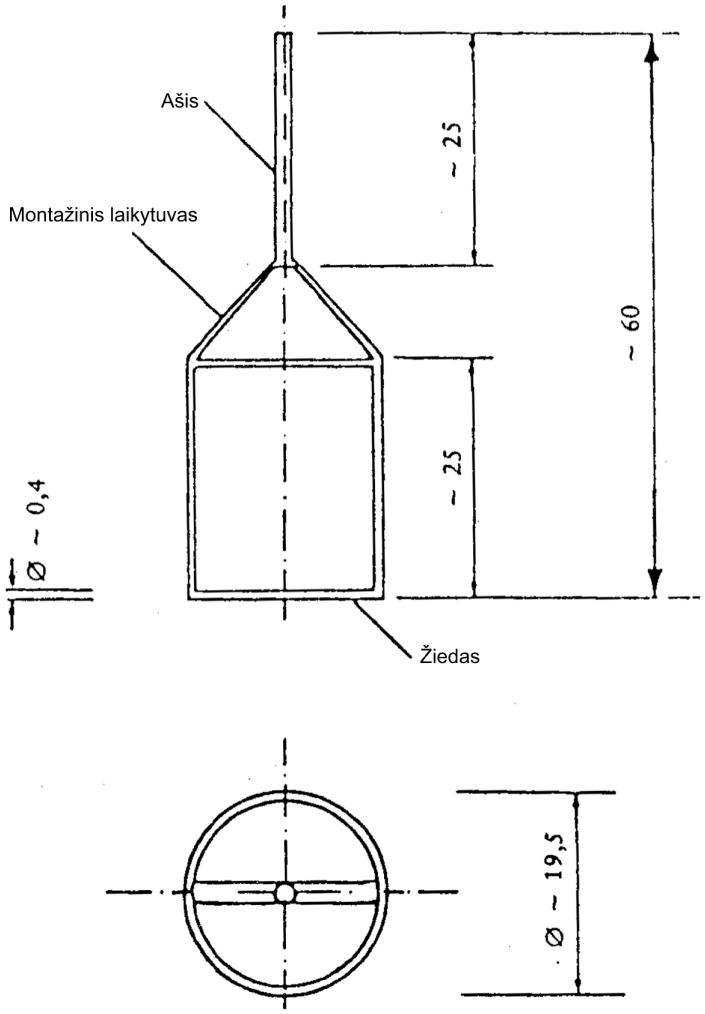
1.6.4.1.3. Matavimo kūnas (žiedas)

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. V a l y m a s

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. A p a r a t o k a l i b r a v i m a s

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 pertekliniu bandomosios medžiagos kiekiu (2). Tirpumas vandenyje nustatomas pagal eliuato masės koncentraciją, susidariusią pasiekus laiko funkcijos kreivės plokščiąją dalį.

Aparatūra

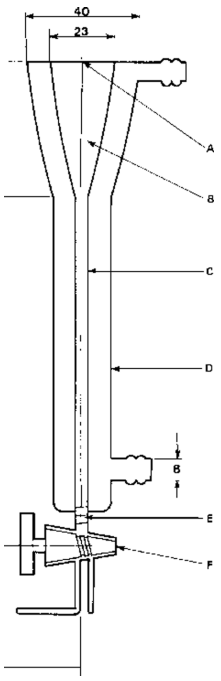
10. Vienas iš prietaisų – mikrokolonėlė (1 paveikslas), kurioje išlaikoma pastovi temperatūra. Ji prijungiama prie recirkuliacinio siurblio (2 paveikslas) arba išlyginamojo indo (3 paveikslas). Į mikrokolonėlę įdedama inertinės pagalbinės medžiagos, laikomos vietoje mažu stiklo vatos kamščiu, kuris kartu 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

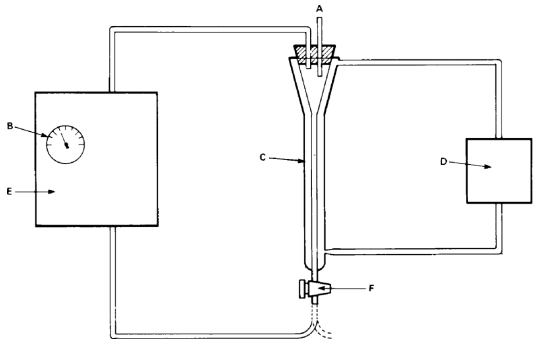
C. Vidinė dalis – 5

D. Išorinė dalis – 19

E. Stiklinės vatos kamštis

F. Uždaromasis čiaupas

2 paveikslas



A. Atmosferinis pusiausvirinimas

B. Srautmatis

C. Mikrokolonėlė

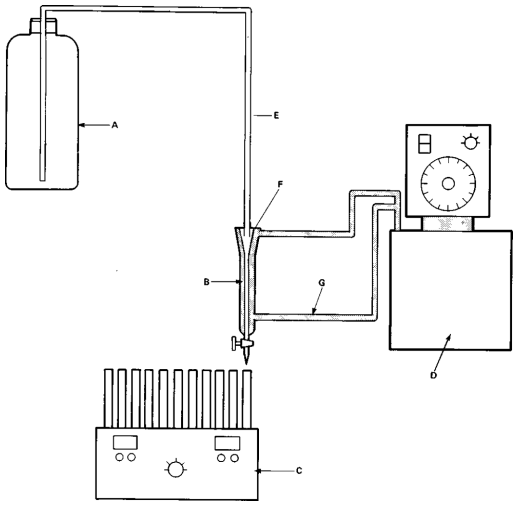
D. Termostatu kontroliuojamas cirkuliacinis siurblys

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

▼M4

pakratant. 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. SundstrĖm 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:

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

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.	Etaloninė 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.

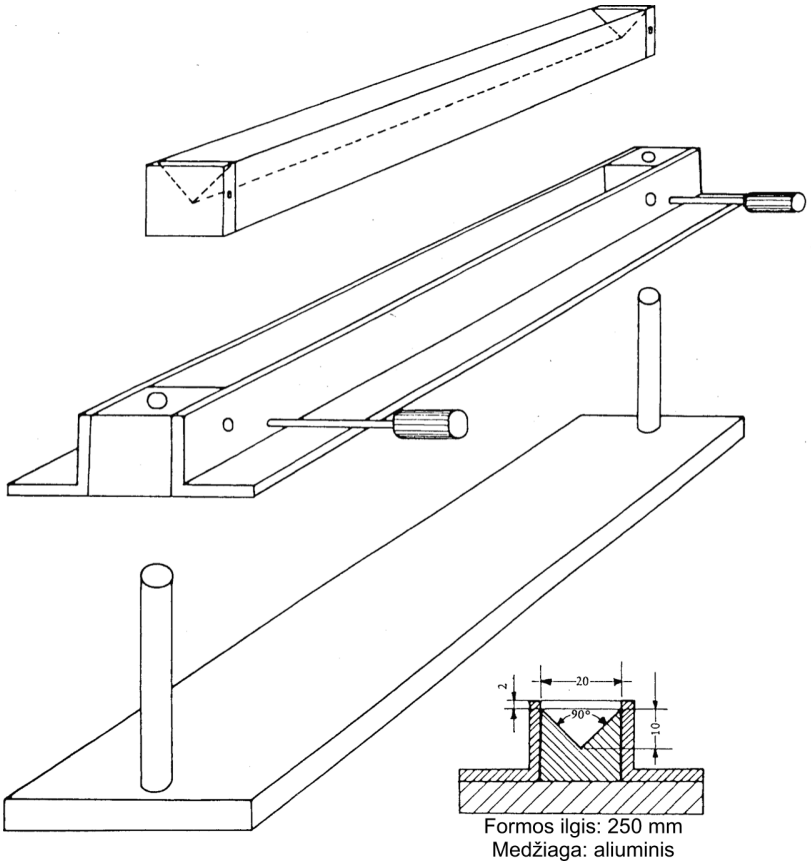
▼C1

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.

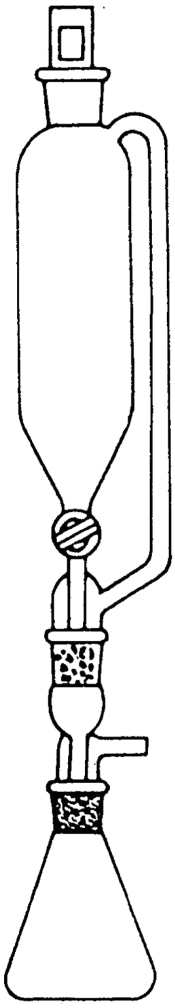
2) NF T 20–040 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼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

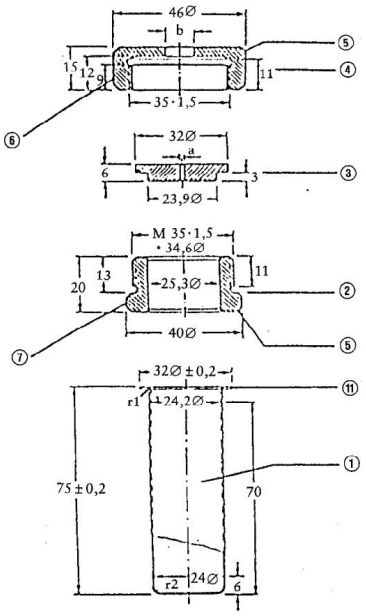
2) Diafragma: medžiagos specifikacija Nr. 1.4873

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

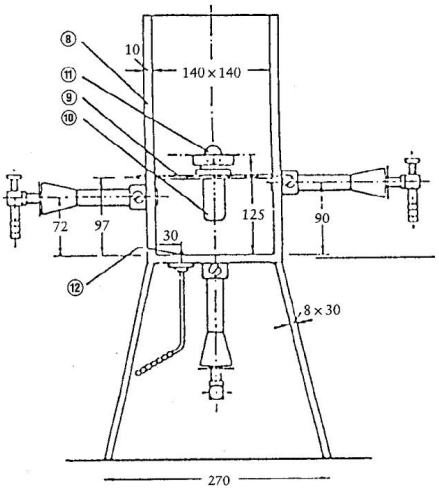
1 paveikslas

Terminio jautrumo bandymo aparatas

(visi matmenys milimetrais)



1a pav. Plieninis vamzdi s ir priedai



1b pav. Kaitinimo ir apsauginis įtaisas

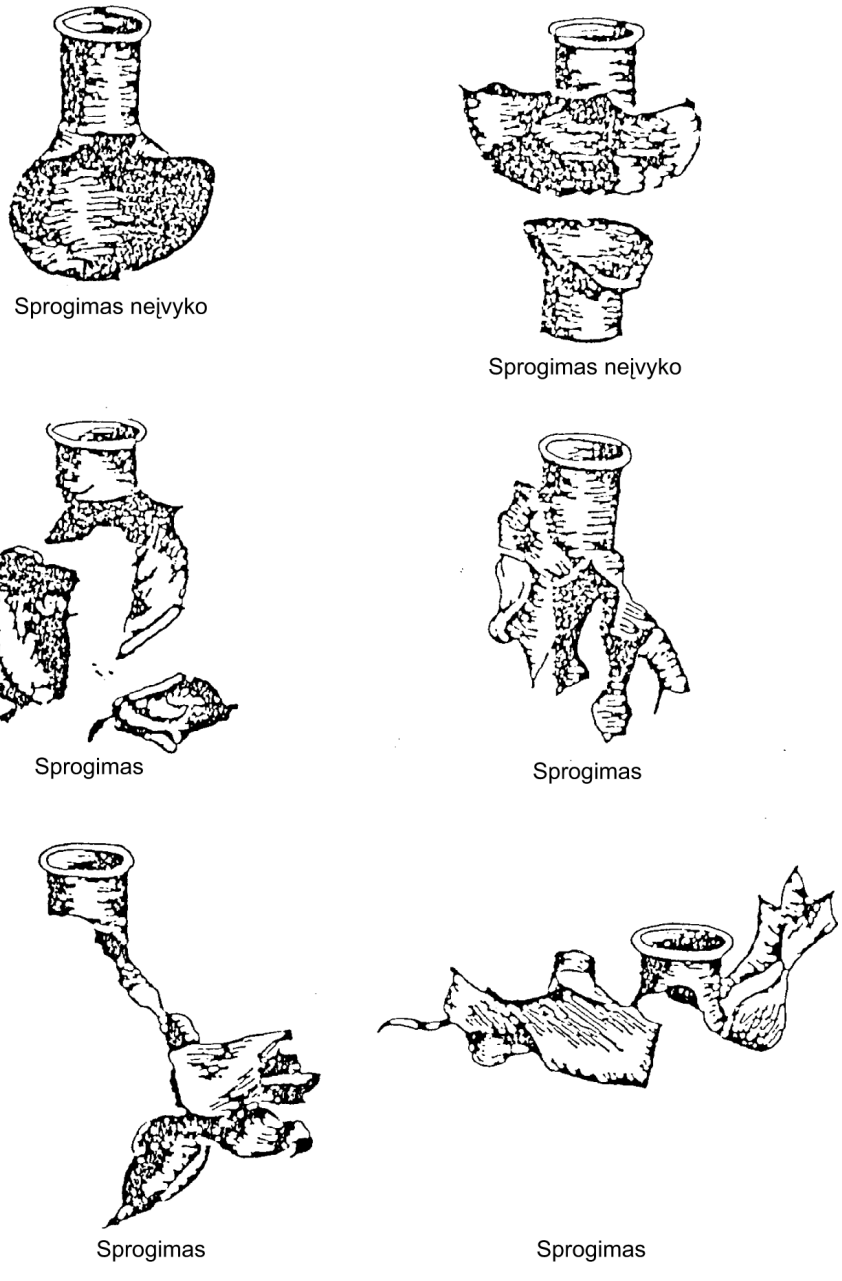
(1) vamzdis
(1a) išorinė jungė
(2) sandariklis su sriegiu; mažo trinties koeficiento sriegis
(3) diafragma: skersmuo a = 2,0 arba 6,0 mm
(4) veržlė b = 10 mm skersmuo
(5) nuožulnus paviršius
(6) 2 briaunos 41 dydžio raktui
(7) 2 briaunos 36 dydžio raktui
(8) skeveldroms atspari dėžė
(9) 2 strypai vamzdžiui laikyti
(10) surinktas vamzdis
(11) užpakalinio degiklio padėtis, kiti degikliai matomi
(12) tuščiosios eigos purkštukas

▼C1

2 paveikslas

Terminio jautrumo bandymas

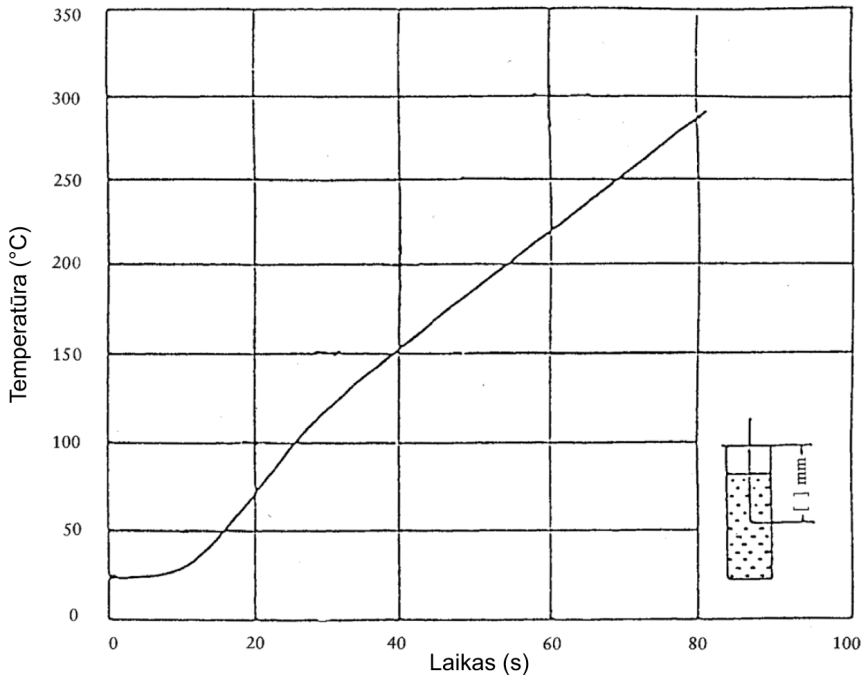
(skeveldrų susidarymo pavyzdžiai)



▼C1

3 paveikslas

Kaitinimo spartos kalibravimas terminio jautrumo bandymui



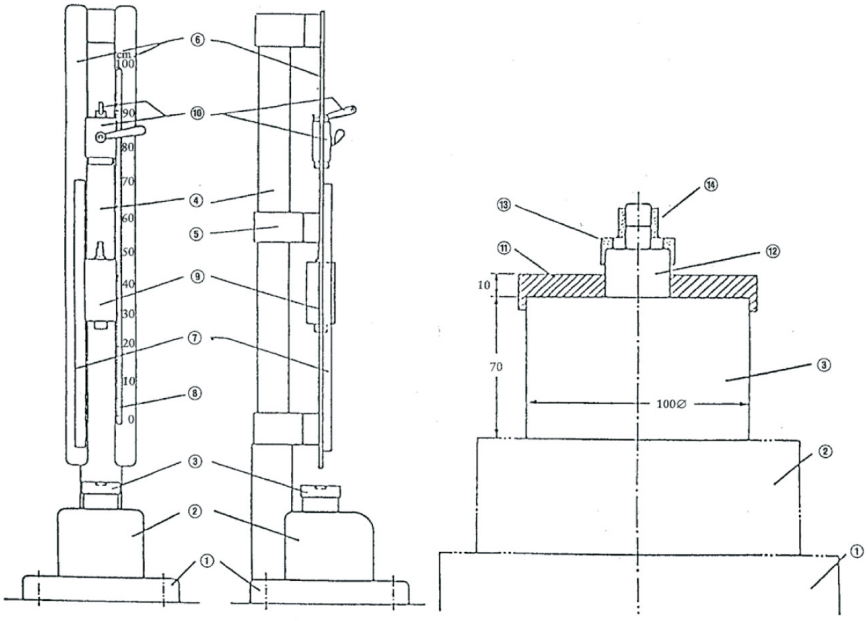
Temperatūros ir laiko priklausomybės kreivė gauta kaitinant dibutilftalatą (27 cm^3) uždarame (1,5 mm diafragma) vamzdyje, naudojant 3,2 litro per minutę propano srautą. Temperatūra matuota 1 mm skersmens chromelio/aliumelio termoelementu, įdėtu į apvalkalą iš nerūdijančio plieno ir įstatytu vamzdžio 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

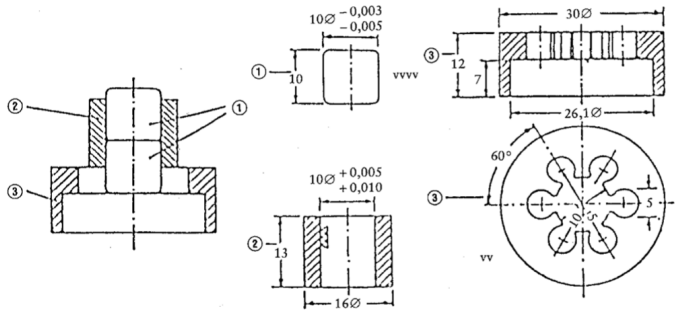
4b pav. Krintantis kūjis, apatinė dalis

(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

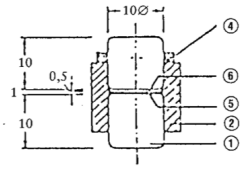
4 paveikslo

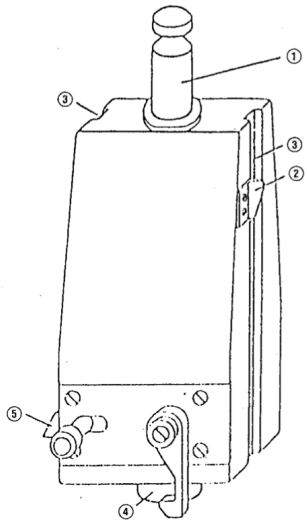
tęsinys



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) honzontalioji projekcija
(4) guminis žiedas
(5) skystoji medžiaga (40 mm^3)
(6) erdvė be skysčio





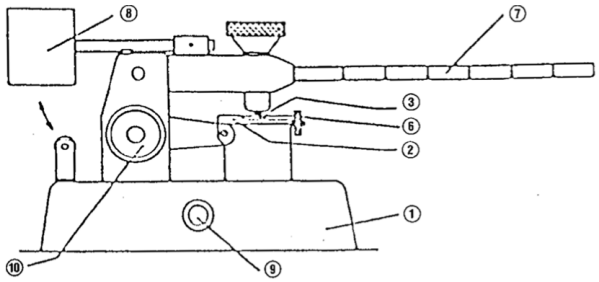
4e pav. Kūjis (kūjo masė 5 kg)

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

▼C1

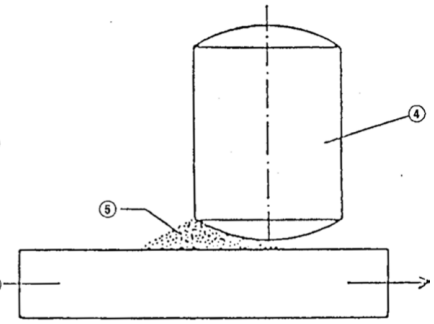
5 paveikslas

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.

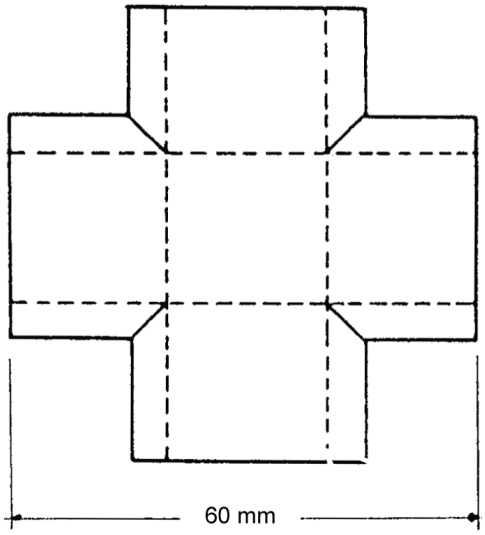
4. **NUORODOS**

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

▼C1

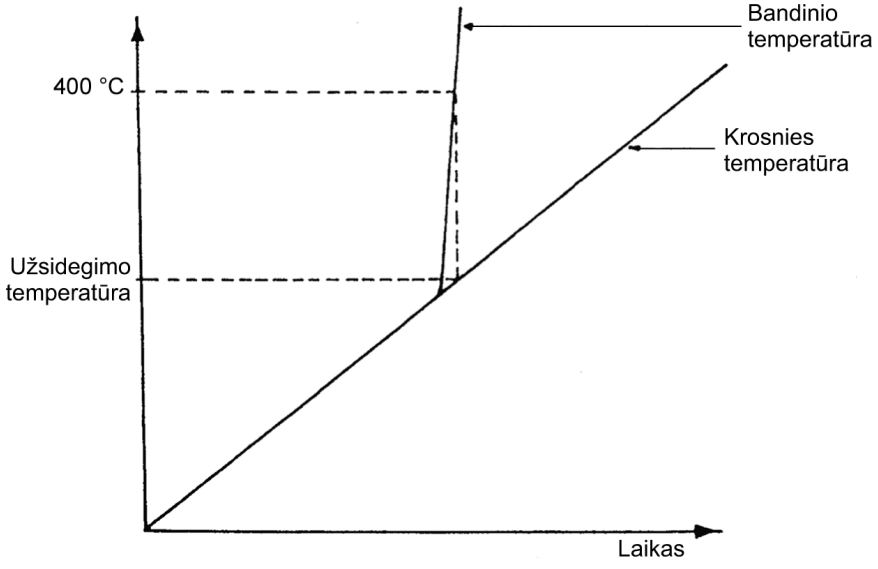
1 paveikslas

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 celiuliozė 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.

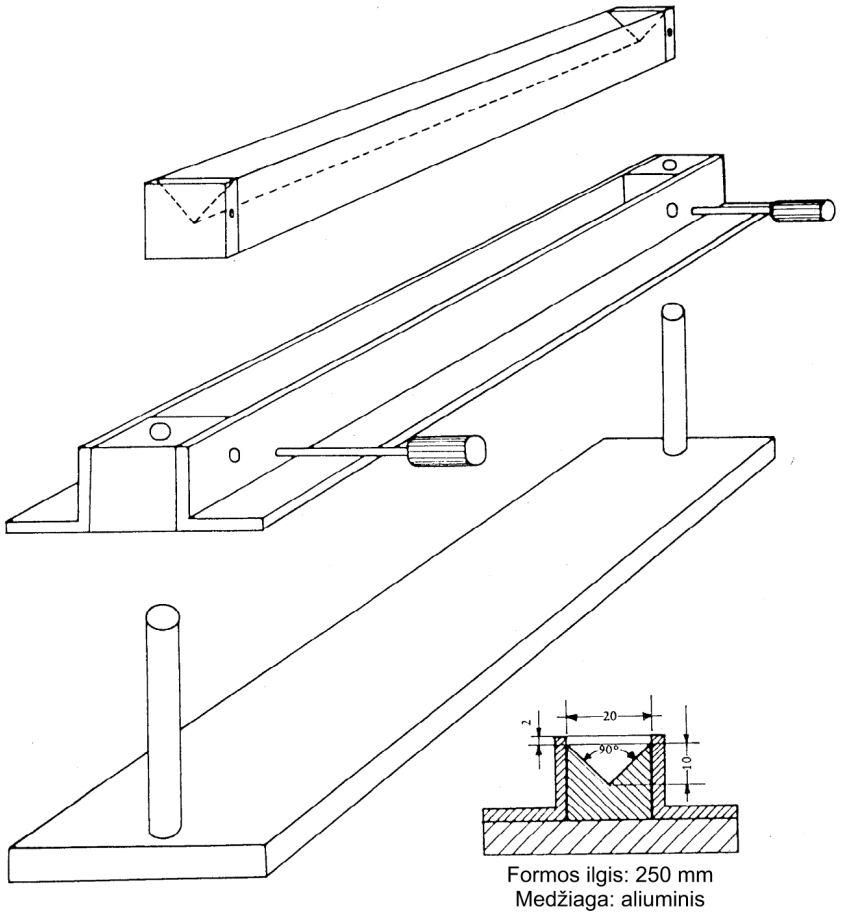
▼C1

Priedėlis

Paveikslas

Bandiniui ruošti naudojama forma ir priedai

(visi matmenys milimetrais)



Formos ilgis: 250 mm
Medžiaga: aliuminis

▼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:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

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 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.

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 skyščio 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 90º 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 60º 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.

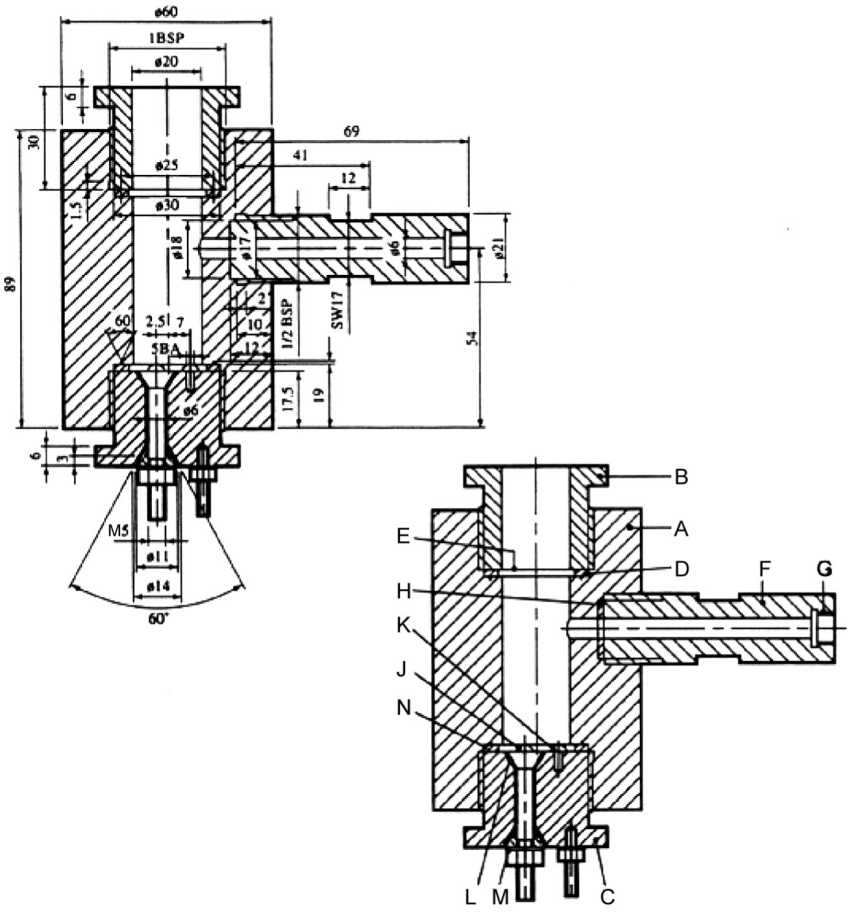
▼C1

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

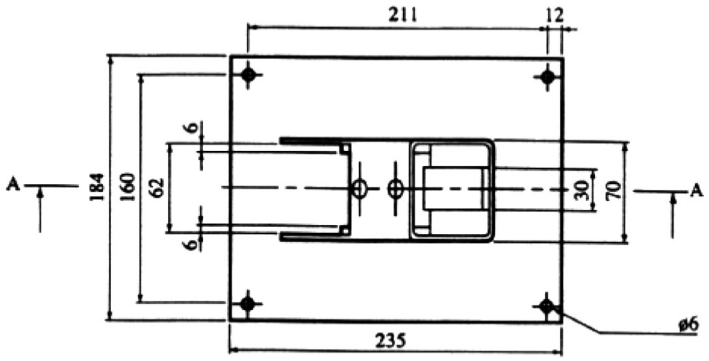
(M) Plieninis kūgis

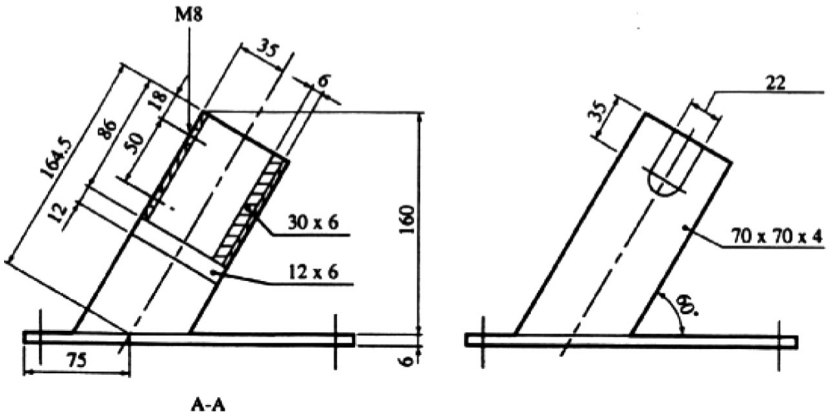
(N) Tarpiklio deformavimo griovelis

▼C1

2 paveikslas

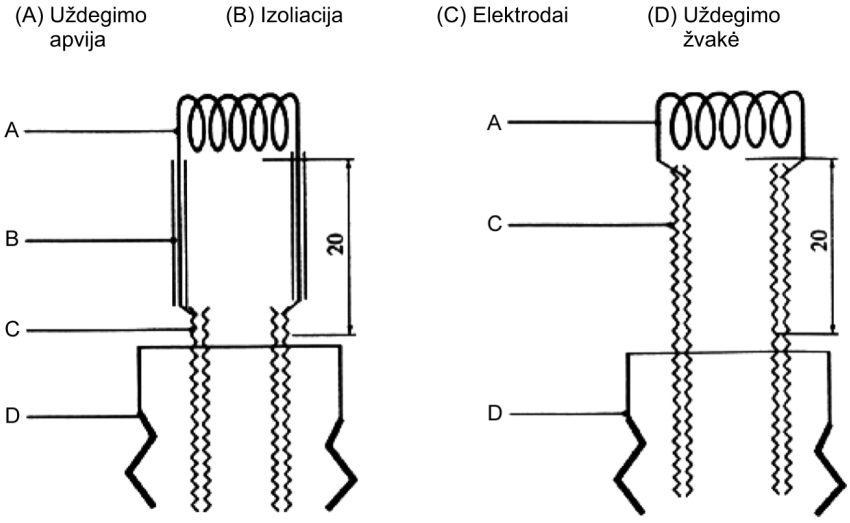
Laikantysis stovas





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 ($\text{var}_{\log\ Pow,Av}$):

$$\text{var}_{\log\ Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log\ Pow,Av} = (\text{var}_{\log\ Pow,Av})^{0.5}$$

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 $= 0,7 \times$ 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 (l)	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)

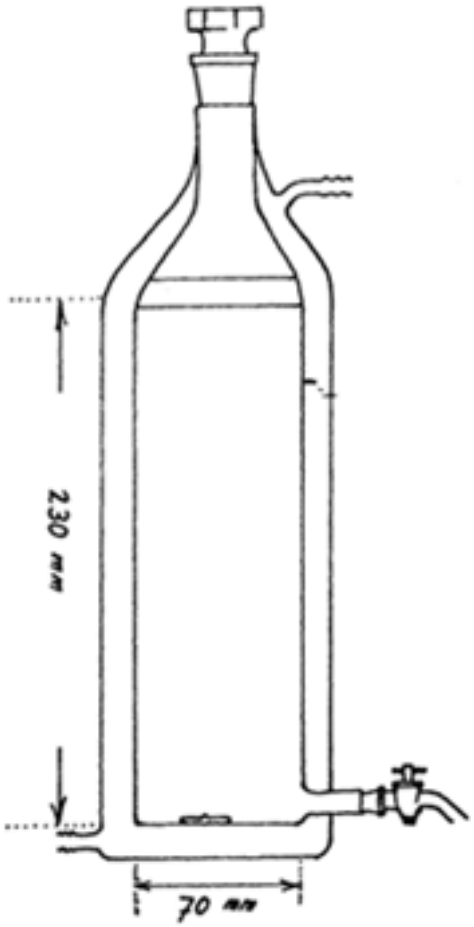
log P_{ow}	S_w (mg/l)	AR (μg/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	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					

2 priedėlis

Per lėto maišymo bandymą, skirtą nustatyti P_{OW}, naudojamo stiklu gaubto bandymų indo pavyzdys



▼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 TOKSIŠKUMAS. AKIŲ DIRGINIMAS AR 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. MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJŲ BANDYMAS *IN VITRO*

B.11. MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ KAULŲ ČIULPŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJOS BANDYMAS *IN VIVO*

B.12. MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ ERITROCITŲ MAŽŲJŲ BRANDUOLIŲ BANDYMAS *IN VIVO*

B.13/14. MUTAGENIŠKUMAS – BAKTERIJŲ GRĮŽTAMŲJŲ MUTACIJŲ BANDYMAS

B.15. MUTAGENIŠKUMO BANDYMAS IR ATRANKA PAGAL KANCEROGENIŠKUMĄ. *SACCAROMYCES CEREVISIAE* GENŲ MUTACIJOS

B.16. MITOZINĖ REKOMBINACIJA – *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

B.17. MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ LĄSTELIŲ GENŲ MUTACIJŲ BANDYMAS *IN VITRO*

B.18. DNR PAŽAIDOS IR JŲ REPARACIJA – NETAISYKLINGA DNR SINTEZĖ – ŽINDUOLIŲ LĄSTELĖSE *IN VITRO*

B.19. APSIKEITIMO SESERINĖMIS CHROMATIDĖMIS BANDYMAS *IN VITRO*

B.20. *DROSOPHILA MELANOGASTER* NUO LYTIES PRIKLAUSOMO RECESYVINIO LETALIŠKUMO BANDYMAS

▼C1

B.21.	ŽINDUOLIŲ LĄSTELIŲ TRANSFORMACIJOS BANDYMAI *IN VITRO*
B.22.	GRAUŽIKŲ DOMINANTINIS LETALIŠKUMO BANDYMAS
B.23.	ŽINDUOLIŲ SPERMATOGONIJŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJOS BANDYMAS
B.24.	PELIŲ TAŠKINIS 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

▼**C1**

B.41.	3T3 NRU FOTOTOKSIŠKUMO *IN VITRO* BANDYMAS
B.42.	ODOS JAUTRINIMAS. VIETINIO LIMFMAZGIO BANDYMAS
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 PADRUMSTĖJIMO IR PRALAIDUMO BANDYMO METODAS AKIS ĖSDINANČIOMS IR STIPRIAI DIRGINANČIOMS MEDŽIAGOMS NUSTATYTI
B.48.	IZOLIUOTOS VIŠTOS AKIES BANDYMO METODAS AKIS ĖSDINANČIOMS IR STIPRIAI DIRGINANČIOMS MEDŽIAGOMS NUSTATYTI
B.49.	*IN VITRO* ŽINDUOLIŲ LĄSTELĖS MIKROBRANDUOLIO BANDYMAS
B.50.	ODOS JAUTRINIMAS. VIETINIO LIMFMAZGIO BANDYMAS. DA
B.51.	ODOS JAUTRINIMAS. VIETINIO LIMFMAZGIO BANDYMAS. BrdU-ELISA

▼**M4**

B.52.	ŪMUS TOKSIŠKUMAS ĮKVĖPUS. ŪMAUS TOKSIŠKUMO KLASĖS NUSTATYMO METODAS

▼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

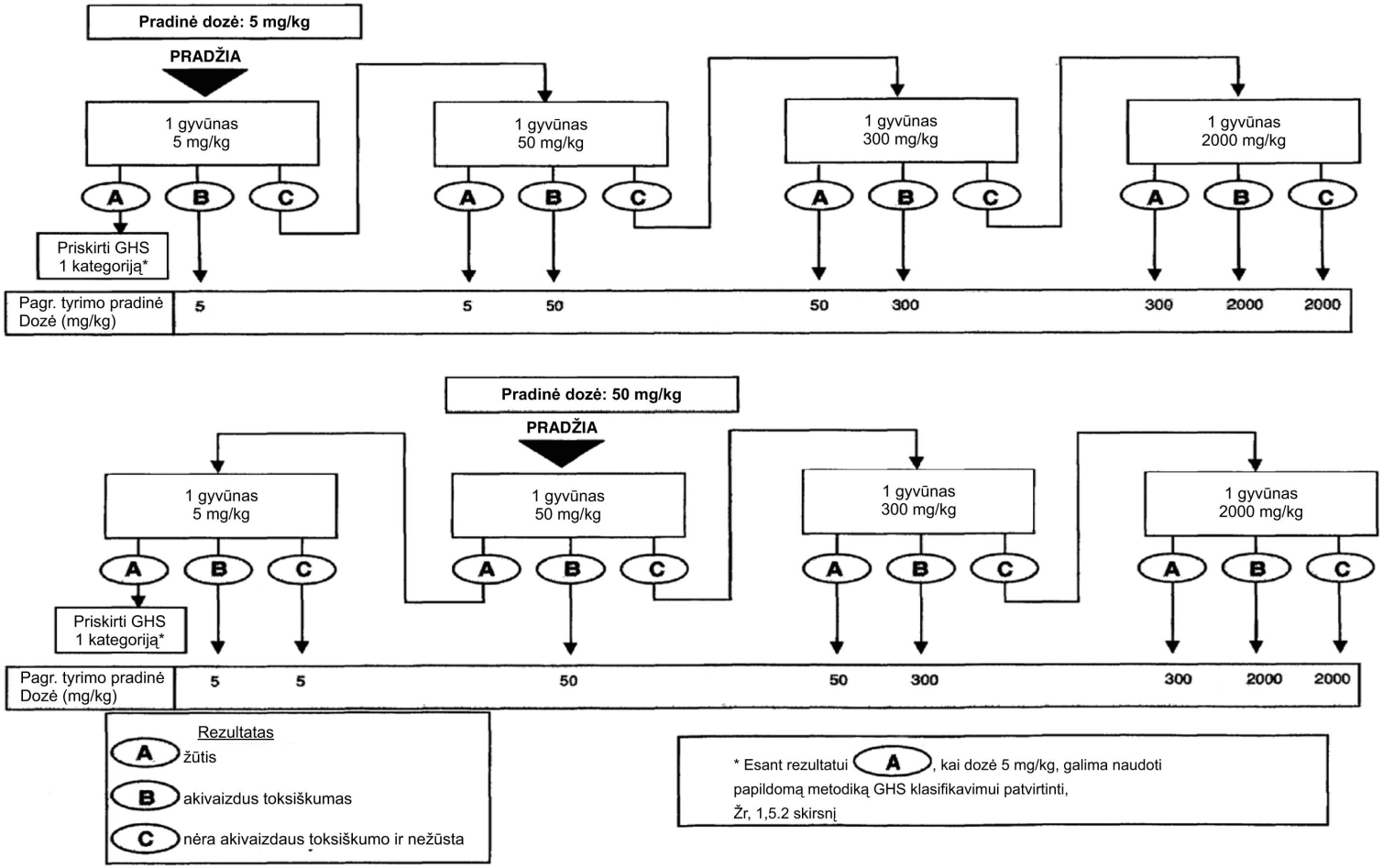
9) OECD (1998) Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521–14-no-24-no-0,FF.html].

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.

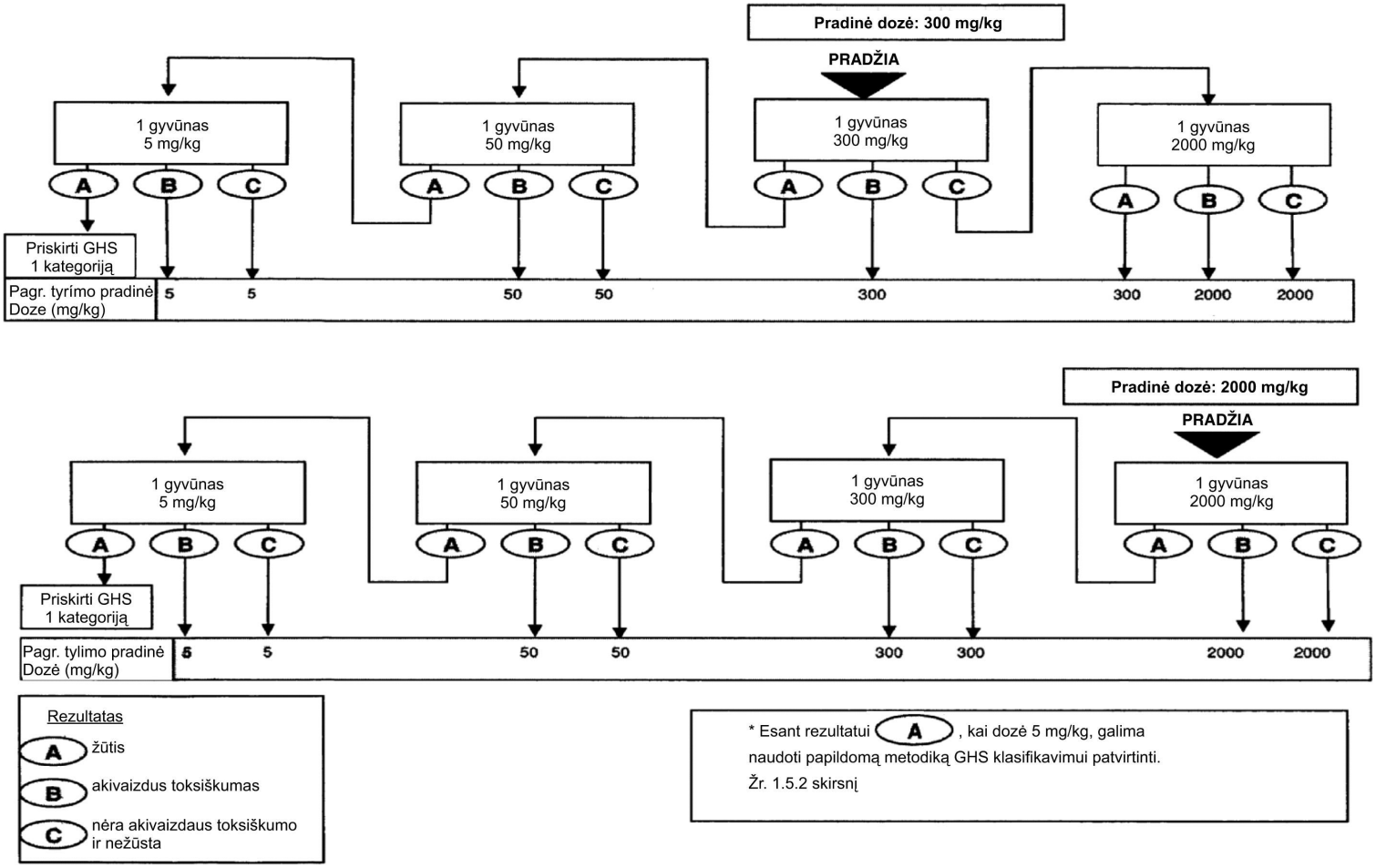
11) Chan, P.K and Hayes, A.W., (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press Ltd. New York, USA.

1 PRIEDĖLIS

ORIENTACINIO BANDYMO SCHEMA

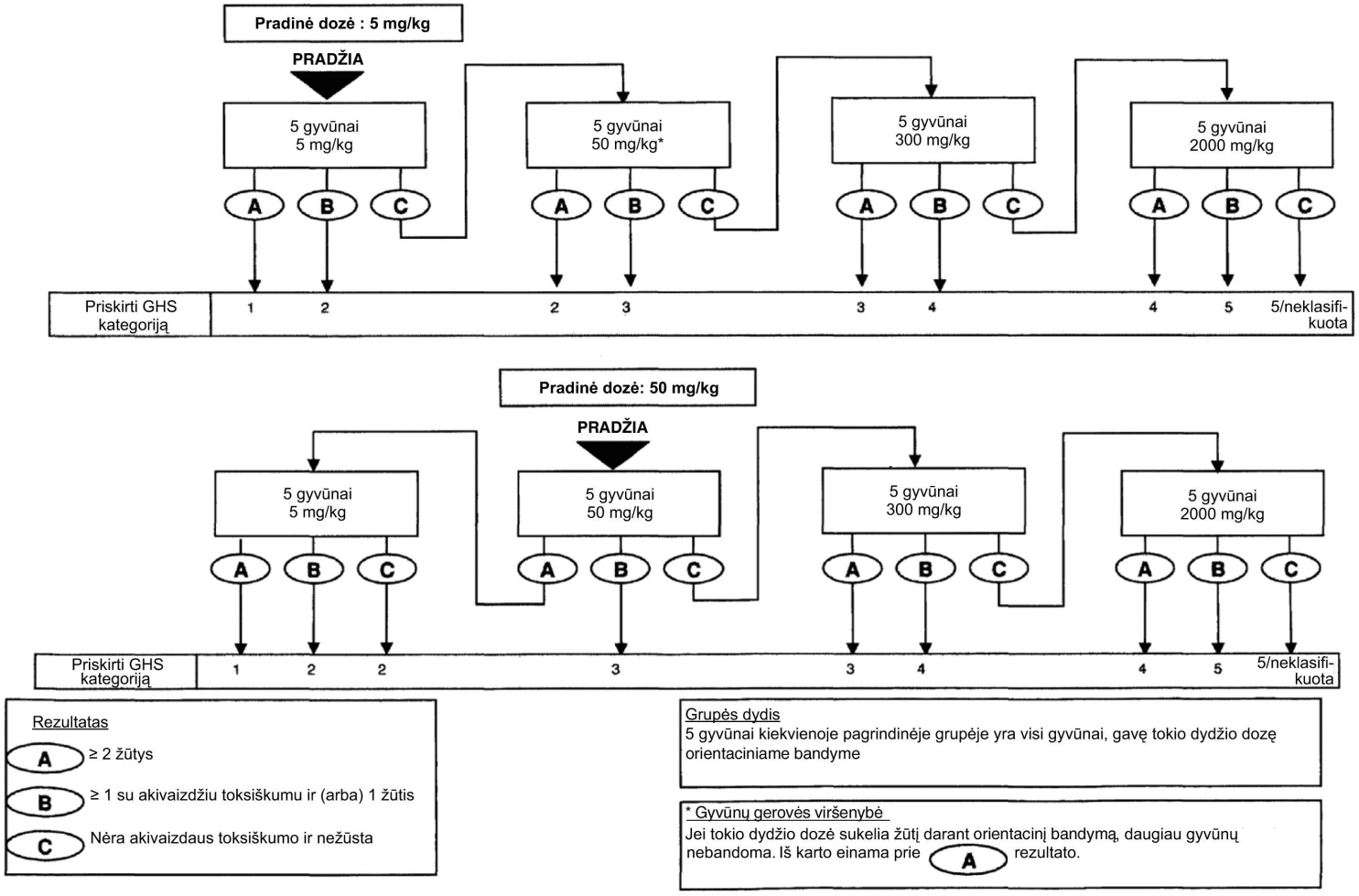


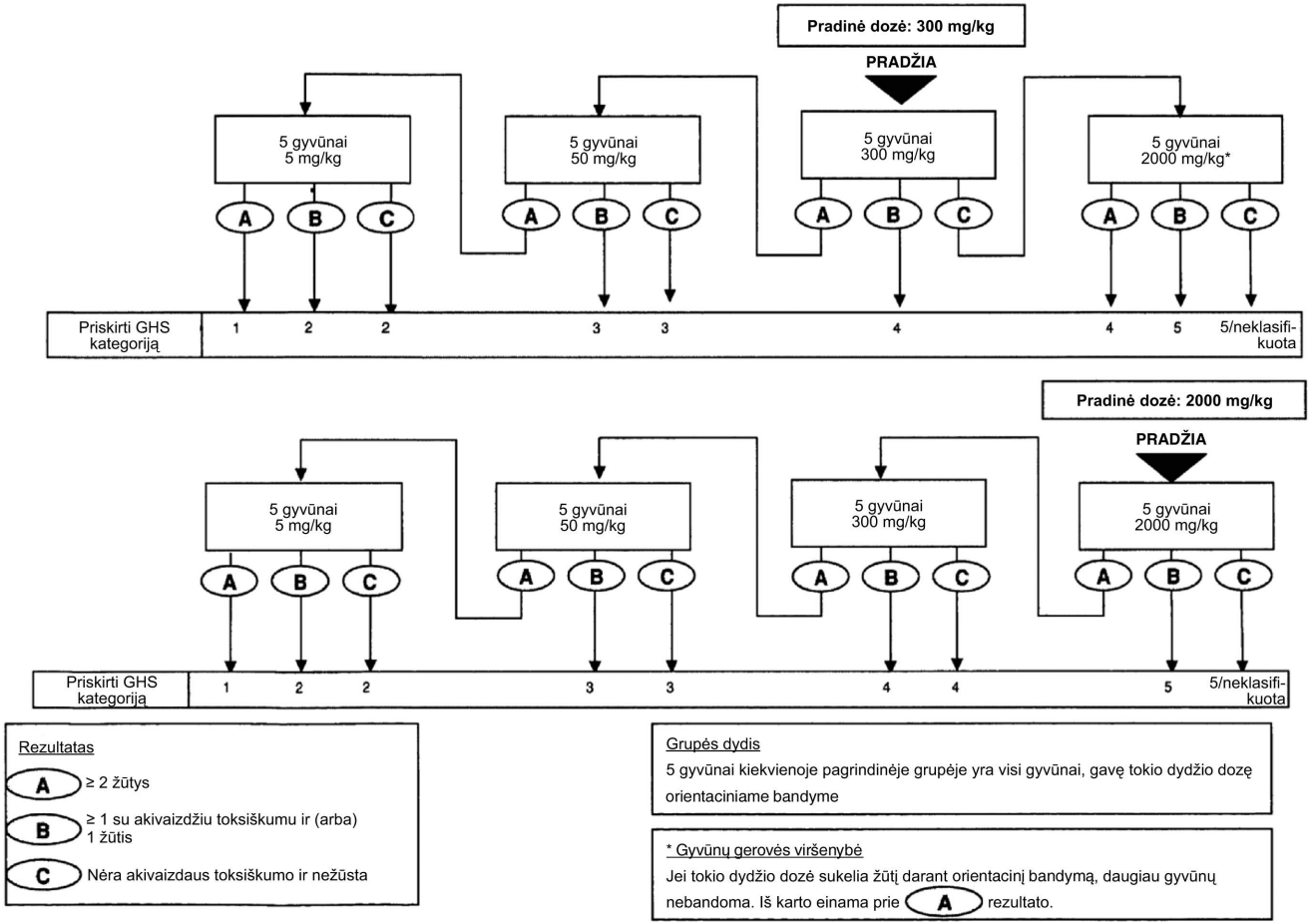
▼C1


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
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

2 PRIEDĖLIS

PAGRINDINIO BANDYMO SCHEMA




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

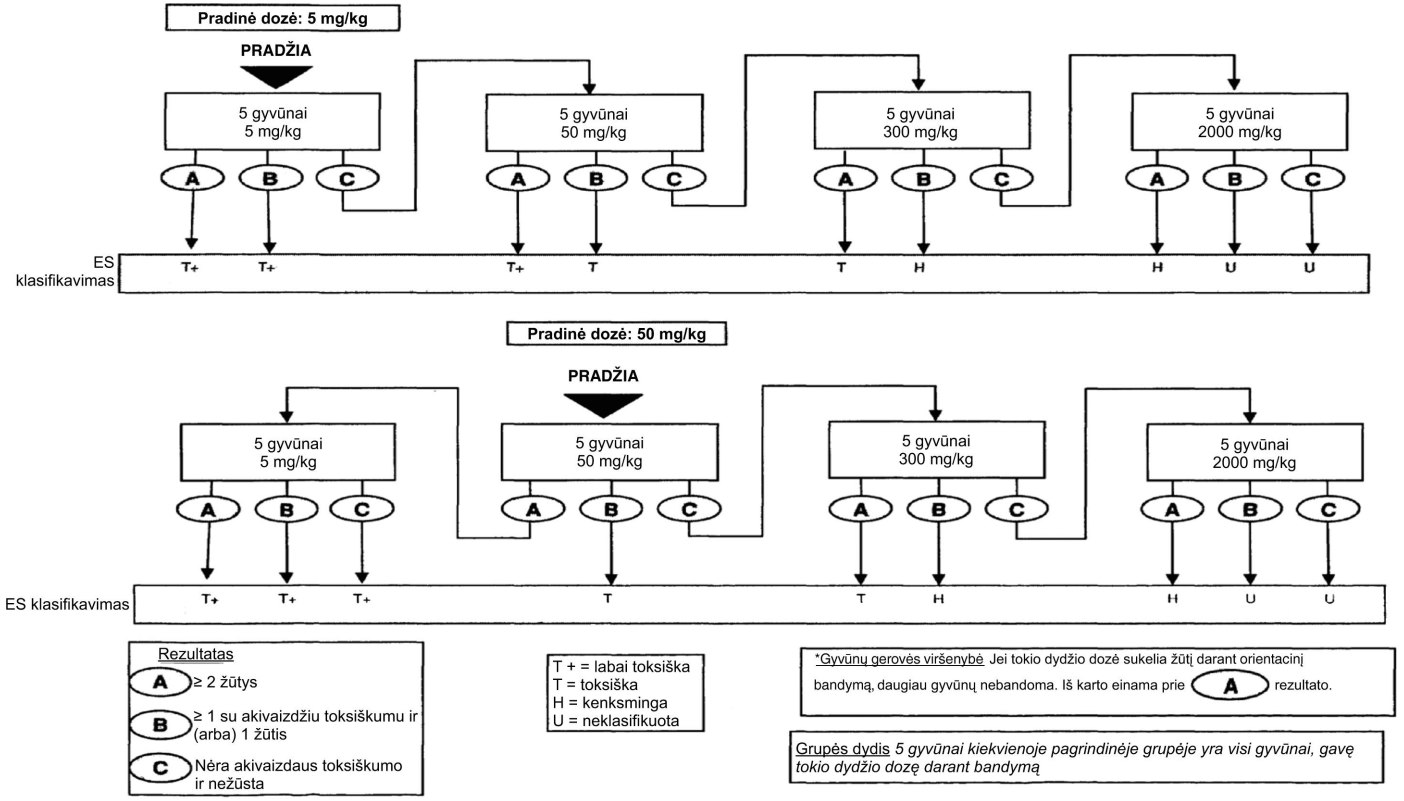
Sprendimo priėmimo taisyklės, taikomos 2 priedėlyje pateiktai nuosekliai procedūrai, išplečiamos, kad būtų galima įtraukti 5 000 mg/kg dozę. Taigi kai skiriama pagrindinio bandymo pradinė 5 000 mg/kg dozė, gavus A rezultatą (≥ 2 žūtys) reikės daryti 2 grupės bandymą, jai skiriant 2 000 mg/kg; gavus B 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

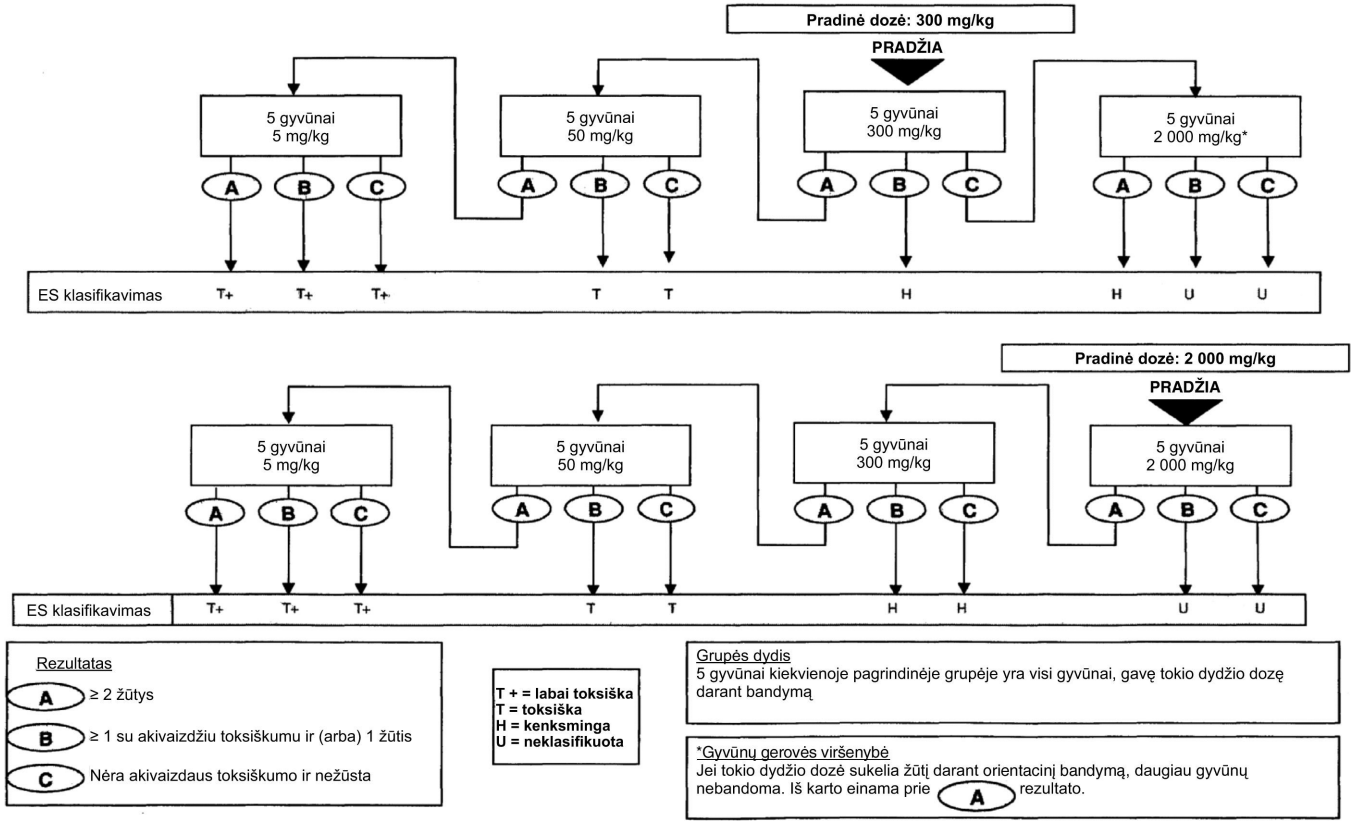
4 PRIEDĖLIS

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)



▼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
A B C
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

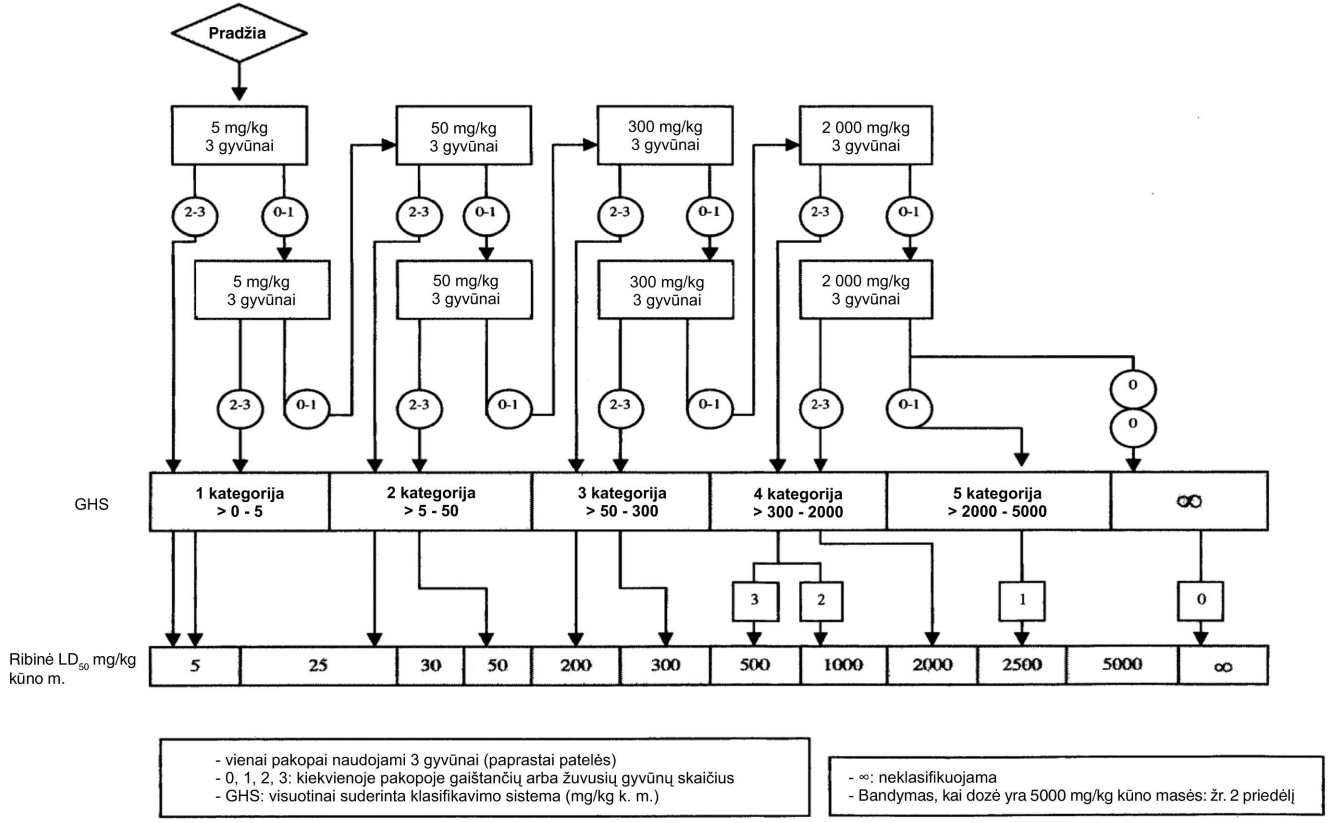
— 1 C priedėlis: pradinė dozė 300 mg/kg kūno masės

— 1 D priedėlis: pradinė dozė 2 000 mg/kg kūno masės

Atsižvelgiant į humaniškai numarintų arba nugaišusių gyvūnų skaičių, bandymo eiga žymima rodyklėmis.

1 A PRIEDĖLIS

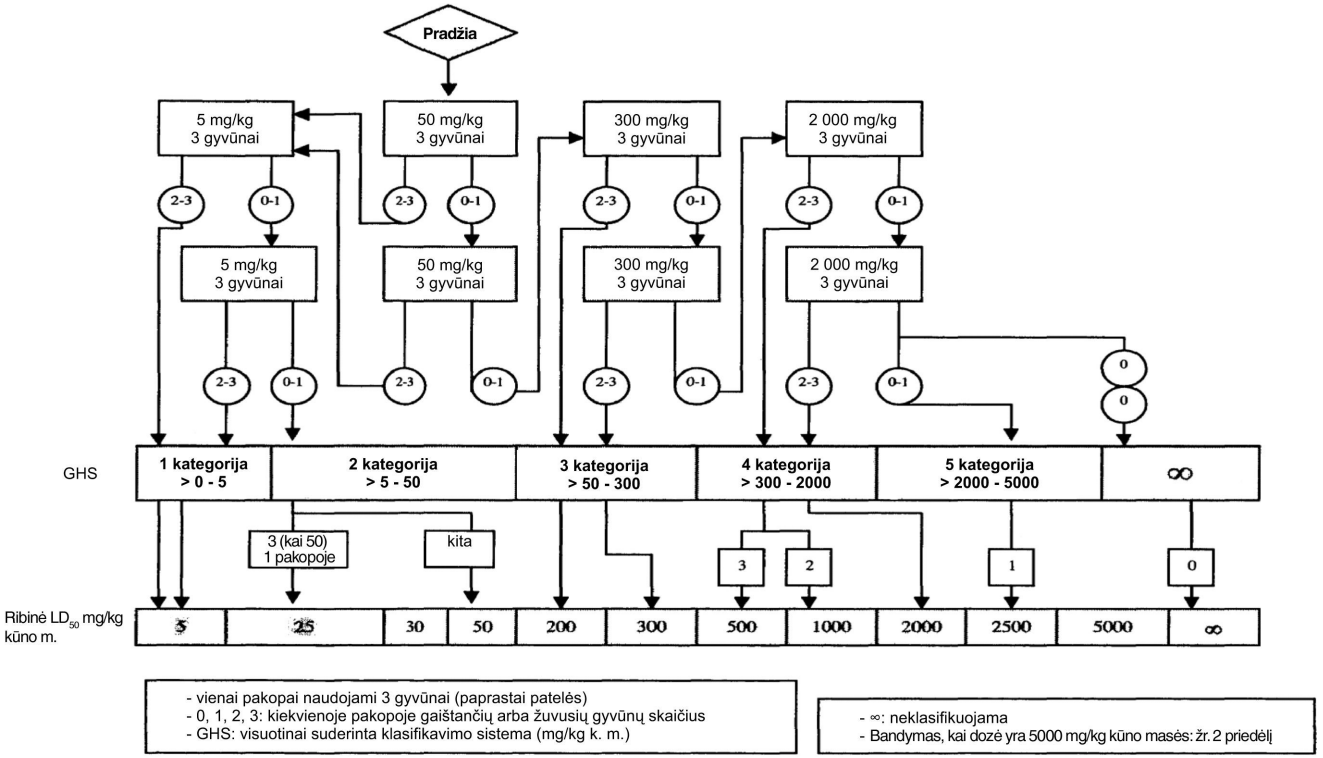
BANDYMO PROCEDŪRA, KAI PRADINĖ DOZĖ YRA 5 MG/KG KŪNO MASĖS



▼C1

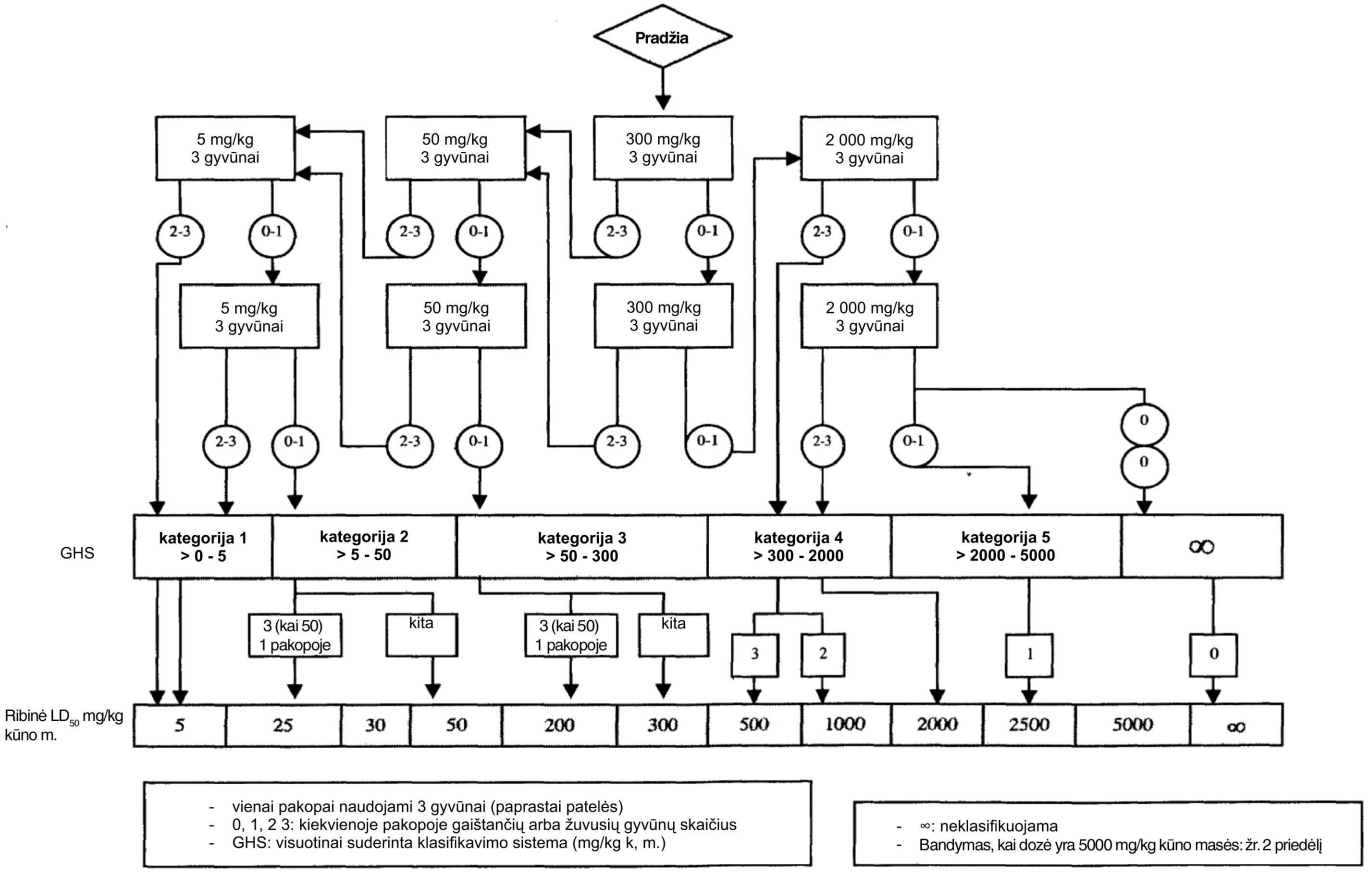
1 B PRIEDĖLIS

BANDYMO PROCEDŪRA, KAI PRADINĖ DOZĖ YRA 50 MG/KG KŪNO MASĖS



1 C PRIEDĖLIS

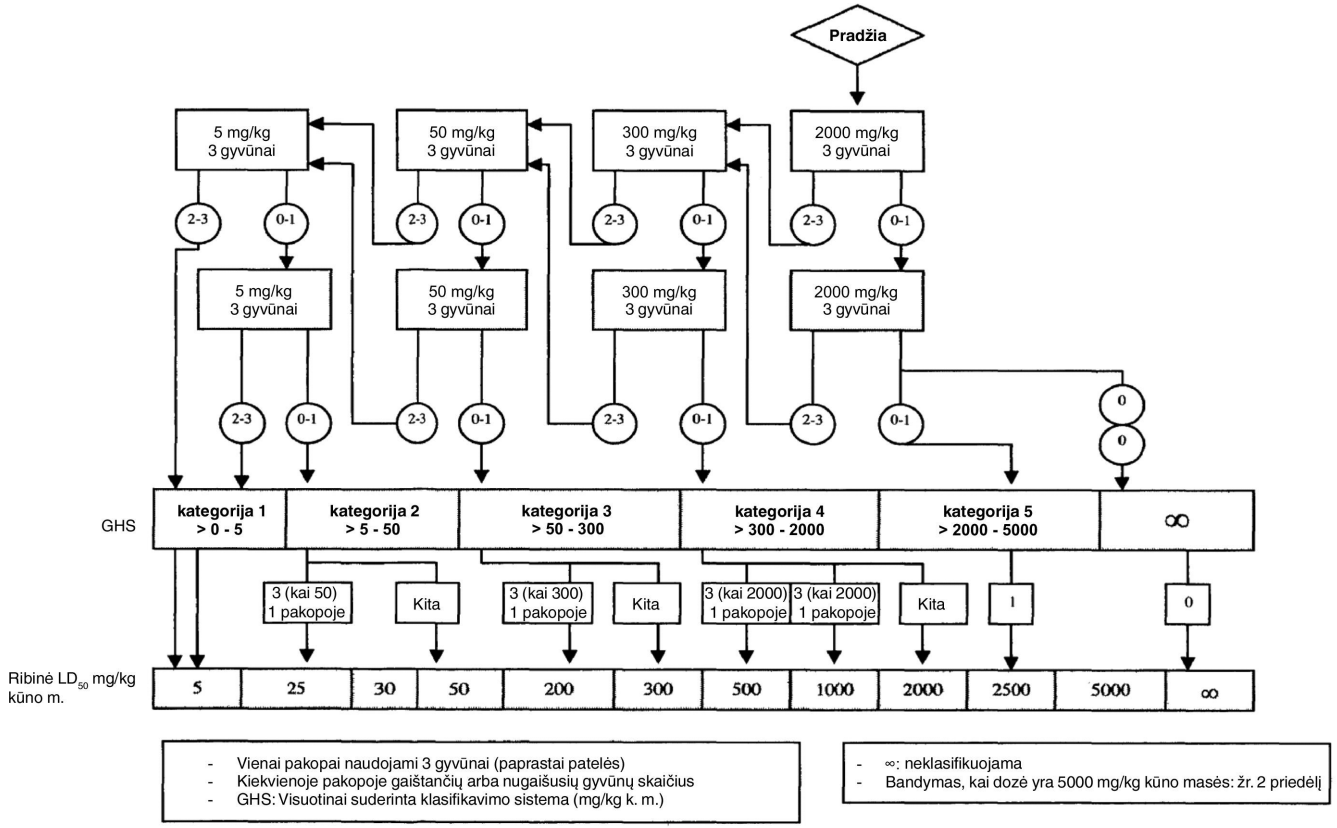
BANDYMO PROCEDŪRA, KAI PRADINĖ DOZĖ YRA 300 MG/KG KŪNO MASĖS



▼C1

1 D PRIEDĖLIS

BANDYMO PROCEDŪRA, KAI PRADINĖ DOZĖ YRA 2 000 MG/KG KŪNO MASĖS



▼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

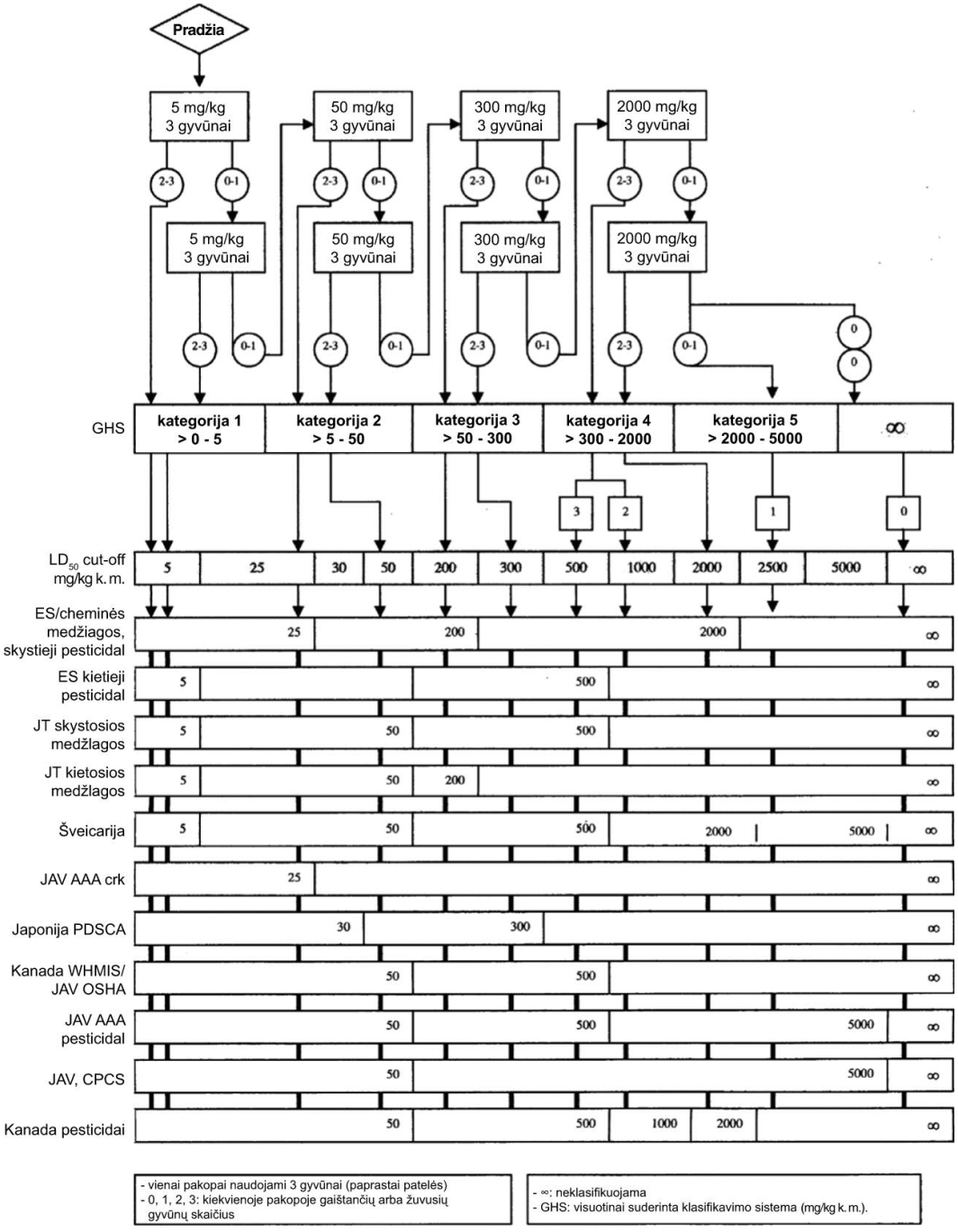
Pripažįstant būtinumą apsaugoti gyvūnų gerovę, bandymas su gyvūnais skiriant 5 kategorijos intervalo dozes (5 000 mg/kg) neskatinamas ir apie tokio bandymo būtinybę turėtų būti sprendžiama, kai yra didelė tikimybė, kad jo rezultatai yra tiesiogiai sietini su žmonių arba gyvūnų sveikatos apsauga (10). 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.

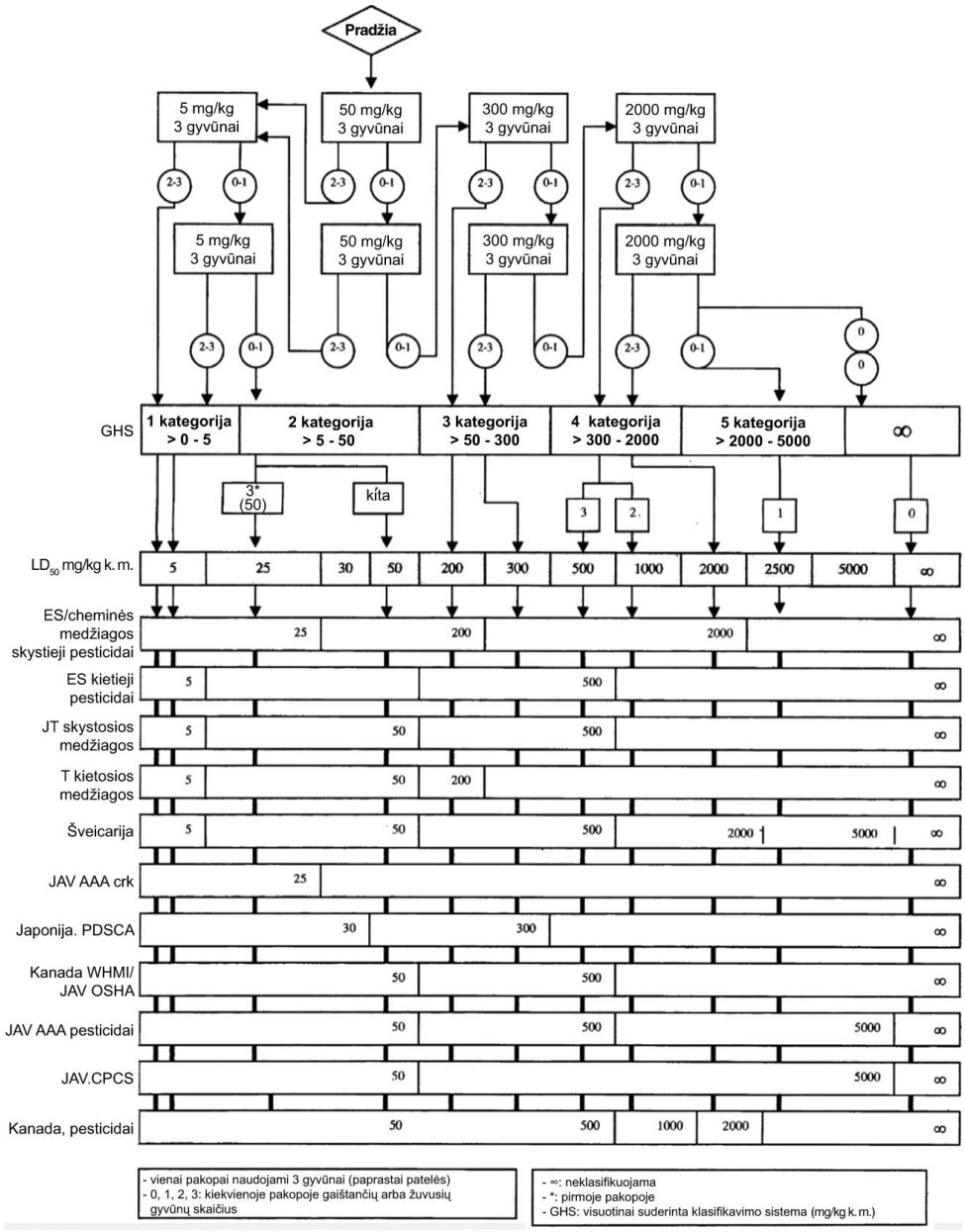
▼C1

3 PRIEDĖLIS

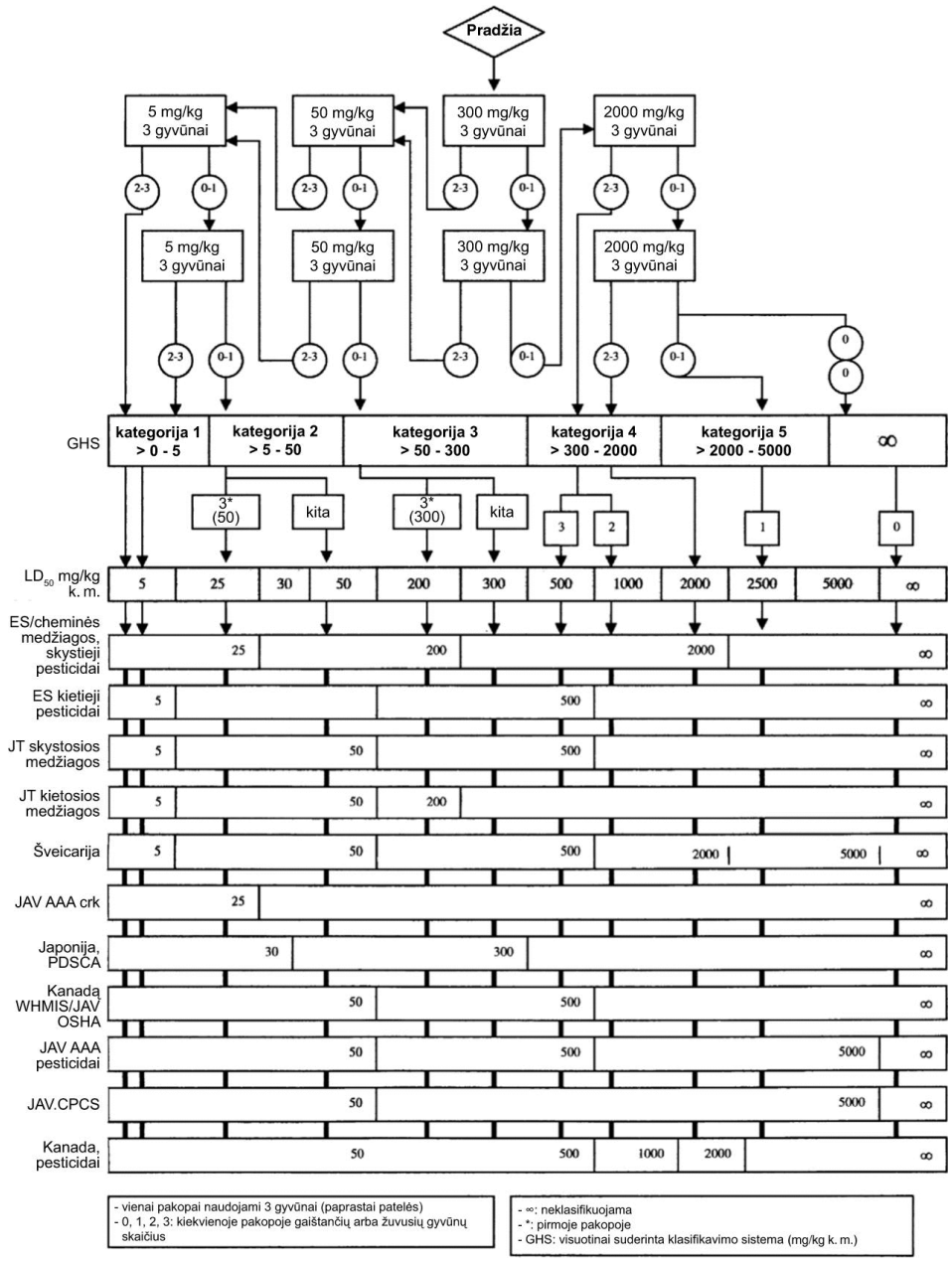
BANDYMŲ METODAS B.1 tris. Klasifikavimo pagal ES schemą rekomendacijos, taikomos pereinamajam laikotarpiui iki visiško visuotinai suderintos klasifikavimo sistemos (GHS) įgyvendinimo (paimta iš 8 nuorodos)



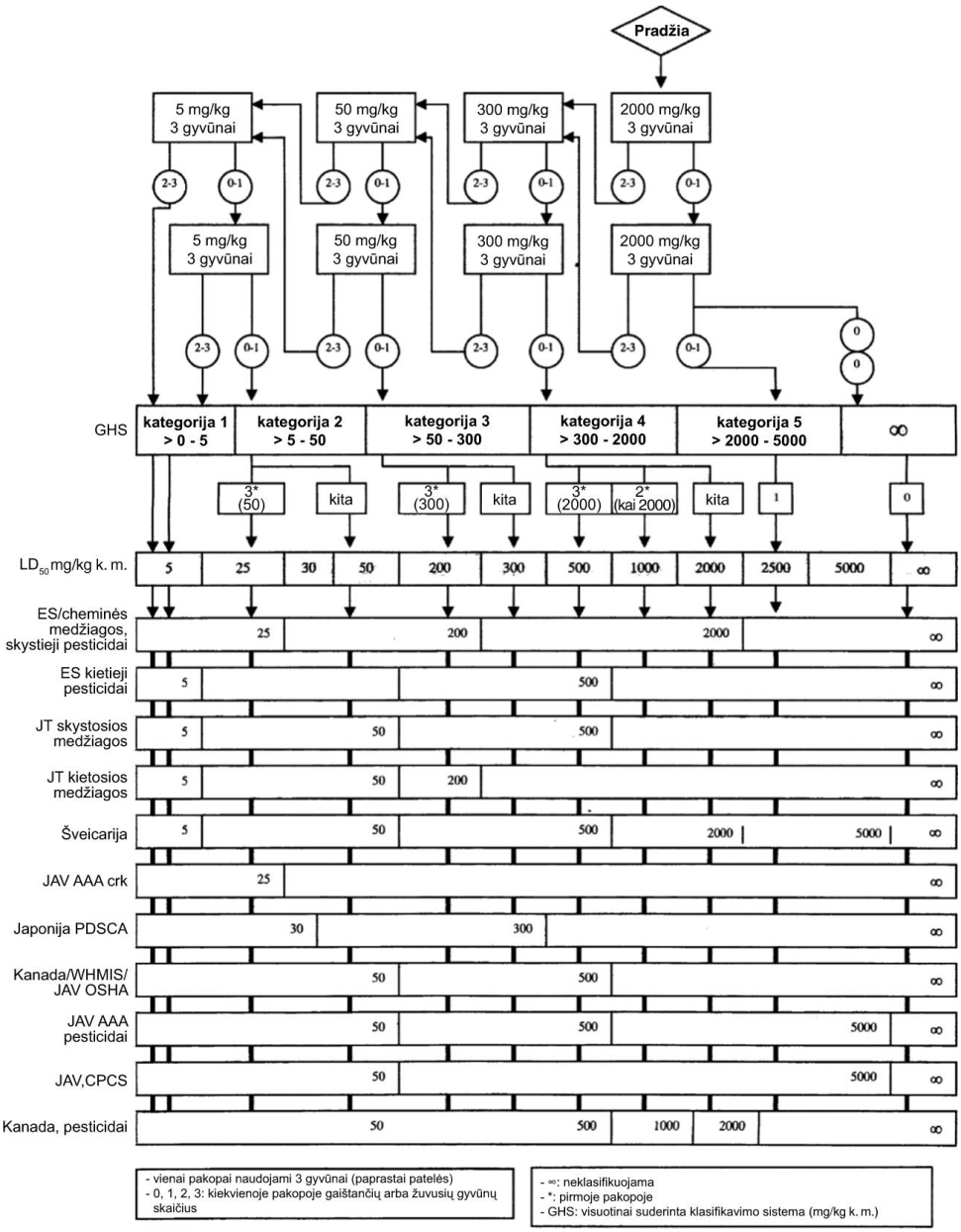
▼C1


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
Kanadą 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 cheminės 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

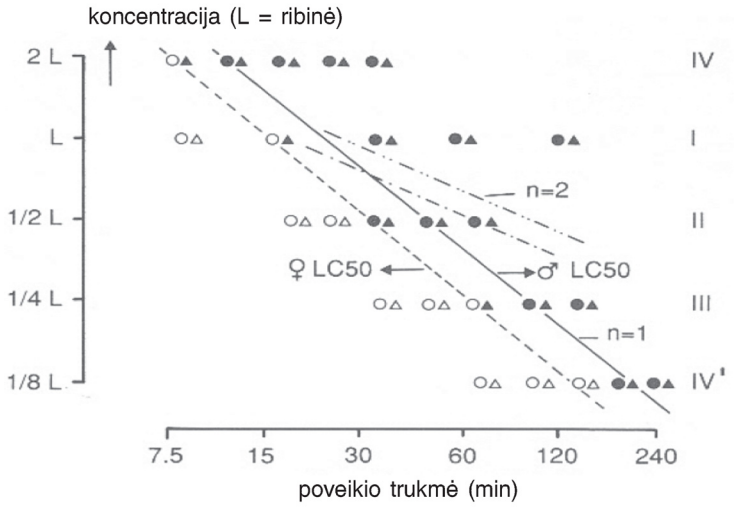
7. Turėtų būti dažnai matuojama kameroje susidariusi koncentracija, kad kiekvienai poveikio trukmei būtų galima nustatyti pagal laiką apskaičiuojamą vidutinę koncentraciją. Jeigu įmanoma, atliekant statistinę analizę turėtų būti naudojamas kiekvieno gyvūnų žūties laikas (o ne poveikio trukmė).

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 nuosekliųjų 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 nuosekliųjų 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 nuoseklųjų 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 nuosekliųjų 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 giminingos 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 giminingos 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

	Veikla	Rezultatas	Išvada
1	Yra duomenų apie poveikį žmonių ir (arba) gyvūnų odai arba gleivinei	Ėsdinanti	Galutinė išvada; laikoma ėsdinančia. Bandyti nereikia.
		Dirginanti	Galutinė išvada; laikoma dirginančia. Bandyti nereikia.
		Nei dirginanti, nei ėsdinanti	Galutinė išvada; laikoma nei ėsdinančia, nei dirginančia. Bandyti nereikia.
	↓ *Nėra informacijos arba turima informacija neįtikinama* ↓		
2	Atlikti odos ėsdinimo/dirginimo SAR įvertinimą	Numatomas sunkus odos pažeidimas	Laikoma ėsdinančia. Bandyti nereikia.
		Numatomas odos dirginimas	Laikoma dirginančia. Bandyti nereikia.
	↓ *Prognozuoti neįmanoma, prognozės neįtikinančios arba neigiamos* ↓		
3	Matuojama pH vertė (jei tinka, atsižvelgiama į buferinę talpą)	pH ≤ 2 arba ≥ 11,5 (esant didelei buferinei talpai, jei tinka)	Daroma prielaida, kad medžiaga yra ėsdinanti. Bandyti nereikia.
	↓ *2 < pH < 11,5 arba pH ≤ 2.0 arba ≥ 11,5 esant mažai buferinei talpai arba nesant buferinės talpos, jei tinka* ↓		
4	Įvertinami sisteminio toksiškumo per odą duomenys (gali būti įvertinama prieš 2 ir 3 žingsnius)	Labai toksiška	Toliau bandyti nereikia.
		Nėra nei ėsdinanti, nei dirginanti, kai triušiai bandomi su ribine 2000 mg/kg kūno masės ar didesne doze	Daroma prielaida, kad nėra nei ėsdinanti, nei dirginanti. Toliau bandyti nereikia.
	↓ *Tokios informacijos nėra arba ji neįtikinama* ↓		
5	Atlikite patvirtintą ir priimtiną *in vitro* arba *ex vivo* odos ėsdinimo bandymą.	Ėsdina	Daroma prielaida, kad medžiaga yra ėsdinanti ir *in vivo*. Toliau bandyti nereikia.
	↓ *Medžiaga nėra ėsdinanti* ↓		
6	Atlikite patvirtintą ir priimtiną *in vitro* arba *ex vivo* odos dirginimo bandymą	Dirgina	Daroma prielaida, kad medžiaga yra dirginanti *in vivo*. Toliau bandyti nereikia.
	↓ *Nėra patvirtintų* in vitro *arba* ex vivo *odos dirginimo metodų arba medžiaga nėra dirginanti* ↓		
7	Atlikite pradinį *in vivo* triušio bandymą su vienu gyvūnu	Sunkus odos pažeidimas	Laikoma ėsdinančia. Toliau bandyti nereikia.
	↓ *Jokio sunkaus pažeidimo* ↓		
8	Atlikite patvirtinamąjį bandymą naudojant vieną arba du papildomus gyvūnus	Ėsdina arba dirgina	Laikoma ėsdinančia arba dirginančia. Toliau bandyti nereikia.
		Nei ėsdina, nei dirgina	Laikoma neėsdinančia ir nedirginančia. Toliau bandyti nereikia.

▼C1

B.5. **ŪMUS TOKSIŠKUMAS. AKIŲ DIRGINIMAS AR ĖSDINIMAS**

1. **METODAS**

Šis metodas atitinka OECD TG 405 (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 ūmaus akių ėsdinimo ar dirginimo bandymą *in vivo*, atlikti turimų atitinkamų duomenų įrodomosios vertės analizę (1). Jei duomenų nepakanka, jų galima gauti darant nuoseklųjį bandymą (2)(3). Į bandymo strategiją įtraukti šio metodo priedėlyje aprašyti įteisinti ir priimti *in vitro* bandymai. Be to, prieš numatant daryti *in vivo* akių bandymą akių ėsdinimui prognozuoti, rekomenduojama taikyti *in vivo* odos dirginimo ar ėsdinimo bandymą.

Siekiant užtikrinti ir duomenų mokslinį patikimumą, ir gyvūnų gerovę, *in vivo* bandymai neturėtų būti svarstomi tol, kol darant duomenų įrodomosios vertės analizę nebus įvertinti visi turimi duomenys, apibūdinantys galimą medžiagos ėsdinamąjį ar dirginamąjį poveikį akims. Tokius duomenis sudaro turimų žmonių tyrimų ir (arba) bandymų su laboratoriniais gyvūnais rezultatai, ėsdinimo ar dirginimo duomenys, gauti apie vieną arba kelias medžiagas, turinčias gimininga struktūrą, arba jų mišinius, duomenys, patvirtinantys medžiagos stiprias rūgštines arba šarmines savybes (4)(5), be to, įteisintų ir priimtų *in vitro* arba *ex vivo* odos ėsdinimo ir dirginimo bandymų rezultatai (6)(6a). Tokie tyrimai gali būti padaryti prieš duomenų įrodomosios vertės analizę arba kaip jos rezultatas.

Atlikus tokią analizę gali paaiškėti, kad reikia *in vivo* ištirti kai kurių medžiagų akių ėsdinimo ar dirginimo gebą. Visais šiais atvejais prieš svarstant *in vivo* akių bandymo atlikimą, pageidautina prieš tai atlikti medžiagos poveikio odai *in vivo* bandymą ir ją įvertinti pagal B.4 bandymo metodą (7). Duomenų įrodomosios vertės analizės ir nuoseklųjų bandymų strategijos taikymas turėtų sumažinti poreikį *in vivo* bandyti tokių medžiagų, apie kurias jau yra gauta pakankamai duomenų darant kitus bandymus, akių ėsdinimo ar dirginimo poveikį. Jei taikant nuoseklųjų bandymų strategiją akių ėsdinimo arba dirginimo geba negali būti nustatyta net po odos ėsdinimo ir dirginimo *in vivo* bandymo, galima daryti *in vivo* akių ėsdinimo ar dirginimo bandymą.

▼C1

Pirmenybė teikiama į šio metodo priedėlį įtrauktai nuosekliųjų bandymų strategijai, kurią sudaro įteisinti ir priimti *in vitro* arba *ex vivo* ėsdinimo ar dirginimo bandymai. Strategiją parengė ir vienbalsiai rekomendavo OECD seminaro dalyviai (8), ji buvo priimta ir rekomenduota kaip visuotinai suderintos cheminių medžiagų klasifikavimo sistemos (GHS) bandymų strategija (9). 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 nuosekliųjų bandymų metodo turi būti pagrįstas.

1.2. APIBRĖŽTYS

Akių dirginimas – akių pokyčių sukėlimas, paveikus bandomąja medžiaga priekinį akies paviršių, jei pokyčiai visiškai išnyksta per 21 parą po veikimo.

Akių ėsdinimas – akies audinių pažeidimas arba sunkus regėjimo pablogėjimas, paveikus bandomąja medžiaga priekinį akies paviršių, jei pažeidimai ne visiškai išnyksta per 21 parą po veikimo.

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Ant bandomo gyvūno vienos akies dedama viena bandomosios medžiagos dozė; nepaveikta gyvūno akis naudojama kontrolei. Apibrėžtais laiko tarpais nustatomi ir balais įvertinami junginės, ragenos ir rainelės pažeidimai. Be to, kad būtų išsamiai įvertintas poveikis, aprašomas bet koks kitas poveikis ir neigiamas somatinis poveikis. Bandymo trukmė turi būti pakakama poveikio grįžtamumui arba negrįžtamumui įvertinti.

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 (10) 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*

Abi kiekvieno bandymui numatyto gyvūno akys patikrinamos per 24 h iki bandymo pradžios. Gyvūnai, kuriems nustatoma akių sudirgimas, akių defektai arba jau esamas ragenos pažeidimas, neturi būti naudojami.

▼C1

1.4.1.3. *Laikymo ir šėrimo sąlygos*

Gyvūnai turi būti laikomi atskiruose narveliuose. Patalpos, kurioje laikomi bandymo 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 ir jo seka: 12 h šviesos ir 12 h tamsos. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorinių gyvūnų pašaras, geriamojo vandens kiekis neribojamas.

1.4.2. **Bandymo eiga**

1.4.2.1. *Bandomosios medžiagos dėjimas*

Bandomoji medžiaga dedama į kiekvieno gyvūno vienos akies junginės maišelį, švelniai atitraukiant apatinį voką nuo akies obuolio. Vokai švelniai suspaudžiami maždaug vienai sekundei, kad būtų išvengta medžiagos nuostolių. Kita neapdorota akis naudojama kontrolei.

1.4.2.2. *Akių plovimas*

Įdėjus bandomosios medžiagos, bandomo gyvūno akių reikėtų neplauti mažiausiai 24 h, išskyrus kietąsias medžiagas (žr. 1.4.2.3.2 skirsnį) 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, nebent tai yra moksliškai pagrįsta. Jei pagalbinės grupės reikia, naudojami du triušiai. Plovimo sąlygos turi būti kruopščiai aprašomos, pvz., plovimo laikas, plovimo tirpalo sudėtis ir temperatūra, trukmė, tūris ir plovimo greitis.

1.4.2.3. *Dozės dydis*

1.4.2.3.1. Skysčių bandymas

Bandant skysčius, naudojama 0,1 ml dozė. Nereikėtų naudoti purškiklio medžiagai tiesiai į akį purkšti. Purškiamasis skystis turėtų būti išpurškiamas ir surenkamas į indą, ir tik po to jo 0,1 ml įlašinama į akį.

1.4.2.3.2. Kietųjų medžiagų bandymas

Bandant kietąsias medžiagas, pastą ir medžiagą, sudarytą iš dalelių, naudojamos medžiagos tūris turi būti 0,1 ml arba ne didesnė kaip 100 mg masė. Bandomoji medžiaga turi būti sumalta į smulkias dulkes. Kietosios medžiagos tūris matuojamas ją švelniai sutankinus, pvz., taukšint matavimo indą. Jei stebint pirmą kartą, praėjus 1 h po akies veikimo, kieta bandomoji medžiaga dar yra nepašalinta iš bandomo gyvūno akies veikiant fiziologiniams mechanizmams, akį galima praplauti fiziologiniu tirpalu arba distiliuotu vandeniu.

▼C1

1.4.2.3.3. Aerozolių bandymas

Prieš įlašinant į akį rekomenduojama visas purškiamąsias medžiagas ir aerozolius iš pradžių surinkti į indą. Viena išimtis daroma slėginiuose aerozolių purkštuvuose esančioms medžiagoms, kurių negalima sukaupti dėl garavimo. Tokiais atvejais akis atmerkiama ir bandomoji medžiaga maždaug vieną sekundę tiesiog purškiama į akį stačiu kampu iš 10 cm atstumo. Šis atstumas gali būti kitoks, atsižvelgiant į purkštuvo ir jo turinio slėgį. Reikia imtis atsargumo priemonių, kad akis nebūtų pažeista dėl purškimo slėgio. Atitinkamais atvejais gali tekti įvertinti mechaninio akies pažeidimo srauto jėga galimybę.

Aerozolio dozei įvertinti galima modeliuoti šį įpurškimo bandymą: medžiaga purškiama ant pasverto popieriaus lapo per triušio akies dydžio angą, esančią tiesiai prieš popieriaus lapą. Pagal popieriaus masės padidėjimą nustatomas apytikris į akį įpurškiamas medžiagos kiekis. Lakiųjų medžiagų dozė gali būti įvertinta pasveriant indą, į kurį surenkama medžiaga, prieš medžiagos naudojimą ir po jo.

1.4.2.4. *Pradinis bandymas (in vivo akies dirginimo ar ėsdinimo bandymas su vienu gyvūnu)*

Kaip aiškiai nurodyta nuosekliųjų bandymų strategijos aprašyme (žr. 1 priedėlį), labai rekomenduojama *in vivo* bandymą iš pradžių daryti su vienu gyvūnu.

Jei šio bandymo rezultatai rodo, kad taikant aprašytąją metodiką medžiaga yra akį ėsdinanti arba labai ją dirginanti, kiti akies dirginimo bandymai neturi būti daromi.

1.4.2.5. *Vietinis nuskausminimas*

Galima naudoti vietinio nuskausminimo priemones atsižvelgiant į kiekvieną atskirą atvejį. Jei duomenų įrodomosios vertės analizė rodo, kad medžiaga gali sukelti skausmą arba pradinis bandymas rodo skausmingą gyvūno reakciją, prieš įlašinant bandomąją medžiagą galima naudoti vietinio nuskausminimo priemonę. Reikia kruopščiai parinkti vietinio nuskausminimo priemonės tipą, koncentraciją ir dozę, siekiant užtikrinti, kad dėl jos naudojimo nebūtų reakcijos į bandomosios medžiagos poveikį skirtumų. Kontrolinė akis taip pat nuskausminama.

1.4.2.6. *Patvirtinamasis bandymas (in vivo akies dirginimo bandymas su papildomais gyvūnais)*

Jei darant pradinį bandymą ėsdinančio poveikio nepastebima, dirginantis poveikis arba neigiama reakcija turi būti patvirtinta naudojant ne daugiau kaip du papildomus gyvūnus. Jei darant pradinį bandymą pastebimas labai didelis dirginantis poveikis, rodantis, kad darant patvirtinamąjį bandymą gali būti sukeltas stiprus (neišnykstantis) poveikis, šį bandymą rekomenduojama daryti nuosekliai – gyvūnus naudoti po vieną paeiliui, o ne abu iš karto. Jei antrajam gyvūnui pasireiškia ėsdinamasis arba sunkus dirginamasis poveikis, bandymas nutraukiamas. Silpnam arba vidutinio dydžio dirginamajam poveikiui patvirtinti gali būti reikalingi papildomi gyvūnai.

▼C1

1.4.2.7. *Stebėjimo laikotarpis*

Stebėjimo laikotarpio trukmė turi būti pakankama, kad būtų visiškai įvertintas stebimo poveikio dydis ir grįžtamumas. Tačiau bandymas turi būti baigtas bet kuriuo momentu, kai tik gyvūnui pasireiškia ilgalaikiai didelio skausmo arba kančios požymiai (9). Siekiant nustatyti poveikio grįžtamumą gyvūnai paprastai stebimi 21 parą po bandomosios medžiagos davimo. Jei pastebima, kad poveikis pradeda nykti anksčiau nei baigiantis 21 parai, bandymas nutraukiamas tuo momentu.

1.4.2.7.1. Klinikiniai stebėjimai ir akių reakcijos įvertinimas balais

Akys tiriamos praėjus 1, 24, 48, ir 72 h po bandomosios medžiagos įdėjimo. Gyvūnai bandomi ne ilgiau, nei būtina galutinei informacijai gauti. Gyvūnai, kuriems pasireiškia ilgalaikis didelis skausmas arba kančia, turi būti iš karto humaniškai numarinami, o medžiaga atitinkamai įvertinta. Turi būti humaniškai numarinami gyvūnai, kuriems po įlašinimo atsiranda šie pažeidimai: ragenos pradūrimas arba didelės ragenos opos, įskaitant stafilomą; kraujo atsiradimas priekinėje akies kameroje; 4 balų ragenos drumstumas, kuris nepraeina po 48 h; šviesos reflekso nebuvimas (2 balų rainelės reakcija) ilgiau kaip 72 h; junginės membranos opos; junginės arba niktitacinės membranos nekrozė, arba nekrozinio audinio lupimasis. Numarinti reikia todėl, kad tokie pažeidimai paprastai yra negrįžtami.

Gyvūnams, kurių akių pažeidimų nepastebima, bandymas baigiamas ne anksčiau kaip po trijų dienų po įlašinimo. Gyvūnai su nedideliais ir vidutiniais pažeidimais turi būti stebimi tol, kol pažeidimai pranyksta, arba 21 parą, o po to bandymas baigiamas. Apžiūrėti reikia po 7, 14 ir 21 paros, kad būtų galima nustatyti pažeidimų tipą ir jų grįžtamumą arba negrįžtamumą.

Kiekvienos apžiūros metu užrašomi akių (junginės, ragenos ir rainelės) pažeidimai balais (1 lentelė). Be to, nurodomi visi kiti akies pažeidimai (pvz., panuso, dėmių atsiradimas) arba neigiamas somatinis poveikis.

Kad būtų lengviau tikrinti reakciją galima naudoti binokulinę lupą, rankinę plyšinę lempą, biologinį mikroskopą arba kitokį tinkamą įtaisą. Užrašius stebėjimus po 24 h, akys gali būti dar ištiriamos 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 mokomas taikyti įvertinimo balais sistemą.

2. **DUOMENYS**

2.1. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS

Akių dirginimo rezultatai įvertinami pagal pažeidimų tipą ir sunkumą bei atsižvelgiant į grįžtamumą arba į jo nebuvimą. Atskiri rezultatai nėra medžiagos dirginamųjų savybių absoliutusis įvertis, kadangi dar įvertinamas kitas bandomosios medžiagos poveikis. Į šiuos atskirus rezultatus reikėtų žiūrėti kaip į atskaitos vertes, kurios įgauna prasmę, kai yra patvirtinamos išsamiais visų kitų stebėjimų aprašymais ir įvertinimais.

▼C1

3. **ATASKAITOS RENGIMAS**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

In vivo bandymo pagrindimas: jau turimų bandymų duomenų įrodomosios vertės analizė, įskaitant nuosekliųjų bandymų strategijos taikymo rezultatus:

— ankstesnių bandymų atitinkamų duomenų aprašymas,

— duomenys, gauti kiekvienoje bandymų strategijos stadijoje,

— darytų *in vitro* bandymų aprašymas, įskaitant išsamią informaciją apie procedūras, rezultatus, gautus tiriant bandomąją ar etaloninę medžiagas,

— daryto *in vivo* odos dirginimo ar ėsdinimo bandymo aprašymas, įskaitant gautus rezultatus,

— duomenų įrodomosios vertės analizė, kuria pagrindžiamas *in vivo* bandymas.

Bandomoji medžiaga:

— tapatumas (pvz., CAS numeris, šaltinis, grynumas, žinomos priemaišos, siuntos numeris),

— fizikinė būsena ir fizikinės ir cheminės savybės (pvz., pH, lakumas, tirpumas, stabilumas, reagavimas su vandeniu),

— sudėtis ir komponentų procentinė dalis, jei tai mišinys,

— jei naudojama vietinio nuskausminimo priemonė: jos tapatumas, grynumas, tipas, dozė ir galima sąveika su bandomąja medžiaga.

Nešiklis:

— tapatumas, koncentracija (jei tinka), naudojamas tūris,

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas.

Bandomieji gyvūnai:

— naudota rūšis ar veislė, kitų nei baltųjų triušių naudojimo pagrindimas,

— kiekvieno gyvūno amžius bandymo pradžioje,

— kiekvienos lyties gyvūnų skaičius bandymo ir kontrolinėje (jei reikia) grupėje,

— atskirų gyvūnų masė bandymo pradžioje ir pabaigoje,

— gyvūnų šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir kt.

Rezultatai:

— metodo, taikyto dirginimui kiekvienu stebėjimo momentu įvertinti balais (pvz., rankinė plyšinė lempa, biologinis mikroskopas, fluoresceinas), aprašymas,

▼C1

— kiekvieno gyvūno dirginimo ar ėsdinimo reakcijos duomenų, gautų kiekvienu stebėjimo momentu iki gyvūno pašalinimo iš bandymo, lentelių sudarymas,

— pastebėto dirginimo arba ėsdinimo pobūdžio ir laipsnio pasakojamasis aprašymas,

— visų kitų akies pažeidimų aprašymas (pvz., vaskuliarizacija, panuso susidarymas, sąaugų, dėmių atsiradimas),

— bet kokio ne akims daromo neigiamo vietinio ir somatinio poveikio aprašymas, visi histopatologinio tyrimo rezultatai, jei yra.

Rezultatų aptarimas.

3.2. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Akių dirginimo rezultatus, gautus tiriant laboratorinius gyvūnus, ekstrapoliuoti žmonėms galima tik tam tikru mastu. Daugeliu atvejų baltieji triušiai yra jautresni akis dirginančioms arba ėsdinančioms medžiagoms nei žmonės.

Reikia stengtis į rezultatų aiškinimą neįtraukti antrinės infekcijos sukelto dirginimo.

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) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C, Dossou, K.G, Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, h., Gupta, K.C., Hill, R.N. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, p. 159–164.

3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, p. 161–177

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 Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, p. 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, p. 227–231.

6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsaile, 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.

6a) Testing Method B.40 Skin Corrosion.

7) Testing method B.4. Acute toxicity: dermal irritation/corrosion.

8) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicol ogical Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

▼C1

9) 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).

10) 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).

▼C1

1 lentelė

Akių pažeidimo vertinimo balais skalė

Ragena

Drumstis: tankumo laipsnis (duomenys imami iš tankiausios srities) (*)	
Opėjimo arba drumsties nėra	0
Išsibarsčiusios arba išsklaidytos drumsties sritys (išskyrus nedidelį normalaus blizgesio sumažėjimą), rainelės elementai aiškiai matomi	1
Lengvai įžiūrima pusskaidrė sritis, rainelės elementai šiek tiek dulsvi	2
Perlamutrinės sritys, rainelės elementai nematomi, vyzdžio dydis vos įžiūrimas	3
Ragena matinė, dėl drumsties rainelės nesimato	4

Didžiausias įmanomas balas: 4

PASTABOS

(*) Turi būti nurodyta ragenos drumsties sritis.

Rainelė

Normali	0
Labai pagilėjusios raukšlės, kongestija, pabrinkimas, vidutiniška junginės apie rageną hiperemija; arba injekcija; rainelė vis dar reaguoja į šviesą (vangi reakcija laikoma poveikiu)	1
Kraujavimas, stiprus suardymas arba nėra reakcijos į šviesą	2

Didžiausias įmanomas balas: 2

Junginė

Raudonumas (taikoma voko ir obuolio junginei, išskyrus rageną ir rainelę)

Normali	0
Kai kurie kraujo indai hiperemiški (įšvirkšta)	1
Išsklaidyta, tamsiai raudonos spalvos, atskiri indai sunkiai įžiūrimi	2
Išsklaidyta, jautienos raudonumo spalvos	3

Didžiausias įmanomas balas: 3

Chemozė

Paburkimas (taikoma vokams ir (arba) niktitacinėms membranoms)

Paburkimo nėra	0
Nedidelis paburkimas, didesnis nei normalus	1
Akivaizdus paburkimas, vokai iš dalies išvirsta	2
Paburkimas, pusiau užmerkti vokai	3
Paburkimas, vokai užmerkti daugiau nei per pusę	4

Didžiausias įmanomas balas: 4

▼C1

PRIEDĖLIS

Nuosekliųjų bandymų strategija akių 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 iššaukti 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 iššaukti sunkias reakcijas.

Turimai informacijai apie medžiagų dirginamąjį ir ėsdinamąjį poveikį akims įvertinti rekomenduojama taikyti duomenų įrodomosios vertės analizę, kuri leistų spręsti, ar tokio poveikio galimybei apibūdinti reikia daryti papildomus tyrimus, išskyrus *in vivo* akių 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). 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-ajame jungtiniame cheminių medžiagų komiteto ir cheminių medžiagų darbo grupės posėdyje (2).

Nors ši nuosekliųjų bandymų strategija nėra sudėtinė B.5 bandymo metodo dalis, ji apibūdina rekomenduojamą būdą akių dirginimo ar ėsdinimo charakteristikoms nustatyti. 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 medžiagų akių dirginimo ar ėsdinimo savybes, kad būtų galima nuosekliai gauti reikiamų duomenų apie medžiagas, kurioms reikalingi papildomi tyrimai arba kurios nebuvo tirtos. Strategijoje nurodoma iš pradžių daryti įteisintus ir priimtus *in vitro* arba *ex vivo* bandymus ir tik po to naudoti odos ėsdinimo ar dirginimo bandymo metodą B.4 konkrečiomis aplinkybėmis (3) (4).

ĮVERTINIMO IR BANDYMO STRATEGIJOS APRAŠYMAS

Siekiant nustatyti *in vivo* akių 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 turėtų būti daroma visų atitinkamų duomenų apie konkrečios medžiagos arba jos struktūrinių 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 apie poveikį žmonėms ir gyvūnams, įvertinimas (*1 pakopa*). Iš pradžių nagrinėjami tiriant žmones gauti duomenys, pvz., klinikiniai arba profesinių susirgimų tyrimai ir bylų ataskaitos, ir (arba) akių tyrimų su gyvūnais duomenys, kadangi jie suteikia informacijos, tiesiogiai susijusios su poveikiu akims. Toliau įvertinami turimi odos ėsdinimo ar dirginimo duomenys, gauti darant tyrimus su žmonėmis ir (arba) gyvūnais. Medžiagos, kurios yra žinomos kaip ėsdinančios arba labai dirginančios akis, neturėtų būti lašinamos į gyvūnų akis, be to, nereikėtų lašinti medžiagų, kurios ėsdina arba dirgina odą; tokios medžiagos laikomos ėsdinančiomis ir (arba) dirginančiomis akis. Medžiagos, apie kurias yra pakankamai duomenų, kad jos nėra ėsdinančios arba dirginančios, atsižvelgiant į ankstesnius akių tyrimus, irgi neturėtų būti bandomos darant *in vivo* akių 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 akis, 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 bei akis turi būti nustatoma taikant įteisintus ir priimtus SAR metodus.

Fizikinės ir cheminės savybės ir cheminis reaktyvumas (3 pakopa). Medžiagos, turinčios ribines pH vertes, pvz., ≤ 2,0 arba ≥ 11,5, gali turėti didelį vietinį poveikį. Jei ribinė pH vertė yra pagrindinė savybė, pagal kuria medžiaga identifikuojama kaip akis ėsdinanti medžiaga, galima atsižvelgti į rūgšties ar šarmo atsargą (arba buferinę talpą) (5)(6). Jei buferinė talpa leidžia daryti prielaidą, kad medžiaga *gali* nebūti akis ėsdinanti medžiagą 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).

Kitos turimos informacijos nagrinėjimas (4 pakopa). Šioje stadijoje įvertinama visa turima informacija apie sisteminį toksiškumą per odą. Nagrinėjamas ūmus bandomosios medžiagos toksiškumas per odą. Jei buvo įrodyta, kad bandomoji medžiaga yra labai toksiška per odą, nebūtina bandyti jos poveikio akims. Nors nebūtinai turi būti ryšys tarp ūmaus toksiškumo per odą ir akių dirginimo ar ėsdinimo, galima daryti prielaidą, kad medžiagai esant labai toksiškai per odą, ji taip pat bus labai toksiška jos įlašinus į akis. Be to, tokie duomenys gali būti nagrinėjami tarp 2 ir 3 pakopų.

In vitro arba ex vivo bandymų rezultatai (5 *ir 6 pakopos*). Medžiagų, kurios pasirodė ėsdinančios arba labai dirginančios darant patvirtinto tinkamumo ir priimtą *in vitro* arba *ex vivo* bandymą (7)(8), skirtą šiam konkrečiam poveikiui akims arba odai įvertinti, nereikia bandyti su gyvūnais. Galima padaryti prielaidą kad tokios medžiagos turės panašų sunkų poveikį *in vivo*. Jei įteisintų ir priimtų *in vitro* ar *ex vivo* bandymų nėra, 5 ir 6 pakopos praleidžiamos ir iš karto pereinama prie 7 pakopos.

Medžiagos dirginamojo arba ėsdinamojo poveikio odai įvertinimas in vivo (7 *pakopa*). Jei pirmiau išvardytų tyrimų duomenų nepakanka, norint atlikti įtikinamą duomenų įrodomosios vertės analizę apie medžiagos gebą dirginti ar ėsdinti akis, iš pradžių įvertinama *in vivo* medžiagos geba dirginti ar ėsdinti odą, taikant bandymo metodą B.4 (4) ir jo priedą (9). Jei įrodoma, kad medžiaga ėsdina arba labai dirgina odą, ji laikoma akis ėsdinančia ir dirginančia medžiaga, jei kita informacija nepatvirtina priešingos išvados. Taigi *in vivo* akių bandymo daryti nereikėtų. Jei medžiaga nėra ėsdinanti arba labai dirginanti odą, turėtų būti daromas *in vivo* akių bandymas.

▼C1

Bandymas su triušiais in vivo (8 ir 9 pakopos). In vivo akių bandymą reikėtų pradėti darant pradinį bandymą su vienu gyvūnu. Jei šio bandymo rezultatai rodo, kad medžiaga yra labai dirginanti arba ėsdinanti akis, toliau bandyti nereikia. Jei darant pradinį bandymą ėsdinimo arba sunkus dirginantis poveikis nepastebimas, daromas patvirtinamasis bandymas, naudojant du papildomus gyvūnus.

NUORODOS

1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicol ogical 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 28t 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, p. 161–177.

4) Testing method B.4. Acute Toxicity: dermal irritation/corrosion.

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, p. 19–26.

6) 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, p. 227–231.

7) 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.

8) Testing Method B.40 Skin Corrosion.

9) Annex to Testing method B.4: A Sequential Testing Strategy for Skin Irritation and Corrosion.

▼C1

Schema

AKIŲ DIRGINIMO AR ĖSDINIMO BANDYMO IR ĮVERTINIMO STRATEGIJA

	Veikla	Rezultatas	Išvada
1	Yra duomenų apie poveikį žmonių ir (arba) gyvūnų akims	Sunkus akių pažeidimas	Galutinė išvada; laikoma akis ėsdinančia. Bandyti nereikia.
		Dirgina akis	Galutinė išvada; laikoma, akis dirginančia. Bandyti nereikia.
		Akių neėsdina ir nedirgina	Galutinė išvada; laikoma, kad akių neėsdina ir nedirgina. Bandyti nereikia.
	Yra duomenų apie žmones ir (arba) gyvūnus, kurie rodo ėsdinantį poveikį odai	Ėsdina odą	Daroma prielaida, kad ėsdina akis. Bandyti nereikia.
	Yra duomenų apie žmones ir (arba) gyvūnus, kurie rodo labai dirginantį poveikį odai	Labai dirgina odą	Daroma prielaida, kad dirgina akis. Bandyti nereikia.
	↓		
	Informacijos nėra arba turima informacija neįtikinanti		
	↓		
2	Įvertinkite akių ėsdinimo/ dirginimo SAR	Numatomas sunkus akių pažeidimas	Daroma prielaida apie akių ėsdinimą. Bandyti nereikia
		Numatomas akių dirginimas	Daroma prielaida apie akių dirginimą. Bandyti nereikia.
	Įvertinami SAR dėl odos ėsdinimo	Numatomas odos ėsdinimas	Daroma prielaida apie akių ėsdinimą. Bandyti nereikia.
	↓		
	Negalima prognozuoti arba prognozės neįtikinančios arba neigiamos		
	↓		
3	Matuojama pH vertė (jei tinka, atsižvelgiama į buferine talpą)	pH ≤ 2 arba ≥ 11.5 (esant didelei buferinei talpai, jei tinka)	Daroma prielaida apie akių ėsdinimą. Bandyti nereikia.
	↓		
	2 < pH < 11,5, arba pH ≤ 2,0 arba ≥ 11,5, esant mažai buferinei talpai arba nesant buferinės talpos, jei tinka		
	↓		
4	Įvertinami sisteminio toksiškumo per odą duomenys	Labai toksiška esant koncentracijai, kuria būtų bandomos akys	Medžiaga būtų per daug toksiška, kad būtų galima bandyti. Bandyti nereikia.
	↓		
	Tokios informacijos nėra arba medžiaga nėra labai toksiška		
	↓		

▼C1

5	Daromas įteisintas ir priimtas *in vitro* arba *ex vivo* akių ėsdinimo bandymas	Ėsdina	Daroma prielaida apie akių ėsdinimą. Daugiau bandyti nereikia.
	↓		
	Medžiaga neėsdina arba įteisintų ir priimtų „in vitro” *arba* „ex vivo” *akių ėsdinimo bandymo metodų*		
	↓		
6	Daromas įteisintas ir priimtas *in vitro* arba *ex vivo* akių dirginimo bandymas	Dirgina	Daroma prielaida apie akių dirginimą. Daugiau bandyti nereikia.
	↓		
	Medžiaga nedirgina arba nėra įtvirtintų ir priimtų „in vitro” *arba* „ex vivo” *akių dirginimo bandymo metodų*		
	↓		
7	Bandymu įvertinamas *in vivo* odos dirginimas ar ėsdinimas (Žr. bandymo metodą B.4 ir jo priedėlį)	Ėsdina arba labai dirgina	Daroma prielaida apie akių ėsdinimą. Daugiau bandyti nereikia.
	↓		
	Medžiaga odos neėsdina arba labai nedirgina		
	↓		
8	Daromas pradinis *in vivo* triušio akių bandymas, naudojant vieną gyvūną	Sunkus akių pažeidimas	Laikoma akis ėsdinančia. Daugiau bandyti nereikia.
	↓		
	Nėra sunkaus pažeidimo arba jokios reakcijos		
	↓		
9	Daromas patvirtinamasis bandymas, naudojant vieną arba du papildomus gyvūnus	Ėsdina arba dirgina	Laikoma akis ėsdinančia arba dirginančia. Daugiau bandyti nereikia.
		Nei ėsdina, nei dirgina	Laikoma akių neėsdinančia ir nedirginančia. Daugiau bandyti nereikia

▼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 — Sėklidžių prielipų — Antinksčių — Prostatos ir sėklinių pūslelių su koaguliatorių liaukomis	— Kiaušidžių — Gimdos su gimdos kakleliu — Skydliaukės
Histopatologinis tyrimas	
— Lytinių liaukų: — Sėklidžių — Kiaušidžių — Kitų lytinių organų: — Sėklidžių prielipų — Prostatos ir sėklinių pūslelių su koaguliatorių liaukomis — Gimdos su gimdos kakleliu — Antinksčių — Skydliaukės — Makšties	— Makšties tepinėlių — Patinų pieno liaukų — Hipofizės
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

▼M4

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

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.

▼C1

B.10. **MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJŲ BANDYMAS *IN VITRO***

1. **METODAS**

Šis metodas atitinka OECD TG 473 – Žinduolių chromosomų aberacijos bandymą *in vitro* (1997).

1.1. ĮVADAS

Chromosomų aberacijų *in vitro* bandymo tikslas – identifikuoti medžiagas, sukeliančias struktūrines auginamų žinduolių ląstelių chromosomų aberacijas (1)(2)(3). Struktūrinės aberacijos gali būti dviejų tipų – chromosominės arba chromatidinės. Nors dauguma cheminių mutagenų sukelia chromatidines aberacijas, tačiau pasitaiko ir chromosominių aberacijų. Poliploidiškumo intensyvumas gali reikšti, kad cheminė medžiaga gali sukelti chromosomų skaičiaus pasikeitimus. Tačiau šio metodo tikslas nėra išmatuoti chromosomų skaičiaus pokyčius, ir paprastai tam jis nėra taikomas. Daugelio žmonių genetiškai paveldimų ligų priežastis yra chromosomų mutacijos bei su jomis susiję įvykiai; esama pakankamai įrodymų, kad žmonių ir eksperimentinių gyvūnų vėžį sukelia somatinėse ląstelėse esančių onkogenų bei navikų supresorinių genų struktūriniai pokyčiai, atsiradę dėl chromosomų mutacijų bei su jomis susijusių įvykių.

Tiriant chromosomų aberacijas *in vitro* galima naudoti gerai žinomų ląstelių linijų, ląstelių kamienų arba pirminių ląstelių kultūras. Naudojamos ląstelės pasirenkamos pagal jų gebėjimą augti kultūroje, kariotipų stabilumą, chromosomų skaičių, chromosomų įvairovę ir spontaninį chromosomų aberacijų dažnį.

Atliekant bandymus *in vitro* reikia naudoti egzogeninį metabolinės aktyvacijos šaltinį. Šioje metabolinės aktyvacijos sistemoje negalima visiškai atkartoti žinduolių *in vivo* sąlygų. Reikia stengtis išvengti tokių sąlygų, kurioms esant būtų gaunami teigiami rezultatai, neatspindintys tikrojo mutageniškumo ir galintys atsirasti dėl pH ar osmosinio slėgio pokyčių arba ypač padidėjus citotoksiškumui (4)(5).

Šis bandymas atliekamas galimiems žinduolių mutagenams ar kancerogenams aptikti. Daugelis cheminių junginių, apie kuriuos, atlikus šį bandymą, gaunamas teigiamas rezultatas, yra žinduolių kancerogenai; tačiau nėra šimtaprocentinio ryšio tarp šio bandymo ir kancerogeniškumo. Ryšys priklauso nuo cheminių medžiagų klasės; yra neginčijamų įrodymų kad šio bandymo metu negalima nustatyti tam tikrų kancerogenų, nes pasirodo, jog jų poveikis yra kitas nei tiesioginis DNR suardymas.

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

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.

▼C1

Endoreduplikacija – procesas, kurio metu pasibaigus DNR replikacijos S (sintezės) periodui, branduolys nepradeda dalytis mitozės būdu, bet prasideda naujas S (sintezės) periodas. Šitaip atsiranda chromosomos, turinčios 4, 8, 16 ir t. t. chromatidžių.

Plyšys – achromatinė, mažesnė nei vienos chromatidės plotis, spraga, kurioje yra mažiausias skaičius klaidingai suporuotų bazių.

Mitozinis indeksas – mitozės metafazėje esančių ląstelių santykis, padalintas iš viso ląstelių populiacijos skaičiaus, rodantis tos ląstelių populiacijos proliferacijos laipsnį.

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

Ląstelių kultūros veikiamos bandomąja chemine medžiaga esant metabolinei aktyvacijai arba jos nesant. Ląstelių kultūras paveikus bandomąja medžiaga, tam tikrais laiko tarpais jos yra veikiamos ląstelių dalijimąsi metafazėje stabdančia medžiaga (pavyzdžiui Kolcemidu arba kolchicinu), surenkamos, dažomos, o metafazėje esančios ląstelės tiriamos mikroskopu, kad būtų nustatomos chromosomų aberacijos.

1.4. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.4.1. **Preparatai**

1.4.1.1. *Ląstelės*

Galima naudoti įvairiausias ląstelių linijas, kamienus arba pirmines ląstelių, tarp jų ir žmonių ląstelių kultūras (pvz., kiniško žiurkėno fibroblastus, žmogaus ar kitų žinduolių periferinio kraujo limfocitus).

1.4.1.2. *Terpė ir kultivavimo sąlygos*

Kultūros turėtų būti kultivuojamos reikiamoje terpėje, esant reikiamoms inkubacijos sąlygoms (kultivavimui skirtuose induose, esant reikiamai CO_2 koncentracijai, temperatūrai ir drėgmei). Reguliariai tikrinama, ar pripažintos ląstelių linijos ir kamienai išlaiko pastovų modalinį chromosomų skaičių, ar jos neužsikrėtusios mikoplazmomis, o jei yra užkrėstos, tai toliau nebenaudojamos. Turi būti žinoma ląstelių ciklo trukmė bei taikomos kultivavimo sąlygos.

1.4.1.3. *Kultūrų paruošimas*

Gerai žinomos ląstelių linijos ir kamienai: ląstelės yra padauginamos iš kamieninių kultūrų, pasėjamos kultūrinėje terpėje tokiu tankumu, kad prieš ląsteles surenkant, kultūros nesusilietų, po to jos inkubuojamos 37 °C temperatūroje.

▼C1

Limfocitai: į kultūrinę terpę, turinčią mitogeno (pvz., fitohemagliutinino), įnešamas sveikų tiriamųjų kraujo, paveikto antikoaguliantu (pvz., heparinu), mėginys arba iš to kraujo išskirti limfocitai ir inkubuojama 37 °C temperatūroje.

1.4.1.4. *Metabolinė aktyvacija*

Ląstelės turėtų būti paveikiamos bandomąja chemine medžiaga tiek esant atitinkamai metabolinės aktyvacijos sistemai, tiek ir be jos. Plačiausiai naudojama sistema yra iš graužikų kepenų, paveiktų tokiais fermentinį aktyvumą skatinančiomis medžiagomis kaip AROCLOR 1254 (6) (7) (8) (9) ar fenobarbitono ir ß-naftoflavono mišinys (10) (11) (12), postmitochondrinė frakcija, praturtinta kofaktoriumi.

Post-mitochondrinė frakcija paprastai naudojama tokių koncentracijų, kurių intervalas bandymo metu naudojamoje galutinėje terpėje siekia 1–10 % (v/v). Metabolinės aktyvacijos sistema gali priklausyti nuo bandomosios cheminės medžiagos klasės. Kai kuriais atvejais tikslinga naudoti daugiau nei vieną post-mitochondrinės frakcijos koncentraciją.

Endogeninę aktyvaciją gali pagerinti, taikant tokias naujoves kaip genetinės inžinerijos pagalba gautas ląstelių linijas, gaminančias specifinius, aktyvacijoje dalyvaujančius fermentus. Bandyme naudojamų ląstelių linijų pasirinkimas turėtų būti moksliškai pagrįstas (pvz., pagal citochromo P450 izofermento svarbą bandomos cheminės medžiagos metabolizmui).

1.4.1.5. *Bandoma cheminė medžiaga (preparatas)*

Kietosios bandomosios medžiagos turėtų būti ištirpinamos arba suspenduojamos atitinkamuose tirpikliuose arba tirpinančiuosiuose įrenginiuose, o jeigu reikia, tai prieš paveikiant ląsteles šia medžiaga, ir praskiestos. Prieš bandymą į bandomąją sistemą gali būti tiesiogiai įnešamos ir (arba) praskiedžiamos skystosios bandomosios medžiagos. Turėtų būti naudojami naujai paruošti bandomosios medžiagos preparatai, jeigu šių medžiagų stabilumo tyrimo duomenys nerodo, kad juos galima saugoti.

1.4.2. **Bandymo sąlygos**

1.4.2.1. *Tirpiklis (nešiklis)*

Tirpiklis (nešiklis) neturėtų chemiškai reaguoti su bandomąja chemine medžiaga ir turėtų būti užtikrinta, kad ląstelės liks išsaugotos bei bus išlaikytas S9 aktyvumas. Jeigu naudojami gerai nežinomi tirpikliai (nešikliai), reikia turėti duomenų, įrodančių jų tinkamumą (suderinamumą su medžiaga). Jei įmanoma, tai pirmiausia rekomenduojama naudoti vandeninį tirpiklį (nešiklį). Kai bandomos vandenyje nestabilios cheminės medžiagos, tai naudojamuose organiniuose tirpikliuose neturėtų būti vandens. Vandenį galima pašalinti molekuliniu filtru.

1.4.2.2. *Veikimo koncentracijos*

Parenkant pačią didžiausią koncentraciją, vadovaujamasi tokiais kriterijais, kaip citotoksiškumas, tirpumas bandomojoje sistemoje ir pH arba osmosinio slėgio pokyčiai.

Citotoksiškumas turėtų būti nustatomas pagrindinio eksperimento metu, esant metabolinei aktyvacijai, remiantis atitinkamais ląstelių vientisumo ir augimo rodikliais, tokiais kaip ląstelių kolonijų susiliejimo laipsnis, gyvų ląstelių skaičius arba mitozinis indeksas. Pirminio eksperimento metu būtų naudinga nustatyti toksiškumą ir tirpumą.

▼C1

Turėtų būti naudojamos bent trys koncentracijos. Jei nustatomas citotoksiškumas, tai šios koncentracijos turėtų svyruoti nuo maksimalaus iki minimalaus (arba jokio) citotoksiškumo laipsnio; tai reiškia, kad koncentracijos turės būti atskirtos tiktai faktoriumi, esančiu tarp 2 ir √10. Ląstelių surinkimo metu inde, kur bandomosios medžiagos koncentracija didžiausia, turėtų būti pastebima, kad gerokai sumažėjo ląstelių kolonijų susiliejimo laipsnis ir ląstelių skaičius arba mitozinis indeksas (visi sumažėjo daugiau nei 50 %). Mitozinis indeksas yra tik netiesioginis citotoksinių/citostatinių poveikių įvertinimo matas ir priklauso nuo laiko praėjusio po bandomosios medžiagos poveikio. Tačiau mitozinis indeksas tinka ląstelių, auginamų suspensijoje, kultūroms, kuriose kiti toksiškumo bandymai gali būti sudėtingi ir praktiškai neįmanomi. Duomenys apie ląstelių ciklo kinetinius parametrus, tokius kaip vidutinis ląstelių kartos susiformavimo laikas, gali būti panaudoti kaip pagalbinė informacija. Tačiau vidutinis ląstelių kartos susiformavimo laikas, laikomas bendru vidurkiu, ne visada parodo, kad egzistuoja sulėtinto vystymosi subpopuliacijos, ir netgi menkas ląstelių susiformavimo laiko pailgėjimas gali būti susijęs su kur kas ilgesne optimalaus aberacijų skaičiaus atsiradimo trukme.

Kai medžiagos yra pakankamai necitotoksiškos, tai didžiausia bandomosios medžiagos koncentracija turėtų būti 5 µl/ml, 5,5 mg/ml arba 0,01 M, priklausomai nuo to, kuri iš visų išvardytų koncentracijų yra pati mažiausia.

Kai medžiagos yra gana netirpios ir yra netoksiškos tokios koncentracijos, kuri yra mažesnės už tą koncentraciją, kuriai esant medžiagos netirpsta, tai baigiantis veikimui bandomąja medžiaga, didžiausios naudojamos dozės koncentracija turėtų viršyti tirpumo ribą paruoštoje, kultivavimui skirtoje terpėje. Kai kuriais atvejais, pavyzdžiui, kai toksiškumas pasireiškia tik tada, kai medžiagos koncentracija yra truputį didesnė už pačią mažiausią koncentraciją, kuriai esant medžiaga visiškai netirpsta, rekomenduojama patikrinti daugiau nei vieną koncentraciją, kurioje susiformuoja matomas precipitatas. Derėtų įvertinti tirpumą prieš veikimą bandomąja chemine medžiaga, ir po jo, kadangi veikiant bandomąja medžiaga, tirpumas gali pakisti dėl ląstelių ir S9 serumo, esančių bandomojoje sistemoje. Netirpumą galima nustatyti plika akimi. Precipitato susidarymas neturėtų trukdyti įvertinti duomenis.

1.4.2.3. *Neigiami ir teigiami kontroliniai mėginiai*

Atliekant kiekvieną eksperimentą, esant metabolinei aktyvacijai, arba jai nesant, tuo pačiu metu naudojami teigiami ir neigiami (tirpiklio arba nešiklio) kontroliniai mėginiai. Kai naudojamasi metaboline aktyvacija, tai kartu su teigiamu kontroliniu mėginiu turi būti naudojama aktyvuojanti cheminė medžiaga tam, kad būtų sukuriamas atsakas į mutageną.

Teigiamuose kontroliniuose mėginiuose turi būti tokios žinomo elastogeno koncentracijos, kurioms esant bei veikiant bandomąja medžiaga, būtų galima nesunkiai sumažinti pašalinį foną pakartotinai, o tai parodo bandomosios sistemos jautrumą.

Pasirenkamos tokios teigiamos kontrolinės dozės, kad gaunami poveikiai būtų ryškūs, bet tyrėjas ne iš karto atpažintų užkoduotą objektinį stiklelį. Žemiau pateikiami teigiamuose kontroliniuose mėginiuose esančių cheminių medžiagų pavyzdžiai:

Metabolinės aktyvacijos sąlygos	Medžiaga	CAS Nr.	Einecs Nr.
Egzogeninė metabolinė aktyvacija nevyksta	metilmetansulfonatas	66–27–3	200–625–0
	etilmetansulfonatas	62–50–0	200–536–7

▼C1

Metabolinės aktyvacijos sąlygos	Medžiaga	CAS Nr.	Einecs Nr.
	etilnitrošlapalas	759–73–9	212–072–2
	mitomicinas C	50–07–7	200–008–6
	4-nitrokvinolino-N-oksidas	56–57–5	200–281–1
Egzogeninė metabolinė aktyvacija vyksta	benzopirenas	50–32–8	200–028–5
	ciklofosfamidas ciklofosfamido-monohidratas	50–18–0 6055–19–2	200–015–4

Galima naudoti ir kitas teigiamas kontrolines chemines medžiagas. Kai įmanoma, tai apsvarstomas teigiamų kontrolinių cheminių medžiagų, priklausančių konkrečiai klasei, panaudojimas.

Auginant kiekvieną ląstelių rinkinį, reikia naudoti neigiamus kontrolinius mėginius, sudarytus iš terpėje esančio pavienio tirpiklio ar nešiklio ir kurie paveikiami šia terpe lygiai taip pat kaip ir ląstelių kultūros. Taip pat reikia papildomai naudoti ir nepaveiktus kontrolinius mėginius, nekreipiant dėmesio į tai, kad anksčiau atliktų eksperimentų aprašuose nurodyta, jog pasirinktas tirpiklis nesukėlė jokio žalingo ar mutageninio poveikio.

1.4.3. **Bandymo atlikimo metodika**

1.4.3.1. *Veikimas bandomąja chemine medžiaga*

Proliferuojančios ląstelės veikiamos bandomąja medžiaga esant metabolinės aktyvacijos sistemai arba jai nesant. Limfocitai veikiami bandomąja medžiaga, praėjus maždaug 48 valandoms po stimuliacijos mitogenu.

1.4.3.2. Paprastai naudojamos kiekvienos koncentracijos pakartotinės kultūros, ypač rekomenduojama tai daryti, kai kultivuojamos neigiamos kontrolinės kultūros, terpėje esant vien tik tirpiklio. Jeigu remiantis anksčiau atliktų eksperimentų aprašymais galima parodyti, kad tarp kartotinio pasėjimo kultūrų egzistuoja minimalūs skirtumai (13), (14), tada pavienes kultūras bus galima tirti, terpėje esant skirtingoms bandomosios cheminės medžiagos koncentracijoms.

Dujinės ir lakiosios medžiagos tiriamos atitinkamais metodais, tokiais kaip kultivavimas užsandarintuose induose 15, 16.

1.4.3.3. *Kultūrų surinkimo laikas*

Atliekant pirmąjį eksperimentą, ląstelės, esant metabolinės aktyvacijos sistemai arba jai nesant bandomąja chemine medžiaga veikiamos 3–6 valandas ir yra surenkamos praėjus maždaug kas 1,5 normalaus ląstelinio ciklo nuo poveikio pradžios (12). Jeigu eksperimentas atliekamas pagal šį protokolą, esant metabolinės aktyvacijos sistemai arba jai nesant ir gaunami neigiami rezultatai, tai reikia atlikti papildomą poveikio bandomąja medžiaga eksperimentą, nesant metabolinės aktyvacijos sistemos ir ląstelės surenkamos, praėjus laiko tarpui, maždaug lygiam 1,5 ląstelinio ciklo trukmės. Kai kurios cheminės medžiagos yra lengviau nustatomos, jei bandomąja medžiaga veikiama ilgiau, o mėginiai paimami tada, kai praeina daugiau nei 1,5 ląstelinio ciklo. Neigiami duomenys, gauti tuo metu, kai buvo naudojama metabolinė aktyvacija, turi būti patvirtinami kiekvienu atveju. Jei manoma, kad nereikia patvirtinti neigiamų rezultatų, tai privalo būti pagrįsta.

▼C1

1.4.3.4. *Chromosomų paruošimas*

Paprastai likus 1–3 valandoms iki surinkimo ląstelių kultūros yra paveikiamos Kolcemidu® arba kolchicinu. Kiekviena ląstelių kultūra surenkama ir atskirai apdorojama tam, kad chromosomos būtų paruoštos. Ruošiant chromosomas, ląstelės paveikiamos hipotoniniu šoku, fiksuojamos ir dažomos.

1.4.3.5. *Analizė*

Prieš pradedant mikroskopinę analizę, visi objektiniai stikleliai, įskaitant teigiamus ir neigiamus kontrolinius mėginius, yra atskirai koduojami. Kadangi fiksavimo metu metafazėje esančios ląstelės dažnai suyra bei prarandamos chromosomos, tai suskaičiuotos ląstelės turės centromeras, kurių skaičius bus lygus visų tipų ląstelių modaliniam skaičiui ≠2. Jei tiriant kartotinio pasėjimo kultūras, galima naudotis ta pačia kontrole, tai nustatytas centromerų skaičius bus lygus 200 gerai matomų metafazių. Centromerų skaičius gali sumažėti, kai stebima daug aberacijų.

Nors šio bandymo tikslas yra nustatyti chromosomų struktūrines aberacijas, svarbu poliploidiją bei endoduplikaciją registruoti tada, kai tai yra matoma.

2. **DUOMENYS**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Ląstelė yra eksperimentinis vienetas, todėl nustatomas ląstelių, turinčių struktūrines aberacijas, išreiškiamas procentais. Reikia išvardinti chromosomų struktūrinių aberacijų skirtingus tipus, nurodant jų skaičių bei pasireiškimo dažnį bandomose ir kontrolinėse ląstelių kultūrose. Atskirai registruojami chromosomų plyšiai, tačiau į juos neatsižvelgiama nustatant absoliutų aberacijos dažnį.

Reikia taip pat registruoti tarpusavyje sutampančias priemones, kurios naudojamos citotoksiškumui vertinti visose paveiktose ir neigiamose kontrolinėse kultūrose, kai yra atliekami pagrindiniai eksperimentai, kurių metu nustatomos aberacijos.

Reikėtų pateikti ir pavienius duomenis. Be to, visus duomenis reikėtų pateikti apibendrintai, lentelių forma.

Nėra reikalaujama, kad aiškus teigiamas atsakas būtų patvirtinamas. Abejotini rezultatai išsiaiškinami atliekant toliau bandymą, pageidautina, pakeistomis eksperimento sąlygomis. Būtinybė patvirtinti, kad buvo gauti neigiami rezultatai buvo aptarta 1.4.3.3 skyriuje. Vėlesnių eksperimentų metu reikia apsvarstyti tiriamų parametrų pakeitimus, tam, kad ištirtų sąlygų spektras būtų praplėstas. Tiriamieji parametrai, kuriuos galima keisti – tai intervalai tarp koncentracijų ir metabolinės aktyvacijos sąlygos.

2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Egzistuoja keli kriterijai, tokie, kaip nuo koncentracijos priklausomas bei pakartojamas chromosomines aberacijas turinčių ląstelių skaičiaus padidėjimas, kuriuo remiantis, nustatoma ar gautas rezultatas yra teigiamas. Pirmiausia reikia aptarti gautų rezultatų biologinę reikšmę. Vertinant bandymo rezultatus, galima taikyti statistinius metodus (3), (13). Statistinis reikšmingumas neturėtų būti vienintelis faktorius, pagal kurį sprendžiama, ar gautas atsakas teigiamas ar neigiamas.

▼C1

Poliploidinių ląstelių skaičiaus padidėjimas gali rodyti, kad bandomoji medžiaga gali slopinti mitozę ir sukelti chromosomų skaičiaus ląstelėje pakitimus. Ląstelių, turinčių endoreduplikuotas chromosomas, skaičiaus padidėjimas gali parodyti, kad bandomoji medžiaga gali slopinti ląstelinį ciklą (17), (18).

Jei tiriant medžiagą, buvo gauti rezultatai, neatitinkantys aukščiau išvardintų kriterijų, tai šioje sistemoje medžiaga laikoma nemutageniška.

Nors atliekant daugelį eksperimentų, bus gauti aiškūs teigiami ir neigiami rezultatai, tačiau retais atvejais, remiantis gautų duomenų visuma, nebus galima padaryti konkrečios išvados apie bandomosios medžiagos aktyvumą. NET ir daug kartų pakartojus eksperimentą, rezultatai gali likti abejotini ar neaiškūs.

Tiriant chromosomų aberacijas *in vitro*, gauti teigiami rezultatai, gauti atlikus bandymą, rodo, kad bandomoji medžiaga sukelia chromosomų aberacijas kultivuotose somatinėse žinduolių ląstelėse. Neigiami rezultatai rodo, kad esant bandymo sąlygoms, bandomoji medžiaga nesukelia chromosomų aberacijų kultivuotose somatinėse žinduolių ląstelėse.

3. **ATASKAITA**

BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta tokia informacija:

Tirpiklis (nešiklis):

— priežastys, dėl kurių buvo pasirinktas nešiklis,

— bandomosios medžiagos tirpumas ir stabilumas tirpiklyje (nešiklyje), jei žinomas.

Ląstelės:

— ląstelių tipas ir šaltinis,

— panaudoto ląstelių tipo kariotipo ypatybės ir tinkamumas,

— ar ląstelės neužsikrėtusios mikoplazmomis, jei taikoma,

— informacija apie ląstelinio ciklo trukmę,

— kraujo donorų, iš kurių buvo gauti viso kraujo mėginiai ar iš kurių kraujo buvo išskirti limfocitai, lytis bei panaudotas mitogenas,

— ląstelių persėjimų skaičius, jei taikoma,

— ląstelių kultivavimo metodai, jei taikoma,

— modalinis chromosomų skaičius.

Bandymo sąlygos:

— metafazę sustabdančios cheminės medžiagos prigimtis, koncentracija bei laiko tarpas, kurį ši medžiaga veikė ląsteles,

— pagrindinė priežastis, dėl kurios buvo pasirinktos koncentracijos ir ląstelių kultūrų kultivavimo skaičius nurodant, jei įmanoma, citotoksiškumo tyrimo duomenis ir tirpumo ribas,

— terpės sudėtis ir CO_2 koncentracija, jei taikoma,

▼C1

— bandomosios medžiagos koncentracija,

— nešiklio tūris ir į jį įneštos bandomosios medžiagos tūris,

— inkubacijos temperatūra,

— inkubacijos laikas,

— veikimo bandomąja medžiaga trukmė,

— ląstelių tankis pasėjimo metu, jei taikoma,

— metabolinės aktyvacijos sistemos tipas ir sudėtis, įskaitant tinkamumo kriterijus,

— teigiami ir neigiami kontroliniai mėginiai,

— objektinių stiklelių paruošimo būdai,

— aberacijų vertinimo kriterijai,

— ištirtų metafazių skaičius,

— toksiškumo įvertinimo metodai,

— kriterijai, pagal kuriuos sprendžiama, ar bandymo metu gauti rezultatai teigiami, neigiami ar abejotini.

Rezultatai:

— toksiškumo požymiai, pvz., ląstelių kultūrų kolonijų susiliejimo laipsnis, ląstelinio ciklo duomenys, ląstelių skaičius, mitozinis indeksas,

— precipitacijos požymiai,

— duomenys apie terpės, kurioje buvo atliekamas veikimas, pH ir osmosinį slėgį, jei tai buvo nustatyta,

— aberacijų, įskaitant plyšius, apibūdinimas,

— ląstelių, esančių bandomąja medžiaga veiktose bei kontrolinėse kolonijose ir turinčių chromosomų aberacijas, skaičius bei chromosomų aberacijų tipas,

— ploidiškumo pokyčiai, jei pastebimi,

— dozės ir atsako tarpusavio ryšys, jei tai įmanoma,

— statistinės analizės, jei tokios buvo atliktos,

— vienu metu gauti neigiamų (tirpiklis/nešiklis) ir teigiamų kontrolinių mėginių tyrimų duomenys,

— ankstesnių bandymų duomenys apie neigiamus (tirpiklis/nešiklis) ir teigiamus kontrolinius mėginius, kartu nurodant jų intervalus, vidurkius ir standartinius nukrypimus.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

4. **NUORODOS**

1) 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, p. 1–29.

2) Ishidate, MJr. and Sofuni, T. (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, p. 427–432.

▼C1

3) Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C, Colman, S., Brown, B., Cannon, C, Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G.H., Resnick, MA, Anderson, G. and Zeiger, E. (1978). Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. Environs. Molec. Mutagen 10 (suppl.10), p. 1–175.

4) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, MJr., 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.

5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K., (1992). Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, p. 297–305.

6) 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.

7) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, p. 173–215.

8) Natarajan, A.T., Tates, A.D., van Buul, P.P.W., Meijers, M. and de Vogei, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System in Vitro, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, p. 83–90.

9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66, p. 277–290.

10) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G, Gibson, GG, Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, p. 175–177.

11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A SAFE Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds) *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, p. 85–88.

12) Galloway, S.M., Aardema, M.J., Ishidate, MJr., Ivett, J.L., Kirkland, D.J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994). Report from Working Group on in *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312, p. 241–261.

13) Richardson, C, Williams, D.A., Allen, J.A., Amphlett, G., Chanter, D.O. and Phillips, B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, p. 141–154.

14) Soper, K.A. and Galloway, S.M. (1994). replicate Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells. Mutation Res., 312, p. 139–149.

15) 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.

▼C1

16) 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.

17) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. Mutation Res., 119, p. 403–413.

18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells. Cancer Res., 43, p. 1362–1364.

▼C1

B.11. MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ KAULŲ ČIULPŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJOS BANDYMAS *IN VIVO*

1. METODAS

Šis metodas atitinka OECD TG 475 – Žinduolių kaulų čiulpų chromosomų aberacijos bandymą (1997).

1.1. ĮVADAS

Žinduolių chromosomų aberacijų bandymas *in vitro* naudojamas nustatyti struktūrinėms chromosomų aberacijoms, kurias bandomoji cheminė medžiaga sukelia žinduolių, paprastai graužikų, kaulų čiulpų ląstelėse (1) (2) (3) (4). Chromosomų struktūrinės aberacijos gali būti dviejų tipų – chromosominės arba chromatidinės. Poliploidiškumo reiškimosi intensyvumas rodo, kad cheminė medžiaga gali sukelti chromosomų skaičiaus pasikeitimus. Dauguma cheminių mutagenų sukelia chromatidines aberacijas, tačiau pasitaiko ir chromosominių aberacijų. Daugelio žmonių genetiškai paveldimų ligų priežastis yra chromosomų mutacijos bei su jomis susiję įvykiai; esama pakankamai įrodymų, kad žmonių ir eksperimentinių gyvūnų vėžį sukelia somatinėse ląstelėse esančių onkogenų bei navikų supresorinių genų struktūriniai pokyčiai, atsiradę dėl chromosomų mutacijų bei su jomis susijusių įvykių.

Šiam bandymui paprastai naudojamas graužikų stuburo skliautas. Pagrindinis bandomasis audinys yra kaulų čiulpai, kadangi jie yra išvagoti daugybės kraujagyslių, o be to, kaulų čiulpuose yra daug greitai besidauginančių ląstelių, kurios yra lengvai išskiriamos ir apdorojamos. Šio bandymo metu nėra bandomi kitų rūšių žinduoliai bei jų audiniai.

Šis chromosomų aberacijos bandymas ypač svarbus, kai įvertinama mutagenų daroma žala, nes šio bandymo metu galima ištirti metabolizmo, farmakokinetikos ir DNR pažaidų reparacinių procesų veiksnius *in vivo*, nors jie gali varijuoti tarp skirtingų žinduolių rūšių ir skirtingų audinių. Bandymas *in vivo* naudingas ir tuo, kad vėliau galima ištirti mutageninį poveikį, nustatytą *in vitro*.

Jeigu yra duomenų, kad bandomoji cheminė medžiaga arba reaktyvus metabolitas neįsiskverbia į tikslinį audinį, šis bandymas netinka.

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

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.

Endoreduplikacija – procesas, kurio metu pasibaigus DNR replikacijos S (sintezės) periodui, branduolys nepradeda dalytis mitozės būdu, bet prasideda naujas S (sintezės) periodas. Šitaip atsiranda chromosomos, turinčios 4, 8, 16 ir t. t. chromatidžių.

Plyšys – achromatinė, mažesnė nei vienos chromatidės plotis spraga, kurioje yra mažiausias skaičius klaidingai suporuotų bazių.

Mitozinis indeksas – mitozės metafazėje esančių ląstelių santykis, padalintas iš viso ląstelių populiacijos skaičiaus, rodantis tos ląstelių populiacijos proliferacijos laipsnį.

Chromosomų skaičiaus aberacija – ląstelėse esančių chromosomų skaičiaus pokytis, palyginus su normaliu naudojamų ląstelių skaičiumi.

▼C1

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 tinkamu poveikio būdu, o po šio veikimo praėjus tinkamam laikotarpiui, numarinami. Prieš numarinimą gyvūnai paveikiami medžiaga, sustabdančia ląstelių dalijimąsi metafazėje (pvz., Kolcemidu® arba kolchicinu). Po to iš kaulų čiulpų ląstelių išskiriamos chromosomos, jos dažomos, ir metafazėje esančios ląstelės tiriamos mikroskopu, kad būtų nustatytos chromosomų aberacijos.

1.4. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.4.1. **Preparatai**

1.4.1.1. *Gyvūnų rūšies pasirinkimas*

Paprastai naudojamos žiurkės, pelės ir kiniški žiurkėnai, tačiau gali būti panaudotos ir kitos atitinkamos žinduolių rūšys. Reikia naudoti įprastas jaunų sveikų suaugusių gyvūnų laboratorines linijas. Bandymo pradžioje gyvūnų svorio skirtumai turi būti kuo mažesni; jų svoris turi būti ne didesnis kaip ± 20 % atitinkamos lyties gyvūnų vidutinis svoris.

1.4.1.2. *Laikymo ir maitinimo 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 atsitiktinės atrankos būdu suskirstomi į kontrolinę bei bandomąją (kuriai priskirti individai bus veikiami medžiaga) grupes. Narvai pastatomi taip, kad būtų kuo labiau sumažintas aplinkos poveikis, susijęs su narvų išdėstymu. Kiekvienas gyvūnas paženklinamas. Gyvūnams ne mažiau kaip 5 dienas leidžiama prisitaikyti prie laboratorinių sąlygų.

1.4.1.4. *Dozių paruošimas*

Kietosios bandomosios medžiagos turėtų būti ištirpinamos arba suspenduojamos atitinkamuose tirpikliuose arba nešikliuose, o jeigu reikia, tai prieš paveikiant gyvūnus šia medžiaga, ir praskiestos. Skystosios bandomosios medžiagos į bandomąją sistemą įnešamos tiesiogiai arba prieš bandymą praskiedžiamos. Turėtų būti naudojami naujai paruošti bandomosios medžiagos preparatai, jeigu šių medžiagų stabilumo tyrimo duomenys nerodo, kad juos galima saugoti.

1.4.2. **Bandymo sąlygos**

1.4.2.1. *Tirpiklis (nešiklis)*

Tirpiklis (nešiklis) neturėtų chemiškai reaguoti su bandomąja chemine medžiaga ir turėtų būti užtikrinta, kad ląstelės liks išsaugotos bei bus išlaikytas S9 aktyvumas. Jeigu naudojami gerai nežinomi tirpikliai (nešikliai), reikia pateikti jų tinkamumą įrodančius duomenis. Jei įmanoma, tai pirmiausia rekomenduojama naudoti vandeninį tirpiklį arba nešiklį.

▼C1

1.4.2.2. *Kontroliniai mėginiai*

Kiekvieno bandymo metu turi būti tiriami iš kiekvienai lyčiai priklausančių gyvūnų paimti bei tuo pačiu metu naudojami teigiami ir neigiami (tirpiklis/nešiklis) kontroliniai mėginiai. Kontrolinės grupės gyvūnai turi būti laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip ir bandomieji gyvūnai, išskyrus tai, kad jie neveikiami bandomąja medžiaga.

Teigiamuose kontroliniuose mėginiuose, paveiktuose tokia pačia bandomosios cheminės medžiagos doze *in vivo*, turi būti aptinkamos struktūrinės aberacijos, kurioms esant, bei veikiant bandomąja medžiaga, būtų galima nesunkiai sumažinti pašalinį foną pakartotinai, o tai parodo bandomosios sistemos jautrumą. Pasirenkamos tokios teigiamos kontrolinės dozės, kad gaunami poveikiai būtų ryškūs, bet tyrėjas ne iš karto atpažintų užkoduotus objektinius stiklelius. Priimtina, kad teigiami kontroliniai mėginiai būtų suleisti gyvūnams tokiu būdu, kuris skiriasi nuo bandomosios cheminės medžiagos suleidimo būdo bei būtų tik vienąkart dozuojami. Jeigu yra įmanoma, tai galima apsvarstyti teigiamų kontrolinių medžiagų, priklausančių cheminių medžiagų klase, panaudojimą. Toliau pateikiami teigiamų kontrolinių cheminių medžiagų pavyzdžiai:

Medžiaga	CAS Nr.	Einecs Nr.
etilo metansulfonatas	62–50–0	200–536–7
etilo nitrošlapalas	759–73–9	212–072–2
mitomicinas C	50–07–7	200–008–6
ciklofosfamidas ciklofosfamido monohidratas	50–18–0 6055–19–2	200–015–4
trietilenmelaminas	51–18–3	200–083–5

Neigiami kontroliniai mėginiai, paveikti arba vien tirpikliu arba vien tik nešikliu arba kiti mėginiai paveikti tuo pačiu būdu kaip ir bandomosios grupės, turi būti paimami kiekvieną kartą nekreipiant dėmesio į anksčiau atliktų bandymų metu gautus kontrolinius duomenis, rodančius, kad variacijos laipsnis tarp gyvūnų ir ląstelių, kuriose stebimos chromosomų aberacijos, yra tinkamas. Jei neigiami kontroliniai mėginiai paimami tik vieną kartą, tai pirmojo paėmimo laikas yra tinkamiausias. Taipogi reikia papildomai naudoti ir nepaveiktus kontrolinius mėginius, nekreipiant dėmesio į tai, kad anksčiau atliktų eksperimentų aprašuose nurodyta, jog pasirinktas tirpiklis ar nešiklis nesukėlė jokio žalingo ar mutageninio poveikio.

1.5. BANDYMO EIGA

1.5.1. **Gyvūnų skaičius ir lytis**

Kiekvienoje bandomojoje ir kontrolinėje grupėje turi būti ne mažiau kaip po 5 kiekvienos lyties 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. 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**

Gyvūnas bandomąja chemine medžiaga turėtų būti paveikiamas per vieną kartą. Tačiau galima veikti taikant vadinamąją išskaidytą dozę, tai yra medžiaga suduodama per du kartus tą pačią dieną, padarius ne daugiau kaip keleto valandų pertrauką tam, kad būtų galima suduoti pakankamai didelį bandomosios medžiagos kiekį. Kita dozavimo tvarka turi būti moksliškai pagrindžiama.

▼C1

Jei gyvūnas bandomąja medžiaga buvo paveiktas per vieną dieną, mėginiai imami du kartus. Tiriant graužikus, pirmasis mėginys paimamas praėjus maždaug 1,5 ląstelinio ciklo (šis normaliai trunka 12–18 valandų) po veikimo. Kadangi bandomosios medžiagos įsiskverbimas bei metabolizmas ir jos įtaka ląsteliniam ciklui gali paveikti optimalų laiką per kurį nustatomos chromosomų aberacijos, tai rekomenduojama, kad antrasis mėginys būtų paimamas praėjus 24 valandoms po veikimo. Jei dozės duodamos daugiau nei vieną dieną, mėginys paimamas vieną kartą, praėjus 1,5 ląstelinio ciklo trukmės po paskutinio paveikimo bandomąja medžiaga.

Prieš numarinant, gyvūnams suleidžiama intraperitoninė injekcija su atitinkama doze metafazę sustabdančios veikliosios medžiagos (pvz., Kolcemido® ar kolchicino). Po atitinkamo intervalo iš gyvūnų paimami mėginiai. Pelėms tas intervalas yra maždaug 3–5 valandos, kiniškiems žiurkėnams – 4–5 valandos. Iš kaulų čiulpų išskiriamos ląstelės ir analizuojamos, siekiant nustatyti chromosomų aberacijas.

1.5.3. **Dozių dydis**

Jeigu bandymas atliekamas siekiant surasti intervalą, nes nėra apie tai duomenų, tai jis turi būti atliekamas to pačioje laboratorijoje, naudojant tos pačios rūšies, linijos ir lyties gyvūnus bei veikiant juos bandomąja chemine medžiaga pagal tą patį tvarkaraštį, kuris bus naudojamas pagrindinio bandymo metu (5). Jeigu nustatomas toksiškumas, tai pirmam mėginių ėmimui naudojamos trijų dydžių dozės. Šie dozių dydžiai 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 laikoma tokia dozė, kuria paveikus gyvūną pasireiškia toksiškumo požymiai ir jei pagal tą pačią seką būtų duota dar didesnė dozė, spėjama, kad ji būtų mirtina. Cheminės medžiagos, kurios pasižymi specifiniu biologiniu aktyvumu, kai jų dozės būna mažos ir netoksiškos (pavyzdžiui tokios kaip hormonai ir mitogenai) gali būti laikomos išimtimi ir jų dozės nustatomos kiekvienu atveju atskirai. Didžiausia doze taip pat galima laikyti tokią dozę, kuria paveikus gyvūną, kaulų čiulpuose pasireiškia kai kurie toksiškumo požymiai (pavyzdžiui, mitozinis indeksas sumažėja daugiau nei 50 %).

1.5.4. **Ribinis bandymas**

Jeigu paveikus gyvūną bent 2 000 mg/kg kūno masės doze per vieną kartą arba du kartus per vieną dieną nepastebima jokio toksiškumo požymių ir jei, remiantis struktūriškai panašių cheminių medžiagų tyrimų duomenimis, nemanoma, kad ji yra genotoksiška, laikoma, kad viso bandymo su trijų dydžių dozėmis atlikti nereikia. Atliekant ilgiau trunkančius bandymus ir bandomąja medžiaga veikiant iki 14 dienų, ribinė dozė turi siekti 2 000 mg/kg kūno masės/dieną, o tuo atveju kai bandomąja medžiaga veikiama ilgiau nei 14 dienų – 1 000 mg/kg kūno masės/dieną. Atsižvelgiant į numatomą žmogaus sąlytį su bandomąja medžiaga, gali reikėti išbandyti didesnes dozes.

1.5.5. **Dozių davimas**

Bandomoji medžiaga paprastai yra suduodama per vamzdelį, įvestą į skrandį, inkubacine kaniule arba suleidžiant intraperitoninę injekciją. Bandomąją medžiagą galima įterpti ir kitais būdais, jei jie yra pagrindžiami. Maksimalus skysčio, priverstinai duodamo per vamzdelį arba įšvirkščiamo į pilvą vienu metu, tūris priklauso nuo bandomojo gyvūno dydžio. Tūris neturi viršyti 2 ml/100 g kūno masės. Didesnio nei šis tūrio 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.

▼C1

1.5.6. **Chromosomų paruošimas**

Kai tik gyvūnai numarinami, iš jų iškart išimami kaulų čiulpai, pamerkiami į hipotoninį tirpalą ir fiksuojami. Vėliau kaulų čiulpų ląstelės paskleidžiamos ant objektinių stiklelių ir nudažomos.

1.5.7. **Analizė**

Mitozinis indeksas nustatomas įvertinant citotoksiškumą mažiausiai 1 000 ląstelių, gautų iš 1 gyvūno ir tai atliekama, ištiriant visus bandomąja medžiaga veiktus (įskaitant teigiamus kontrolinius) ir neveiktus (neigiamus kontrolinius) gyvūnus.

Išanalizuojama mažiausiai 100 ląstelių, gautų iš 1 gyvūno. Šis skaičius gali būti sumažinamas, jei stebima daug chromosomų aberacijų. Visi objektiniai stikleliai (įskaitant teigiamų ir neigiamų kontrolinių mėginių objektinius stiklelius) turi būti užkoduojami nepriklausomai vienas nuo kito tam, kad juos būtų galima ištirti mikroskopu. Kadangi ruošiant objektinius stiklelius, dažnai suardoma metafazėje esančios ląstelės bei prarandamos chromosomos, tai vėliau suskaičiuotos ląstelės turi turėti tokį centromerų skaičių, kuris būtų lygus $2n \pm 2$.

2. **DUOMENYS**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Kiekvieno gyvūno bandymų rezultatai turi būti pateikiami lentelėse. Gyvūnas yra eksperimentinis vienetas. Reikia nustatyti kiekvieno gyvūno ląstelių, chromosomų aberacijų vienoje ląstelėje skaičius bei ląstelių, turinčių chromosomas su struktūrinėmis aberacijomis, skaičių, išreiškiamą procentais. Reikia išvardinti skirtingus chromosomų struktūrinių aberacijų tipus, nurodant jų skaičių bei pasireiškimo dažnį gyvūnų, paveiktų ir nepaveiktų bandomąja chemine medžiaga, grupėse. Atskirai registruojami plyšiai, tačiau į juos neatsižvelgiama, nustatant absoliutų aberacijos dažnį. Jeigu tarp atskirų lyčių nenustatoma jokių skirtumų pagal atsaką, tai abiejų lyčių bandymo duomenys sujungiami tam, kad būtų galima atlikti statistinę analizę.

2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Egzistuoja keli kriterijai, tokie, kaip nuo koncentracijos priklausomas bei pakartojamas chromosomines aberacijas turinčių ląstelių skaičiaus padidėjimas, kuriuo remiantis, nustatoma ar gautas rezultatas yra teigiamas. Pirmiausia reikia aptarti gautų rezultatų biologinę reikšmę. Vertinant bandymo rezultatus, galima taikyti statistinius metodus (6). Statistinis reikšmingumas neturėtų būti vienintelis faktorius, pagal kurį sprendžiama, ar gautas atsakas teigiamas ar neigiamas. Abejotini rezultatai turėtų būti išsiaiškinti tolesniais bandymais ir pirmiausia pakeičiant eksperimento sąlygas.

Poliploidinių ląstelių skaičiaus padidėjimas gali rodyti, kad bandomoji medžiaga gali slopinti mitozę ir sukelti chromosomų skaičiaus ląstelėje pakitimus. Ląstelių, turinčių endoreduplikuotas chromosomas, skaičiaus padidėjimas gali parodyti, kad bandomoji medžiaga gali slopinti ląstelinį ciklą (7), (8).

Jei tiriant medžiagą buvo gauti rezultatai, neatitinkantys aukščiau išvardytų kriterijų, tai šioje sistemoje medžiaga laikoma nemutageniška.

▼C1

Nors atliekant daugelį eksperimentų, bus gauti aiškūs teigiami ir neigiami rezultatai, tačiau retais atvejais, remiantis gautų duomenų visuma, nebus galima padaryti konkrečios išvados apie bandomosios medžiagos aktyvumą. NET ir daug kartų pakartojus eksperimentą rezultatai gali likti abejotini ar neaiškūs.

Tiriant chromosomų aberacijas *in vitro*, teigiami rezultatai, gauti atlikus bandymą, rodo, kad bandomoji medžiaga sukelia chromosomų aberacijas tirtos gyvūnų rūšies kaulų čiulpų ląstelėse. Neigiami rezultatai rodo, kad 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 apytaką ar tik tikslinį audinį (pvz., sisteminio toksiškumo atveju).

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikiama tokia informacija:

Tirpiklis (nešiklis):

— priežastys, dėl kurių buvo pasirinktas 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 intervalas, vidurkiai bei standartinis nukrypimas.

Bandymo sąlygos:

— teigiami ir neigiami (tirpiklis/nešiklis) kontroliniai mėginiai,

— intervalo nustatymo bandymo, jei jis buvo vykdomas, duomenys,

— dozių dydžio pasirinkimo priežastys,

— bandomosios medžiagos paruošimo apibūdinimas,

— bandomosios medžiagos davimo apibūdinimas,

— priežastys, nulėmusios davimo būdo pasirinkimą,

— metodai, kuriais patvirtinama, kad bandomoji cheminė medžiaga pateko į bendrąją apytaką ar į tikslinį audinį, jei taikoma,

— bandomosios cheminės medžiagos, esančios pašaruose ir geriamajame vandenyje, koncentracijos (pm) pervertimas į tikrąją dozę (mg/kg kūno masės/dienai), jei taikoma,

— duomenys apie pašarų ir geriamojo vandens kokybę,

— išsami informacija apie veikimą bandomąja medžiaga ir mėginio paėmimo tvarkaraštį,

— toksiškumo įvertinimo metodai,

▼C1

— metafazę sustabdančios medžiagos prigimtis, jos koncentracija bei veikimo ja trukmė,

— objektinių stiklelių paruošimo būdai,

— 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,

— kiekvieno gyvūno ląstelėse esančių aberacijų tipas ir skaičius,

— absoliutus aberacijų vieno grupės gyvūnų ląstelėse skaičius, kartu nurodant vidurkius ir standartinius nukrypimus,

— ląstelių su aberacijomis skaičius, kartu nurodant vidurkius ir standartinius nukrypimus,

— ploidiškumo pasikeitimai, jei buvo tokie pastebėti,

— dozės ir atsako tarpusavio ryšys, jei tai įmanoma nurodyti,

— statistinės analizės, jei tokios buvo atliktos,

— vienu metu gauti neigiami kontroliniai duomenys,

— anksčiau gauti neigiami kontroliniai duomenys, kartu pateikiant jų intervalus, vidurkius ir standartinius nukrypimus,

— vienu metu gauti teigiami kontroliniai duomenys.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

4. **NUORODOS**

1) Adler, ID. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. S. Venitt and J.M. Parry (Eds). IRL Press, Oxford, Washington D.C., p. 275–306.

2) Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, h., McFee, A.F. and Shelby, M. (1987). Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. Mutation Res., 189, p. 157–165.

3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D.G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, p. 115–141.

4) Tice, R.R., Hayashi, M., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Holden, h.E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F.B., Pacchierotti, F., Preston, R.J., Romagna, F., Shimada, h., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). Report from the Working Group on the *in Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. Mutation Res., 312, p. 305–312.

5) 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.

▼C1

6) 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: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. D.J. Kirkland, (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge. p. 184–232.

7) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. Mutation Res. 119, p. 403–413.

8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells. Cancer Res., 43, p. 1362–1364.

▼C1

B.12. MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ ERITROCITŲ MAŽŲJŲ BRANDUOLIŲ BANDYMAS IN VIVO

1. METODAS

Šis metodas atitinka OECD TG 474 – Žinduolių eritrocitų mažųjų branduolių bandymą (1997).

1.1. ĮVADAS

Žinduolių mažųjų branduolių bandymas *in vivo* atliekamas, kad analizuojant gyvūnų, paprastai graužikų, kaulų čiulpų eritrocitus ir (arba) periferinio kraujo ląsteles būtų galima nustatyti bandomosios cheminės medžiagos sukeltus eritroblastų chromosomų arba mitozinio aparato pažeidimus.

Mažųjų branduolių bandymo tikslas – nustatyti chemines medžiagas, sukeliančias citogenetinius pažeidimus, dėl kurių susiformuoja mažieji branduoliai, kuriuose yra atsilikusių chromosomų fragmentai ar ištisos chromosomos.

Kai kaulų čiulpų eritroblastas vystydamasis virsta polichromatiniu eritrocitu, pagrindinis (didysis) branduolys yra suspaudžiamas ir bet kuris susiformavęs mažasis branduolys gali likti už citoplazmos, neturinčios branduolio, ribų. Šiose ląstelėse galima pamatyti mažuosius branduolius, nes ląstelė yra praradusi savo pagrindinį branduolį. Jei gyvūnus, paveikus bandomąja chemine medžiaga padaugėja polichromatinių eritrocitų, turinčių mažuosius branduolius, tai rodo, kad chromosomos buvo pažeistos.

Atliekant šį bandymą paprastai naudojami graužikų kaulų čiulpai, nes būtent šiame audinyje susiformuoja polichromatiniai eritrocitai. Periferinio kraujo polichromatinių (nesubrendusių, turinčių mažuosius branduolius) eritrocitų bandymą galima atlikti su bet kurios rūšies gyvūnais, jei įrodyta, kad tos rūšies gyvūnų blužnis nesugeba pašalinti eritrocitų, turinčių mažuosius branduolius, arba kuri yra pakankamai jautri, kad būtų galima nustatyti medžiagas, sukeliančias struktūrines chromosomų aberacijas ar chromosomų skaičiaus aberacijas. Mažuosius branduolius galima atskirti pagal daugelį kriterijų. Vienas jų – nustatyti, ar mažuosiuose branduoliuose yra kinetochorai arba centromerinė DNR. Bandymo tikslas taip pat gali būti nustatyti, kiek periferiniame kraujyje yra subrendusių (normochromatinių) eritrocitų, turinčių mažuosius branduolius, palyginti su subrendusių eritrocitų skaičiumi, kai gyvūnai veikiami bandomąja chemine medžiaga keturias ar daugiau savaičių.

Šis žinduolių mažųjų branduolių bandymas *in vivo* yra ypač svarbus mutagenų pavojui įvertinti, nes pagal jį galima atsižvelgti į tokius veiksnius kaip *in vivo* metabolizmas, farmakokinetika bei DNR pažaidų reparacija, nors jie gali skirtis priklausomai nuo gyvūnų rūšies, audinio ir bandomo genetinio poveikio. Bandymas *in vivo* taip pat naudingas toliau tiriant mutageninį poveikį, nustatytą *in vitro*.

Jeigu turima duomenų, kad bandomoji medžiaga ar reaktyvusis metabolitas neįsiskverbs į tikslinį audinį, šis bandymas yra netinkamas.

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼C1

1.2. APIBRĖŽTYS

Centromera (kinetochoras) – chromosomos regionas, su kuriuo ląstelės dalijimosi metu asocijuojasi verpstės siūlai ir dėl to dukterinės chromosomos tvarkingai juda link dukterinių ląstelių polių.

Mažieji branduoliai – maži papildomi ir nuo pagrindinio ląstelės branduolio atskirti branduoliai, susidarantys mitozės telofazės metu iš atsilikusių chromosomų fragmentų ar ištisų chromosomų.

Normochromatinis eritrocitas – subrendęs, neturintis ribosomų eritrocitas, kurį nuo nesubrendusio polichromatinio eritrocito galima atskirti nudažius ribosomas nudažančiais dažais.

Polichromatinis eritrocitas – nesubrendęs, tarpinėje vystymosi stadijoje esantis eritrocitas, kuris vis dar tebeturi ribosomas ir gali būti atskirtas nuo subrendusio normochromatinio eritrocito nudažius ribosomas nudažančiais dažais.

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Gyvūnai veikiami bandomąja medžiaga tinkamu veikimo būdu. Jei bandymui naudojami kaulų čiulpai, gyvūnai numarinami praėjus atitinkamiems laiko tarpams po veikimo bandomąja medžiaga, iš jų išimami kaulų čiulpai, paruošiami ir nudažomi jų preparatai (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7). Jei naudojamas periferinis kraujas, jis paimamas po veikimo bandomąja medžiaga praėjus atitinkamiems laiko tarpams, paruošiami ir nudažomi jo tepinėliai (4)(8)(9)(10). Tiriant periferinį kraują, kaip galima mažiau laiko turi praeiti tarp paskutinio veikimo ir ląstelių surinkimo. Preparatai analizuojami, siekiant nustatyti, ar yra mažųjų branduolių.

1.4. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

1.4.1. **Preparatai**

1.4.1.1. *Gyvūnų rūšies pasirinkimas*

Jei naudojami kaulų čiulpai, rekomenduojama pasirinkti peles ar žiurkes, nors galima pasirinkti ir bet kokias kitas žinduolių rūšis. Jei naudojamas periferinis kraujas, rekomenduojama pasirinkti peles. Tačiau galima naudoti bet kokias kitas žinduolių rūšis, jeigu žinoma, kad tos rūšies žinduolio blužnis nesugeba pašalinti eritrocitų, turinčių mažuosius branduolius arba tos rūšies žinduolis pakankamai jautrus, kad būtų galima nustatyti medžiagas, sukeliančias struktūrines chromosomų aberacijas arba chromosomų skaičiaus aberacijas. Turėtų būti naudojami įprastinių laboratorinių veislių jauni ir sveiki gyvūnai. Bandymo pradžioje gyvūnų svorio skirtumai turi būti kuo mažesni; jų svoris turi būti ne didesnis kaip ± 20 % atitinkamos lyties gyvūnų vidutinis svoris.

1.4.1.2. *Laikymo ir šėrimo sąlygos*

Taikomos Bendrojo įvado B dalyje nurodytos sąlygos, nors stengiamasi, kad drėgmė siektų 50–60 %.

▼C1

1.4.1.3. *Gyvūnų paruošimas*

Sveiki jauni subrendę gyvūnai atsitiktinės atrankos būdu suskirstomi į kontrolinę bei bandomąją grupes. Gyvūnams leidžiama aklimatizuotis prie laboratorinių sąlygų mažiausiai 5 dienas. Narvai pastatomi taip, kad būtų kuo labiau sumažintas poveikis, susijęs su narvų išdėstymu.

1.4.1.4. *Dozių paruošimas*

Kietosios bandomosios cheminės medžiagos ištirpinamos arba suspenduojamos atitinkamuose tirpikliuose ar nešikliuose ir, jei reikia, praskiedžiamos prieš duodant jas gyvūnams. Skystųjų bandomųjų medžiagų dozės gali būti ruošiamos iškart arba prieš tai praskiedžiamos. Prieš kiekvieną bandymą bandomosios cheminės medžiagos preparatai turėtų būti paruošiami šviežiai, nebent duomenys apie medžiagą stabilumą rodo, kad ją galima laikyti.

1.4.2. **Bandymo sąlygos**

1.4.2.1. *Tirpiklis arba nešiklis*

Tirpiklis arba nešiklis, naudojamas tokiu kiekiu, kokio reikia dozėms paruošti, turėtų nesukelti jokio toksinio poveikio, ir neturėtų chemiškai reaguoti su bandomąja medžiaga. Gerai nežinomi tirpikliai arba nešikliai gali būti naudojami tik turint jų tinkamumą įrodančių duomenų. Jei įmanoma, pirmiausia rekomenduojama naudoti vandeninį tirpiklį arba nešiklį.

1.4.2.2. *Kontroliniai gyvūnai*

Atliekant kiekvieną bandymą kartu naudojami kiekvienos lyties gyvūnų teigiami ir neigiami (tirpiklis/nešiklis) kontroliniai mėginiai. Kontrolinės grupės gyvūnai laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip ir bandomosios grupės gyvūnai, išskyrus tai, kad bandomąja medžiaga jie neveikiami.

Teigiamuose kontroliniuose mėginiuose *in vivo* sąlygomis turi susidaryti mažieji branduoliai, esant tokiam veikimui, kuris kaip tikimasi, užgoš pašalinį foną. Pasirenkamos tokios teigiamos kontrolinės grupės dozės, kad būtų gaunamas aiškus poveikis, bet kad tyrėjas ne iškart atpažintų užkoduotus objektinius stiklelius. Priimtina, kad teigiamai kontrolinei grupei bandomoji cheminė medžiaga būtų duodama kitu būdu negu bandomajai grupei, ir mėginius galima paimti tik vieną kartą. Be to, jei įmanoma, kontroliniam teigiamam mėginiui gauti galima rinktis kitą tos pačios cheminių medžiagų klasės medžiagą. Žemiau pateikiami medžiagų, tinkamų teigiamiems kontroliniams mėginiams gauti, pavyzdžiai:

Medžiaga	CAS Nr.	Einecs Nr.
etilo metansulfonatas	62–50–0	200–536–7
N-etil-N-nitrošlapalas	759–73–9	212–072–2
mitomicinas C	50–07–7	200–008–6
ciklofosfamidas ciklofosfamido monohidratas	50–18–0 6055–19–2	200–015–4
trietilenmelaminas	51–18–3	200–083–5

▼C1

Kiekvieną kartą, kai imami mėginiai, iš kontrolinių gyvūnų, paveiktų tik tirpikliu arba tik nešikliu, su kuriais buvo elgiamasi lygiai taip pat kaip su bandomaisiais gyvūnais, turi būti paimti neigiami kontroliniai mėginiai, nebent turima ankstesnių bandymų duomenų, rodančių priimtiną variacijos tarp gyvūnų laipsnį ir ląstelių, turinčių mažuosius branduolius, dažnį. Jei neigiami kontroliniai mėginiai imami tik vieną kartą, geriausia juos imti kartu su pirmuoju mėginių ėmimu. Be to, reikia papildomai panaudoti bandomąja medžiaga nepaveiktus kontrolinius mėginius, nebent yra anksčiau atliktų bandymų arba publikuotų duomenų, rodančių, kad pasirinktas tirpiklis ar nešiklis nesukelia jokio žalingo ar mutageninio poveikio.

Jei naudojamas periferinis kraujas, tai mėginys, naudojamas prieš veikimą bandomąja medžiaga, gali būti naudojamas kaip neigiama kontrolė, tačiau tik trumpai trunkančių periferinio kraujo tyrimų metu (pavyzdžiui, 1–3 kartus veikiant bandomąja medžiaga), kai gaunami duomenys atitinka pageidaujamą anksčiau naudotos kontrolės intervalą.

1.5. BANDYMO EIGA

1.5.1. **Gyvūnų skaičius ir lytis**

Kiekvienoje bandomojoje ir kontrolinėje grupėje turi būti mažiausiai po 5 analizei tinkamus kiekvienos lyties gyvūnus (11). 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. 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**

Nėra standartinio veikimo bandomąja chemine medžiaga tvarkaraščio (t. y. 1, 2 ar daugiau veikimų atliekami kas 24 valandos), kurį būtų galima rekomenduoti. Mėginių ėmimas esant prailgintam dozavimo režimui, yra priimtinas, jei įrodytas teigiamas poveikis, arba neigiamo tyrimo atveju, jei buvo nustatytas toksiškumas arba buvo panaudota ribinė dozė ir dozavimas buvo tęsiamas iki mėginio paėmimo. Jei reikia suduoti didelį bandomosios cheminės medžiagos tūrį, ji gali būti duodama per kelis kartus, t. y. per 1 dieną atliekami 2 veikimai bandomąja medžiaga ir abi procedūras skiria ne ilgesnis kaip kelių valandų laikotarpis.

Bandymas gali būti atliekamas 2 būdais:

a) gyvūnai paveikiami bandomąja chemine medžiaga vienąkart. Kaulų čiulpų mėginiai paimami mažiausiai 2 kartus, pirmą kartą ne anksčiau kaip praėjus 24 valandoms po veikimo bandomąja medžiaga, bet ne vėliau kaip praėjus 48 valandoms po veikimo tarp mėginių ėmimo paliekant atitinkamą laiko intervalą. Imti mėginius anksčiau nei praėjus 24 valandoms po veikimo galima tik pagrįstais atvejais. Periferinio kraujo mėginiai imami mažiausiai 2 kartus, pirmą kartą – ne anksčiau kaip praėjus 36 valandoms po veikimo, o vėliau po atitinkamo laiko intervalo, bet ne vėliau kaip po 72 valandų. Jei teigiamas atsakas gaunamas paėmus pirmąjį mėginį, kito mėginio imti nebūtina;

▼C1

b) jei per dieną atliekami du ir daugiau veikimų (pavyzdžiui, atliekami du ir daugiau veikimų kas 24 valandos), kaulų čiulpų mėginiai paimami vienąkart, praėjus 18–24 valandoms po paskutinio paveikimo bandomąja medžiaga, o periferinio kraujo mėginiai – praėjus 36–48 valandoms po paskutinio veikimo bandomąja medžiaga (12).

Mėginiai gali būti papildomai paimami ir kitu laiko metu, jei tai svarbu.

1.5.3. **Dozės dydis**

Jeigu atliekamas bandymas, siekiant surasti intervalą, nes apie jį nėra duomenų, jis turi būti atliekamas toje pačioje laboratorijoje, naudojant tos pačios rūšies, veislės ir lyties gyvūnus bei veikiant juos bandomąja chemine medžiaga pagal tą patį tvarkaraštį, kuris bus naudojamas pagrindinio bandymo metu (13). Jeigu nustatomas toksiškumas, tai pirmąkart imant mėginius naudojamos 3 dydžių dozės. Dozių dydžiai turi apimti visą intervalą, pradedant nuo didžiausio poveikio ir baigiant mažiausiu arba tokia doze, kuri visiškai nėra toksiška. Vėlesniam mėginių ėmimui naudojama tik pati didžiausia dozė. Didžiausia doze laikoma tokia dozė, kuria paveikus gyvūną pasireiškia toksiškumo požymiai ir jei pagal tą pačią seką būtų duota dar didesnė dozė, spėjama, kad ji būtų mirtina. Cheminės medžiagos, kurios pasižymi specifiniu biologiniu aktyvumu, kai jų dozės būna mažos ir netoksiškos (pavyzdžiui tokios kaip hormonai ir mitogenai) gali būti laikomos išimtimi ir jų dozės nustatomos kiekvienu atveju atskirai. Didžiausia doze taip pat galima laikyti tokią dozę, kuria paveikus gyvūną, kaulų čiulpuose pasireiškia kai kurie toksiškumo požymiai (pvz., nesubrendusių eritrocitų skaičius, lyginant su absoliučiu visų eritrocitų, esančių kaulų čiulpuose ir periferiniame kraujyje, skaičiumi, sumažėja).

1.5.4. **Ribinis bandymas**

Jeigu paveikus gyvūną bent 2 000 mg/kg kūno masės doze per vieną kartą arba du kartus per vieną dieną nepastebima jokio toksiškumo požymių ir jei, remiantis struktūriškai panašių cheminių medžiagų bandymų duomenimis, nemanoma, kad ji yra genotoksiška, laikoma, kad viso bandymo su trijų dydžių dozėmis atlikti nereikia. Atliekant ilgiau trunkančius bandymus ir bandomąja medžiaga veikiant iki 14 dienų, ribinė dozė turi siekti 2 000 mg/kg kūno masės/dieną, o tuo atveju, kai bandomąja medžiaga veikiama ilgiau nei 14 dienų – 1 000 mg/kg kūno masės/dieną. Atsižvelgiant į numatomą žmogaus sąlytį su bandomąja medžiaga, gali reikėti išbandyti didesnes dozes.

1.5.5. **Dozių davimas**

Bandomoji medžiaga paprastai yra suduodama per vamzdelį, įvestą į skrandį, inkubacine kaniule arba suleidžiant intraperitoninę injekciją. Bandomąją medžiagą galima įterpti ir kitais būdais, jei jie yra pagrindžiami. Maksimalus skysčio, priverstinai duodamo per vamzdelį arba įšvirkščiamo į pilvą vienu metu, tūris priklauso nuo bandomojo gyvūno dydžio. Tūris neturi viršyti 2 ml/100 g kūno masės. Didesnio nei šis tūrio 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.

▼C1

1.5.6. **Kaulų čiulpų/kraujo paruošimas**

Kaulų čiulpų ląstelės paprastai gaunamos iš ką tik numarintų gyvūnų šlaunikaulių ir blauzdikaulių. Bendru atveju iš šlaunikaulių ir blauzdikaulių išskiriamos ląstelės ir, panaudojant gerai žinomus metodus, paruošiami jų preparatai, kurie po to nudažomi. Periferinis kraujas imamas iš uodeginės venos ar kito atitinkamo kraujo indo. Iš kraujo išskirtos ląstelės arba iškart dažomos supravitaliniais dažais (8)(9)(10) arba paruošiami tepinėliai, kurie vėliau yra nudažomi. DNR atžvilgiu naudojami specifiniai dažai, tokie kaip akridino oranžinis 14 arba Hoechst 33258 dažas, turintis pironino-Y 15, gali pašalinti kai kuriuos artefaktus, kurie atsiranda, naudojant DNR atžvilgiu nespecifinius dažus. Tačiau tai, kad yra šis privalumas, nereiškia, kad negalima naudoti įprastinių dažų (pavyzdžiui, Giemsa dažo). Galima naudoti ir papildomas sistemas, tokias kaip celiulioze užpildytos chromatografinės kolonėlės, skirtas branduolius turinčioms ląstelėms pašalinti (16), jei įrodoma, kad naudojant šias sistemas galima tinkamai išskirti mažuosius branduolius laboratorinėmis sąlygomis.

1.5.7. **Analizė**

Nustatomas kiekvieno gyvūno nesubrendusių ir subrendusių eritrocitų santykis, suskaičiuojant mažiausiai 200 eritrocitų iš kaulų čiulpų ir 1 000 eritrocitų iš periferinio kraujo (17). Prieš pradedant mikroskopinę analizę, visi objektiniai stikleliai, įskaitant teigiamus ir neigiamus kontrolinius mėginius, užkoduojami nepriklausomai vienas nuo kito. Ištiriama bent 2 000 kiekvieno gyvūno eritrocitų ir suskaičiuojami nesubrendę, mažųjų branduolių turintys eritrocitai. Papildomos informacijos gali būti gaunama suskaičiuojant subrendusius eritrocitus, turinčius mažųjų branduolių. Analizuojant stiklelius, nesubrendusių ir subrendusių eritrocitų santykis turi būti ne mažesnis kaip 20 % kontrolinės vertės. Jei gyvūnai buvo veikiami bandomąja medžiaga mėnesį ir ilgiau, reikia suskaičiuoti mažiausiai 2 000 eritrocitų ir nustatyti, kiek iš jų turi mažuosius branduolius. Vietoj rankinio įvertinimo galima naudoti automatizuotas analizės sistemas (vaizdo analizės ir ląstelių suspensijos srauto tėkmės citometrinės analizės sistemas), jeigu jos atitinkamai yra patvirtintos ir pagrįstos.

2. **DUOMENYS**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Kiekvieno gyvūno bandymų rezultatai turi būti pateikiami lentelėse. Gyvūnas yra eksperimentinis vienetas. Turi būti nustatytas kiekvieno gyvūno nesubrendusių eritrocitų skaičius ir nesubrendusių eritrocitų, turinčių mažuosius branduolius, skaičius bei nesubrendusių ir subrendusių eritrocitų skaičiaus santykis. Jeigu gyvūnai be pertraukos veikiami bandomąja medžiaga mėnesį ar ilgiau, turi būti pateikti duomenys apie subrendusius eritrocitus, jei tokie duomenys buvo renkami. Jeigu įmanoma, tai kiekvieno gyvūno atveju pateikiamas nesubrendusių ir subrendusių eritrocitų skaičiaus santykis bei eritrocitų, turinčių mažuosius branduolius, skaičius, išreikštas procentais Jeigu nenustatoma jokių atsako skirtumų tarp atskirų lyčių, tai abiejų lyčių bandymo duomenys sujungiami statistinės analizės tikslais.

▼C1

2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Teigiamą rezultatą galima įvertinti keletu kriterijų, pavyzdžiui, nuo dozės dydžio priklausomas ląstelių, turinčių mažuosius branduolius, skaičiaus padidėjimas arba akivaizdus ląstelių, turinčių mažuosius branduolius, skaičiaus padidėjimas, gyvūnams gavus pavienę dozę ir paėmus vieną mėginį. Pirmiausia reikia apsvarstyti biologinę rezultatų reikšmę. Įvertinant bandymo metu gautus rezultatus, galima pasinaudoti statistiniais metodais (18)(19). Statistinis reikšmingumas turėtų būti ne vienintelis veiksnys, pagal kurį sprendžiama, ar atsakas teigiamas, ar ne. Abejotini rezultatai turėtų būti išaiškinti, toliau tęsiant bandymą ir pirmiausia pakeičiant bandymo sąlygas.

Jei bandant medžiagą gaunami rezultatai, neatitinkantys aukščiau išvardytų kriterijų, laikoma, kad pagal šį bandymą, tokia medžiaga yra nemutageniška.

Nors daugumos eksperimentų metu bus gaunami aiškūs teigiami ar neigiami rezultatai, išimtiniais atvejais gautų rezultatų rinkinys neleis padaryti išvados apie bandomosios medžiagos aktyvumą. Rezultatai gali likti abejotini ar neaiškūs, nepriklausomai nuo atliktų eksperimentų skaičiaus.

Mažųjų branduolių bandymo teigiami rezultatai rodo, kad bandomoji medžiaga sukelia mažųjų branduolių, kuriuos sąlygoja bandomosios rūšies gyvūnų eritroblastų chromosomų ar mitozinio aparato pažeidimai, pasireiškimą. Neigiami rezultatai rodo, kad bandomoji medžiaga nesukelia mažųjų branduolių atsiradimo bandomos rūšies gyvūnų nesubrendusiuose eritrocituose.

Turi būti aptarta, kokia yra tikimybė, kad bandomoji medžiaga arba jos metabolitai pateks į bendrąją apytaką ar konkretų tikslinį audinį (pavyzdžiui, somatinio toksiškumo atveju).

3. **ATASKAITA**

BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti pateikiama tokia informacija:

Tirpiklis/nešiklis:

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas,

— bandomosios cheminės medžiagos tirpumas ir stabilumas tirpiklyje/nešiklyje, jei žinomas.

Bandomieji gyvūnai:

— panaudota rūšis ar veislė,

— gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,

— šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir pan.,

— kiekvieno gyvūno svoris prieš pradedant bandymą ir kiekvienos grupės svorio intervalas, vidurkiai bei standartinis nuokrypis.

Bandymo sąlygos:

— teigiami ir neigiami (tirpiklis/nešiklis) kontroliniai mėginiai,

— ribų paieškos bandymo, jei jis buvo vykdomas, rezultatai,

▼C1

— dozių dydžių pasirinkimo priežastys,

— duomenys apie bandomosios medžiagos paruošimą,

— duomenys apie veikimą bandomąja medžiaga,

— pagrindinė priežastis, nulėmusi veikimo būdo pasirinkimą,

— metodai, kuriais patvirtinama, kad bandomoji cheminė medžiaga pateko į bendrąją apytaką ar tikslinį audinį, jei taikoma,

— bandomosios cheminės medžiagos, esančios pašaruose ir geriamajame vandenyje, koncentracijos (pm) pervertimas į tikrąją dozę (mg/kg kūno masės/dienai), jei taikoma,

— duomenys apie pašarų ir geriamojo vandens kokybę,

— išsamus veikimo bandomąja medžiaga ir mėginio paėmimo tvarkaraščio aprašymas,

— objektinių stiklelių paruošimo metodai,

— toksiškumo matavimo metodai,

— nesubrendusių eritrocitų, turinčių mažuosius branduolius, skaičiavimo kriterijai,

— iš vieno gyvūno išskirtų bei išanalizuotų ląstelių skaičius,

— teigiamų, neigiamų ar abejotinų rezultatų nustatymo kriterijai.

Rezultatai:

— toksiškumo požymiai,

— nesubrendusių ir subrendusių eritrocitų skaičiaus santykis,

— kiekvieno gyvūno nesubrendusių eritrocitų, turinčių mažuosius branduolius, skaičius,

— kiekvienos grupės nesubrendusių eritrocitų, turinčių mažuosius branduolius, skaičiaus vidurkis ir standartinis nuokrypis,

— dozės ir atsako tarpusavio ryšys, jei tai įmanoma nurodyti,

— statistinės analizės ir metodai, jei taikyta,

— lygiagrečiai gaunamų ir ankstesnių neigiamų kontrolinių mėginių duomenys,

— lygiagrečiai gaunamų teigiamų kontrolinių mėginių duomenys.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

4. **NUORODOS**

1) Heddle, J.A. (1973). A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, Mutation Res., 18, p. 187–190.

2) Schmid, W. (1975). The Micronucleus Test, Mutation Res., 31, p. 9–15.

3) Heddle, J.A., Salamone, M.F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.G. and Newell, G.W. (1983). The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. Mutation Res. 123, p. 61–118.

4) Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. and Heddle, J.A. (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 Res., 239, p. 29–80.

▼C1

5) MacGregor, J.T., Schlegel, R., Choy, W.N., and Wehr, CM. (1983). Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice in: „Developments in Science and Practice of Toxicology“, Ed. A.W. Hayes, R.C. Schnell and T.S. Miya, Elsevier, Amsterdam, p. 555–558.

6) MacGregor, J.T., Heddle, J.A., Hite, M., Margolin, G.H., Ramel, C., Salamone, M.F., Tice, R.R., and Wild, D. (1987) Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erytrocytes. Mutation Res. 189, p. 103–112.

7) MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Henika, P.R., and Shelby, M.E. (1990). The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. Fund. Appl. Toxicol, 14, p. 513–522.

8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990). The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides. Mutation Res., 245, p. 245–249.

9) 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 by CSGMT/JEMMS. MMS. Mutation Res., 278, p. 83–98.

10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS. MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan)(1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. Mutagenesis, 10, p. 153–159.

11) Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blackey, D.H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr.F.B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, h., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). *In Vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. Mutation Res., 312, p. 293–304.

12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995). An optimal, generalized sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. Mutagenesis, 10, p. 313–319.

13) 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 Rochold, 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.

14) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. Mutation Res., 120, p. 241–247.

15) MacGregor, J.T., Wehr, CM. and Langlois, R.G. (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. Mutation Res., 120, p. 269–275.

16) Romagna, F. and Staniforth, CD. (1989). The automated bone marrow micronucleus test. Mutation Res., 213, p. 91–104.

17) Gollapudi, B. and McFadden, L.G. (1995). Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. Mutation Res., 347, p. 97–99.

▼C1

18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assay. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I, revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, p. 115–141.

19) 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.

▼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 (√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 post-mitochondrinės 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 Gene-Tox 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.

▼C1

B.15. MUTAGENIŠKUMO BANDYMAS IR ATRANKA PAGAL KANCEROGENIŠKUMĄ. SACCAROMYCES CEREVISIAE GENŲ MUTACIJOS

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 įvertinti cheminių medžiagų (taikant metabolinę aktyvaciją ir jos netaikant) sukeliamas genų mutacijas, gali būti naudojami įvairiausi haploidiniai ir diploidiniai *Saccaromyces cerevisiae* kamienai.

Haploidiniuose kamienuose gali būti naudojamos tiesioginės mutacinės sistemos, tokios kaip mutacinis virsmas iš raudonos spalvos mutantų, kurių augimui reikalingas adeninas (*ade-l, ade-2*) į dvigubus baltos spalvos mutantus, kurių augimui reikalingas adeninas bei atrankos sistemos, tokios kaip atsparumo kanavalinui ir cikloheksimidui indukcinė sistema.

Plačiausiai naudojamą grįžtamųjų mutacijų bandymo sistemą sudaro haploidinis kamienas XV 185–14C, kuris turi geno, koduojančio ochros spalvą, beprasmes mutacijas *ade* 2–1, *org* 4–17, *lys* 1–1, *trp* 5–48, kurios tampa grįžtamosiomis mutacijomis atlikus bazių pakeitimą mutagenais, sukeliančiais vietos atžvilgiu specifines mutacijas arba geno, koduojančio ochros spalvą, veiklą slopinančias mutacijas. Kamienas XV 185–14C taip pat turi žymę *his* 1–7 –beprasmę mutaciją, kuri gali virsti grįžtamąja mutacija, įvykus mutacijai antroje vietoje, bei žymę hom 3–10, kuri tampa grįžtamąja mutacija paveikus ją mutagenais, sukeliančiais skaitymo rėmelio pasislinkimą.

Tarp diploidinių *S. cerevisiae* kamienų plačiausiai naudojamas tėra tik vienas D7 kamienas, kuris yra homozigotiškas pagal *ilv* 1–92.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

Pasiruošimas bandymui

Prieš pradedant bandymą, panaudojant atitinkamą prietaisą, reikėtų paruošti bandomųjų ir kontrolinių medžiagų tirpalus. Jei bandomi organiniai, vandenyje netirpūs junginiai, tai reikėtų naudoti ne daugiau kaip 2 % organinių tirpiklių, tokių kaip etanolis, acetonas ar dimetilsulfoksidas (DMSO), tirpalus (v/v). Naudojant prietaisą galutinė tirpalo koncentracija neturėtų labai įtakoti ląstelių gyvybingumo bei augimo parametrų.

▼C1

Metabolitinė aktyvacija

Ląstelės turėtų būti veikiamos bandomosiomis medžiagomis, esant arba nesant egzogeninės metabolitinės aktyvacijos sistemos.

Graužikų, iš anksto paveiktų fermentus skatinančiomis medžiagomis, kepenų postmitochondrinė frakcija, praturtinta kofaktoriumi yra plačiausiai naudojama metabolitinė aktyvacijos sistema. Metabolitinei aktyvacijai galima naudoti ir kitų rūšių bei audinių postmitochondrines frakcijas bei procedūras.

Bandymo sąlygos

Bandomieji kamienai

Atliekant genų mutacijų bandymus labiausiai yra naudojami haploidinis kamienas XV 185–14C ir diploidinis kamienas D_7. Galima naudoti ir kitus kamienus.

Terpė

Nustatant kolonijų, kuriose neįvyko ir įvyko mutacijos, skaičių, naudojama atitinkama kultivavimui skirta terpė.

Teigiamos ir neigiamos kontrolės

Reikėtų vienu metu naudoti teigiamas, nepaveiktas bandomąja medžiaga ir tirpiklio kontroles. Nustatant kiekvieną specifinę galutinę mutaciją, naudojamos atitinkamos teigiamos kontrolės.

Veikimo koncentracija

Reikėtų naudoti mažiausiai penkias, pakankamai skirtingas bandomosios medžiagos koncentracijas. Toksiškų medžiagų atveju, didžiausia bandomoji koncentracija neturėtų sumažinti kolonijų išgyvenimo mažiau nei 5–10 %. Reikėtų tirti santykinai vandenyje netirpstančių medžiagų tirpumo ribą pagal atitinkamas procedūras. Lengvai vandenyje tirpstančių netoksiškų medžiagų didžiausia koncentracija turėtų būti nustatoma kiekvienu atveju.

Inkubacijos sąlygos

Lėkštelės inkubuojamos 4–7 dienoms 28–30 °C temperatūroje, tamsoje.

Spontaninių mutacijų dažniai

Reikėtų naudoti subkultūras, kuriose spontaninių mutacijų dažniai yra normalūs.

▼C1

Tikslių kopijų skaičius

Atliekant prototrofų, atsirandančių dėl genų mutacijų bei ląstelių gyvybingumo bandymą, reikėtų naudoti mažiausiai tris vienos koncentracijos tikslių kolonijų kopijų lėkšteles. Jei eksperimentų metu naudojamos tokios žymės kaip *hom* 3–10, pasižyminčios nedideliu mutacijų dažniu, reikėtų naudoti daugiau tikslių kolonijų kopijų lėkštelių tam, kad gaunami duomenys būtų statistiškai patikimi.

Bandymo eiga

S. cerevisiae kamienai paprastai veikiami bandomąja medžiaga, ląstelėms esant stacionarinėje arba augimo stadijoje skystoje terpėje. Iš pradžių eksperimentai atliekami su ląstelėmis, esančiomis augimo stadijoje; 1 – 5 × 10 ląstelių/ml veikiamos bandomąja medžiaga 18 valandų 28–37 °C temperatūroje ant kratyklės; jeigu reikia, veikimo metu į terpę įnešamas atitinkamas metabolitinės aktyvacijos sistemos kiekis. Baigiantis veikimui, ląstelės centrifuguojamos, plaunamos ir pasėjamos į atitinkamą kultivavimui skirtą terpę. Po inkubacijos nustatomas plokštelėse kolonijų, kuriose neįvyko arba įvyko genų mutacijos, skaičius. Jei pirmojo eksperimento gauti rezultatai yra neigiami, tai antrasis eksperimentas atliekamas naudojant ląsteles, esančias stacionarinėje fazėje. Jeigu pirmojo eksperimento metu gauti rezultatai teigiami, jie patvirtinami atlikus atitinkamą nepriklausomą eksperimentą.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant kolonijų skaičių, kolonijų, kuriose neįvyko ir kuriose įvyko mutacijos kiekį bei mutacijos dažnį. Visi rezultatai turėtų būti patvirtinti, atlikus nepriklausomą bandymą. Duomenis reikėtų įvertinti atitinkamais statistiniais metodais.

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

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

— panaudotas kamienas,

— bandymo sąlygos: ląstelių stacionarioji ar augimo fazė, terpės sudėtis, inkubacijos temperatūra ir trukmė, metabolitinės aktyvacijos sistema,

— veikimo sąlygos: veikimo laipsnis, veikimo procedūra ir trukmė, veikimo temperatūra, teigiamos ir neigiamos kontrolės,

— kolonijų skaičius, kolonijų, kuriose neįvyko ir įvyko mutacijos bei mutacijos dažnis, dozės ir atsako sąsaja, jei įmanoma nurodyti, statistinis duomenų įvertinimas,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų aiškinimas.

3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼C1

B.16. **MITOZINĖ REKOMBINACIJA – SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

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

Mitozinė rekombinacija *Saccharomyces cerevisiae* gali būti nustatoma tarp genų (arba konkrečiau, tarp geno ir jo centromeros) ir genų viduje. Ši rekombinacija, vykstanti tarp genų, yra vadinama mitoziniu perėjimu, kurio metu susiformuoja atvirkštiniai produktai, tuo tarpu, kai rekombinacijos genų viduje metu susidaro neatvirkštiniai produktai, vadinami genų konversijomis. Apskritai, perėjimas įvertinamas pagal homozigotinių kolonijų arba sektorių, turinčių recesyvinius genų alelius, produkcijos laipsnį heterozigotiniame kamiene, tuo tarpu genų konversija vertinama pagal prototrofinių revertantų, susiformavusių auksotrofiniame heteroaleliniame kamiene, turinčiame du neveiklius to paties geno alelius, skaičių. Siekiant nustatyti mitozinio geno konversiją, dažniausiai naudojami šie kamienai: D4 (heteroalelinis pagal *ade* 2 ir *trp* 5), D7 (heteroalelinis pagal *trp* 5), BZ34 (heteroalelinis pagal *org* 4) ir JD1 (heroalelinis pagal *his* 4 ir *trp* 5). Raudonos ir violetinės spalvos homozigotiniai sektoriai, sukuriantys mitozinį krosingoverį, gali būti vertinami, naudojant D5 arba D7 kamienus (taipogi galima įvertinti mitozinę genų konversiją ir grįžtamąją mutaciją, vykstančią *ilv* 1–92), kurie yra heteroaleliški pagal papildančiuosius geno *ade* 2 alelius.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

Pasiruošimas bandymui

Prieš pradedant bandymą, panaudojant atitinkamą prietaisą, reikėtų paruošti bandomųjų ir kontrolinių medžiagų tirpalus. Jei bandomi organiniai, vandenyje netirpūs junginiai, reikėtų naudoti ne daugiau kaip 2 % organinių tirpiklių, tokių kaip etanolis, acetonas ar dimetilsulfoksidas (DMSO), tirpalus (v/v). Naudojant prietaisą, galutinė tirpalo koncentracija neturėtų labai įtakoti ląstelių gyvybingumo bei augimo parametrų.

Metabolinė aktyvacija

Ląstelės turėtų būti veikiamos bandomosiomis medžiagomis, esant arba nesant egzogeninės metabolinės aktyvacijos sistemos. Graužikų, iš anksto paveiktų fermentus skatinančiomis medžiagomis, kepenų postmitochondrinė frakcija praturtinta kofaktoriumi yra plačiausiai naudojama metabolinė aktyvacijos sistema. Metabolinei aktyvacijai galima naudoti ir kitų rūšių bei audinių postmitochondrines frakcijas bei procedūras.

▼C1

Bandymo sąlygos

Bandomieji kamienai

Dažniausiai naudojami diploidiniai D_4, D_5, D_7 ir JD1. Galima naudoti ir kitus kamienus.

Terpė

Nustatant kolonijų, kuriose neįvyko mitozinė rekombinacija, skaičių ir kolonijų, kuriose įvyko mitozinė rekombinacija, dažnį, naudojama atitinkama terpė skirta kultivavimui.

Teigiamos ir neigiamos kontrolės

Reikėtų vienu metu naudoti teigiamas, nepaveiktas bandomąja medžiaga ir tirpiklio kontroles. Nustatant kiekvieną specifinę galutinę rekombinaciją, naudojamos atitinkamos teigiamos kontrolės.

Veikimo koncentracijos

Reikėtų naudoti mažiausiai penkias, tinkamai atskirtas bandomosios medžiagos koncentracijas. Reikėtų apsvarstyti citotoksiškumą ir tirpumą. Mažiausia koncentracija neturi įtakoti ląstelių gyvybingumo. Toksiškų medžiagų atveju, didžiausia bandomoji koncentracija neturėtų sumažinti kolonijų išgyvenimo mažiau nei 5–10 %. Reikėtų tirti santykinai vandenyje netirpstančių medžiagų tirpumo ribą pagal atitinkamas procedūras.

Lengvai vandenyje tirpstančių netoksiškų medžiagų didžiausia koncentracija turėtų būti nustatoma kiekvienu atveju.

Inkubacijos sąlygos

Lėkštelės inkubuojamos 4–7 dienoms 28–30 °C temperatūroje, tamsoje. Analizei naudojamos plokštelės, kuriose, dėka mitozinio perėjimo, atsiranda raudonos ir violetinės spalvos sektoriai, turėtų būti laikomos šaldytuve (apie 4 °C temperatūroje) papildomai vieną arba dvi dienas prieš nustatant atitinkamai nusidažiusių kolonijų skaičių.

Spontaninės mitozinės rekombinacijos dažniai

Reikėtų naudoti subkultūras, kuriose spontaninės mitozinės rekombinacijos dažniai yra normalūs.

▼C1

Tikslių kopijų skaičius

Atliekant prototrofų, atsirandančių dėl mitozinio geno konversijos bei ląstelių gyvybingumo bandymą, reikėtų naudoti mažiausiai tris vienos koncentracijos tikslių kolonijų kopijų lėkšteles. Tiriant recesyvinį homozigotiškumą, atsirandantį dėl mitozinio krosingoverio, reikėtų panaudoti daugiau lėkštelių, kad būtų galima nustatyti tinkamą kolonijų skaičių.

Bandymo eiga

S. cerevisiae kamienai paprastai veikiami bandomąja medžiaga, ląstelėms esant stacionarinėje arba augimo stadijoje skystoje terpėje. Iš pradžių eksperimentai atliekami su ląstelėmis, esančiomis augimo stadijoje; $1–5\times10^7$ ląstelių/ml veikiamos bandomąja medžiaga 18 valandų 28–37 °C temperatūroje ant kratyklės; jeigu reikia, tai veikimo metu į terpę įnešamas atitinkamas metabolitinės aktyvacijos sistemos kiekis.

Baigiantis veikimui, ląstelės centrifuguojamos, plaunamos ir pasėjamos į atitinkamą kultivavimui skirtą terpę. Po inkubacijos nustatomas plokštelėse kolonijų, kuriose neįvyko arba įvyko mitozinė rekombinacija, skaičius.

Jei pirmojo eksperimento gauti rezultatai yra neigiami, tai antrasis eksperimentas atliekamas, naudojant ląsteles, esančias stacionarinėje fazėje. Jeigu pirmojo eksperimento metu gauti rezultatai teigiami, jie patvirtinami atlikus atitinkamą nepriklausomą eksperimentą.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant kolonijų skaičių, kolonijų, kuriose neįvyko ir kuriose įvyko mitozinė rekombinacija, kiekį bei rekombinacijų dažnį.

Visi rezultatai turėtų būti patvirtinti atlikus nepriklausomą bandymą.

Duomenis reikėtų įvertinti atitinkamais statistiniais metodais.

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

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

— panaudotas kamienas,

— bandymo sąlygos: ląstelių stacionarioji ar augimo fazė, terpės sudėtis, inkubacijos temperatūra ir trukmė, metabolitinės aktyvacijos sistema,

— veikimo sąlygos: veikimo laipsnis, veikimo procedūra ir trukmė, veikimo temperatūra, teigiamos ir neigiamos kontrolės,

— kolonijų skaičius, kolonijų, kuriose neįvyko ir įvyko rekombinacijos bei rekombinacijos dažnis, dozės ir atsako sąsaja, jei įmanoma nurodyti, statistinis duomenų 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.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.

▼C1

B.18. **DNR PAŽAIDOS IR JŲ REPARACIJA – NETAISYKLINGA DNR SINTEZĖ – ŽINDUOLIŲ LĄSTELĖSE *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

Neplanuotos DNR sintezės (NDS) bandymo metu įvertinama DNR sintezė reparacijos metu, kai iškerpama bei pašalinama cheminėmis ar fizinėmis medžiagomis pažeista DNR atkarpa. Bandymas paremtas tričiu žymėto timidino (^{3}H-TdR) įjungimu į žinduolių ląstelių, nesančių ląstelinio ciklo S (sintezės) fazėje, DNR. ^{3}H-TdR įsijungimas į DNR gali būti nustatomas atliekant paveiktų ląstelių DNR autoradiografiją arba registruojant skystosios scintiliacijos įvykius (SSĮ). Išskyrus pirminius žiurkių hepatocitus, naudojamos žinduolių ląstelės kultivuojamos kartu su bandymo medžiaga, esant arba nesant metabolitinės aktyvacijos sistemos. Taipogi NDS galima įvertinti ir sistemose *in vivo*.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

Pasiruošimas bandymui

Bandomosios, kontrolinės ar etaloninės medžiagos turėtų būti paruošiamos kultivavimui skirtoje terpėje arba, panaudojant atitinkamus prietaisus, ištirpinamos ar suspenduojamos ir vėliau praskiedžiamos kultivavimui skirta terpe, kad bandymo metu būtų galima jas naudoti. Galutinė medžiagų koncentracija, pasiekta naudojant prietaisą, neturėtų įtakoti ląstelių gyvybingumo.

Bandymo metu galima naudoti žiurkių hepatocitų pirmines kultūras, žmogaus limfocitus arba gerai žinomas ląstelių linijas (pvz., žmogaus diploidinius fibroblastus).

Ląstelės turėtų būti veikiamos bandomąja medžiaga, esant arba nesant metabolitinės aktyvacijos sistemos.

Bandymo sąlygos

K u l t ū r ų s k a i č i u s

Atliekant neplanuotos DNR sintezės bandymą autoradiografijos metodu, reikėtų naudoti mažiausiai dvi ląstelių kultūras, o skystosios scintiliacijos įvykių registravimo metodu –mažiausiai šešias kultūras (arba mažiau, jei moksliškai pagrindžiama), būtinas kiekvienam eksperimento etapui.

▼C1

Teigiamos ir neigiamos kontrolės

Atliekant kiekvieną eksperimentą, reikėtų vienu metu naudoti teigiamas ir neigiamas (neveiktas ir (ar) su prietaisu) kontroles, esant ar nesant metabolitinės aktyvacijos sistemos.

Atliekant bandymą ir naudojant žiurkių hepatocitų pirmines kultūras, naudojamos teigiamos kontrolės – 7,12-dimetilbenzantracenas (7,12-DMBA) arba 2-acetilaminofluorenas (2-AAF). Jei naudojamos gerai žinomos ląstelių linijos ir atliekamas neplanuotos DNR sintezės bandymas tiek autoradiografijos, tiek ir skystosios scintiliacijos įvykių registravimo metodais, nesant metabolitinės aktyvacijos sistemos, 4-nitrokvinolin-N-oksidas naudojamas kaip teigiama kontrolė, o esant metabolitinės aktyvacijos sistemai – N-dimetilnitrozaminas.

Veikimo koncentracijos

Reikėtų naudoti daug bandomosios medžiagos koncentracijų, išdėstytų dideliame intervale, pakankame atsakui nustatyti. Didžiausios koncentracijos bandomoji medžiaga turėtų sukelti keletą citotoksinių poveikių. Turėtų būti ištirti santykinai vandenyje netirpūs junginiai, kad būtų nustatyta jų tirpumo riba. Pavienio bandymo metu turėtų būti nustatyta laisvai vandenyje tirpstančių netoksinių junginių didžiausia bandomoji koncentracija.

Ląstelės

Kultivuojant kultūras reikėtų naudoti atitinkamą terpę ir laikytis atitinkamos CO_2 koncentracijos, temperatūros bei drėgmės. Reikėtų periodiškai tikrinti gerai žinomas ląstelių linijas, siekiant nustatyti mikoplazmų sukeliamą infekciją.

Metabolinė aktyvacija

Kai bandomos pirminės hepatocitų kultūros, metabolinės aktyvacijos nenaudojamos. Gerai žinomos ląstelių linijos bei limfocitai veikiami bandomąja medžiaga, esant ar nesant atitinkamai metabolinės aktyvacijos sistemai.

Bandymo eiga

Kultūrų paruošimas

Gerai žinomos ląstelių linijos paruošiamos iš kamieninių kultūrų (veikiant tripsinu arba kratymu), pasėjamos atitinkamu tankumu į terpę kultivavimui skirtuose induose ir inkubuojamos 37 °C temperatūroje.

Trumpalaikės žiurkių hepatocitų kultūros sukuriamos šviežiai disocijuotus hepatocitus pasėjant į atitinkamą terpę ir leidžiant jiems prisitvirtinti prie augimo paviršiaus.

Žmogaus limfocitų kultūros paruošiamos atitinkamais metodais.

▼C1

Kultūrų veikimas bandomąja medžiaga

Pirminiai žiurkių hepatocitai

Šviežiai išskirti žiurkių hepatocitai veikiami bandomąja medžiaga terpėje, turinčioje 3H-TdR, atitinkamą laiko tarpą. Baigiantis veikimui, terpė atskiriama nuo ląstelių, kurios vėliau sudrėkinamos, fiksuojamos bei išdžiovinamos. Objektinius stiklelius reikėtų panardinti į autoradiografinę emulsiją (galima naudoti ir fotografinę juostelę), eksponuoti, išryškinti nudažyti ir suskaičiuoti ląsteles.

Gerai žinomos ląstelių linijos ir limfocitai

Autoradiografija: Ląstelių kultūros veikiamos bandomąja medžiaga atitinkamą laiko tarpą, po to veikiamos ^{3}H-TdR. Laiko trukmė parenkama atsižvelgiant į bandomosios medžiagos prigimtį, metabolitinių sistemų aktyvumus bei ląstelių tipą. Tam, kad būtų pasiekta pati intensyviausia neplanuota DNR sintezė, ^{3}H-TdR turi būti įnešamas arba vienu metu su bandomąja medžiaga arba praėjus kelioms minutėms po to, kai buvo įnešta bandomoji medžiaga. Kuri procedūra bus pasirinkta, nulems tarpusavio sąveika tarp bandomosios medžiagos ir ^{3}H-TdR. Siekiant atskirti neplanuotą DNR sintezę nuo pusiau konservatyvios DNR sintezės, pastaroji turi būti blokuojama, pvz., panaudojant neturinčią arginino terpę arba terpę, turinčią nedaug serumo, arba pridedant į terpę hidroksišlapalo.

Skystosios scintiliacijos įvykių registacija: Prieš veikiant bandomąja medžiaga, ląstelių perėjimas į S fazę turėtų būti blokuojamas taip, kaip aprašyta anksčiau; vėliau ląstelės veikiamos bandomąja medžiaga taip, kaip tai atliekama autoradiografijos metu. Baigiantis inkubacijos periodui, iš ląstelių išskiriama DNR ir nustatomas absoliutus DNR bei į ją įsijungusio ^{3}H-TdR kiekis.

Reikėtų pabrėžti, kad jei, dirbant remiantis aprašytu metodu, naudojami žmogaus limfocitai, tai nestimuliuotų kultūrų atveju pusiau konservatyvios DNR sintezės nėra būtina blokuoti.

Analizė

Autoradiografiniai nustatymai

Įvertinant neplanuotos DNR sintezės intensyvumą ląstelių kultūroje, neskaičiuojami branduoliai, esantys S fazėje. Reikėtų suskaičiuoti mažiausiai 50 ląstelių, esant vienai koncentracijai. Kiekviename stiklelyje reikia suskaičiuoti keletą atsitiktinių regionų, plačiai atskirtų vienas nuo kito. Į citoplazmą įsijungusio ^{3}H-TdR kiekis turėtų būti nustatomas, suskaičiuojant tris branduolio apribotus laukelius, esančius jau suskaičiuotų ląstelių citoplazmoje.

Skystosios scintiliacijos įvykių nustatymai

Siekiant įvertinti neplanuotos DNR sintezės intensyvumą pagal užregistruotus skystosios scintiliacijos įvykius, reikėtų naudoti atitinkamą ląstelių kultūrų kiekį, esant kiekvienai koncentracijai bandomajame bei kontroliniame mėginiuose.

▼C1

Visi rezultatai turėtų būti patvirtinti, atlikus nepriklausomą bandymą.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse.

2.1. AUTORADIOGRAFINIAI NUSTATYMAI

Reikėtų atskirai registruoti į citoplazmą įsijungusio ^{3}H-TdR kiekį bei ląstelės branduolyje esančių granulių skaičių.

Apibūdinant į citoplazmą įsijungusio ^{3}H-TdR kiekio bei ląstelės branduolyje esančių granulių skaičiaus pasiskirstymą, galima naudoti vidurkį, medianą ir modą.

2.2. SKYSTOSIOS SCINTILIACIJOS ĮVYKIŲ NUSTATYMAI

Nustatant skystosios scintiliacijos įvykius, ^{3}H-TdR įsijungimą išreikšti dpm/μg DNR. Apibūdinant įsijungimo pasiskirstymą, galima panaudoti dpm/ug DNR vidurkį bei standartinį nukrypimą.

Duomenis reikėtų įvertinti atitinkamais statistiniais metodais.

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

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

— panaudotos ląstelės, tankumas ir persėjimų skaičius veikimo metu, ląstelių kultūrų skaičius,

— ląstelių kultūrų kultivavimo metodai, įskaitant terpę, temperatūrą ir CO_2 koncentraciją,

— bandomoji medžiaga, priemonė, koncentracijos ir bandymo metu naudojamų koncentracijų pasirinkimo kriterijai,

— metabolitinės aktyvacijos sistemų apibūdinimas,

— veikimo tvarkaraštis,

— teigiamos ir neigiamos kontrolės,

— panaudotas autoradiografinis metodas,

— ląstelių patekimo į S fazę blokavimo procedūros,

— DNR išskyrimo ir absoliutaus kiekio nustatymo procedūros, atliekant skystosios scintiliacijos įvykių registraciją,

— dozės ir atsako sąsaja, jei įmanoma,

— 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.19. **APSIKEITIMO SESERINĖMIS CHROMATIDĖMIS BANDYMAS *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

Apsikeitimo seserinėmis chromatidėmis (ASC) bandymas trunka trumpai ir jo metu nustatomi grįžtamieji apsikeitimai DNR tarp dviejų seserinių chromatidžių, esančių vienoje dvigubėjančioje chromosomoje. Apsikeitimas seserinėmis chromatidėmis pasikeitimą DNR replikacijos produktais iš pažiūros homologiškuose lokusuose. Pasikeitimo proceso metu neabejotinai įvyksta DNR trūkis ir susiuvimas, tačiau nedaug žinoma apie šio proceso molekulinius mechanizmus. Apsikeitimo seserinėmis chromatidėmis nustatymui reikia skirtingai pažymėti seserines chromatides ir šitai galima padaryti, įjungiant bromdeoksiuridiną (BrdU) į chromosominę DNR dviejų ląstelinių ciklų metu.

Žinduolių ląstelės veikiamos bandomąja medžiaga *in vitro*, naudojant arba nenaudojant žinduolių metabolitinę aktyvacijos sistemą, jeigu reikia, ir kultivuojamos dviejų replikacijos ciklų laikotarpiu terpėje, turinčioje bromdeoksiuridino. Paveikus vertės išsisukimo inhibitoriumi (pvz., kolchicinu), ląstelės surenkamos ir paruošiami chromosomų preparatai.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

Pasiruošimas bandymui

— Bandymo metu galima naudoti pirmines kultūras (žmogaus limfocitai) arba gerai žinomas ląstelių linijas (pvz., kiniškojo žiurkėno kiaušidžių ląsteles). Reikėtų patikrinti, ar ląstelių linijos neužsikrėtusios mikoplazmomis.

— Reikėtų naudoti atitinkamą kultivavimui skirtą terpę bei parinkti inkubacijos sąlygas (pvz., temperatūra, indai, skirti kultivavimui, CO_2 koncentracija bei drėgmė).

— Prieš veikiant ląsteles bandomosiomis medžiagomis, šios turi būti paruoštos kultivavimui skirtoje terpėje arba, panaudojant atitinkamus prietaisus, ištirpintos ar suspenduotos. Panaudojant tirpiklį kaip kontrolę, reikėtų stebėti, kad, naudojant atitinkamą prietaisą, pasiekta bandomosios medžiagos galutinė koncentracija kultivavimui skirtoje sistemoje ypatingai neįtakotų ląstelių gyvybingumo ar augimo greičio bei apsikeitimo seserinėmis chromatidėmis dažnumo.

▼C1

— Ląstelės turėtų būti veikiamos bandomąja medžiaga, esant arba nesant egzogeninei žinduolių metabolitinės aktyvacijos sistemai. Jei naudojami ląstelių, turinčių metabolitinę aktyvacijos sistemą, tipai, tai aktyvumo greitis ir prigimtis turėtų atitikti bandomąją cheminių junginių klasę.

Bandymo sąlygos

Kultūrų skaičius

Kiekvieno eksperimento etapo metu reikėtų naudoti mažiausiai dvi kultūras.

Teigiamos ir neigiamos kontrolės

Kiekvieno eksperimento metu reikėtų naudoti teigiamas kontroles, sudarytas tiek iš tiesiogiai veikiančio junginio, tiek junginio, kurį reikia metabolitiškai aktyvuoti; taipogi reikėtų naudoti kontrolę kartu su priemone.

Toliau pateikiamos medžiagos, kurias galima naudoti kaip teigiamas kontroles:

— tiesiogiai veikiąs junginys:

  — etilmetansulfonatas,

— netiesiogiai veikiąs junginys:

  — ciklofosfamidas.

Jeigu reikia, galima naudoti ir papildomą teigiamą kontrolę, priklausančią tai pačiai cheminių junginių klasei kaip ir bandomoji medžiaga.

Veikimo koncentracijos

Reikėtų naudoti mažiausiai tris bandomosios medžiagos koncentracijas, tinkamai atskirtas vieną nuo kitos. Didžiausia koncentracija turėtų sukelti intensyvų toksinį poveikį, tačiau nesutrukdyti ląstelių replikacijos ciklui vykti. 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.

Bandymo eiga

Kultūrų paruošimas

Gerai žinomos ląstelių linijos paruošiamos iš kamieninių kultūrų (veikiant tripsinu arba kratymu), pasėjamos atitinkamu tankumu į terpę kultivavimui skirtuose induose ir inkubuojamos 37 °C temperatūroje. Vienasluoksnių kultūrų atveju ląstelių, esančių kultivavimui skirtame inde, skaičius turėtų būti sureguliuotas taip, kad ląstelių surinkimo metu kultūros susimaišymas siektų ne daugiau 50 %. Ląsteles galima kultivuoti ir suspensijoje. Žmogaus limfocitų kultūros paruošiamos iš heparinizuoto kraujo, panaudojant atitinkamas procedūras ir inkubuojami 37 °C temperatūroje.

▼C1

Veikimas

Ląstelės, esančios eksponentinėje augimo fazėje, veikiamos bandomąja medžiaga atitinkamą laiko tarpą; dažniausiai užtenka 1–2 valandų, tačiau konkrečiais atvejais veikimas gali būti pratęsiamas iki dviejų ląstelinių ciklų. Ląstelės, nepasižyminčios pakankamu metaboliniu aktyvumu, turėtų būti veikiamos bandomąja medžiaga, esant ar nesant atitinkamai metabolinės aktyvacijos sistemai. Baigiantis veikimui, ląstelės atplaunamos nuo neprisirišusios bandomosios medžiagos ir kultivuojamos du replikacijos periodus terpėje, turinčioje bromdeoksiuridino. Ląsteles galima veikti vienu metu bandomąja medžiaga ir bromdeoksiuridinu dviejų ląstelinių ciklų trukmės laiko periodu.

Žmogaus limfocitų kultūros veikiamos tuo metu, kai jos yra pusiau sinchroninėje būsenoje.

Ląstelės analizuojamos tada, kai jos pradeda dalintis antrą kartą po veikimo, užtikrinant, kad bandomąja medžiaga buvo paveiktos ląstelės, esančios pačiuose jautriausiose medžiagos atžvilgiu ląstelinio ciklo fazėse. Visos kultūros, į kurias buvo įneštas bromdeoksiuridinas, laikomos tamsoje arba blankioje dienos šviesos lempų šviesoje iki tol, kol bus surinktos ląstelės tam, kad būtų sumažinta DNR, turinčios bromdeoksiuridino, fotolizė.

Ląstelių surinkimas

Prieš surenkant ląsteles, šios veikiamos verpstės išsisukimo inhibitoriumi (pvz., kolchicinu) 1–2 valandas. Kiekviena kultūra surenkama ir apdorojama atskirai, kad chromosomos būtų paruoštos.

Chromosomų paruošimas ir dažymas

Chromosomos paruošiamos standartiniais citogenetiniais metodais. Objektiniai stikleliai, skirti apsikeitimo seserinėmis chromatidėmis demonstravimui, gali būti dažomi keliais būdais (pvz., panaudojant fluorescencinius dažus ir Giemsa dažymą).

Analizė

Analizuojamų ląstelių skaičius turėtų būti pagrįstas apsikeitimo seserinėmis chromatidėmis spontaniniu kontroliniu dažniu. Įprastiniu atveju, tiriant apsikeitimą seserinėmis chromatidėmis, mažiausiai 25 gerai matomos metafazės yra analizuojamos. Objektiniai stikleliai užkoduojami prieš analizę. Žmogaus limfocitų atveju, analizuojamos tik metafazėje esančios chromosomos, turinčios 46 chromatides. Gerai žinomų ląstelių linijų atveju analizuojamos tik tos metafazinės chromosomos, kurios turi ± 2 modalinį skaičių centromerų. Reikėtų nurodyti ar, tiriant apsikeitimą seserinėmis chromatidėmis, skaičiuojamas žymės centromerinis perjungimas. Rezultatai turi būti patvirtinti, atlikus nepriklausomą eksperimentą.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti pateikti lentelėse. Atskirai nuo paveiktų ir kontrolinių kultūrų turėtų būti atskirai pateiktas apsikeitimų seserinėmis chromosomomis kiekvienoje metafazinėje ir nemetafazinėje chromosomoje skaičius.

Rezultatai turėtų būti įvertinti atitinkamais statistiniais metodais.

▼C1

3. **ATASKAITA**

3.1 BANDYMO ATASKAITA

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

— panaudotos ląstelės, ląstelių kultūrų kultivavimo metodai,

— bandymo sąlygos: terpės sudėtis, CO_2 koncentracija, bandomosios medžiagos koncentracija, panaudota priemonė, inkubacijos temperatūra, veikimo laikas, panaudotas verpstės išsisukimo inhibitorius, jo koncentracija ir veikimo inhibitoriumi trukmė, panaudotos žinduolių metabolitinės aktyvacijos sistemos tipas, teigiamos ir neigiamos kontrolės,

— ląstelių kultūrų, naudotų kiekviename eksperimento etape, skaičius,

— objektinių stiklelių paruošimo metodo aprašymas,

— išanalizuotų metafazių skaičius (kiekvienos kultūros bandymo duomenys pateikiami atskirai),

— apsikeitimų seserinėmis chromatidėmis vienoje ląstelėje ir vienoje chromosomoje vidurkis (kiekvienos kultūros bandymo duomenys pateikiami atskirai),

— apsikeitimo seserinėmis chromatidėmis vertinimo kriterijai,

— dozės pasirinkimo kriterijai,

— dozės ir atsako sąsaja, jei įmanoma,

— 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.20. **DROSOPHILA MELANOGASTER NUO LYTIES PRIKLAUSOMO RECESYVINIO 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

Su lytimi susijusio recesyvinio letalaus (LSRL) testo, panaudojant *Drosophila melanogaster*, metu vabzdžio embrioninės linijos ląstelėse nustatomos mutacijos, tiek taškinės, tiek ir nedidelės delecijos. Šis bandymas yra skirtas tiesioginėms mutacijoms analizuoti ir jo metu galima nustatyti mutacijas, lokalizuotas apie 800 lokusų, sudarančių apie 80 % visų X-chromosomos lokusų. X-chromosoma sudaro maždaug penktadalį haploidinio *Drosophila* genomo.

Drosophila melanogaster X-chromosomoje vykstančios mutacijos pasireiškia fenotipiškai patinuose, turinčiuose mutantinį geną. Kada mutacija yra letali hemizigotinėmis sąlygomis, tai jos egzistavimas reiškia, kad viena iš dviejų patinų grupių neturės palikuonių, kuriuos normaliomis sąlygomis atsiveda heterozigotinės patelės. Atliekant LSRL testą, pasinaudojama šia informacija, specifiškai pažymint bei išdėstant chromosomas.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. BANDYMO METODO APIBŪDINIMAS

Pasiruošimas bandymui

P a d e r m ė s

Gali būti naudojami gerai žinomos laukinės padermės patinai ir padermės Muller-5 patelės. Taipogi galima naudoti kitas atitinkamai pažymėtas patelių padermes, turinčias daug invertuotų X-chromosomų.

B a n d o m o j i m e d ž i a g a

Bandomosios medžiagos turėtų būti tirpinamos vandenyje. Prieš pradedant veikimą, vandenyje netirpstančios medžiagos gali būti ištirpinamos arba suspenduojamos panaudojus atitinkamas priemones (pvz., etanolio ir Tween-60 arba Tween-80 mišinį), o tada praskiedžiamos vandeniu ar druskų tirpalu. Reikėtų vengti naudoti dimetilsulfoksidą (DMSO) kaip tirpinimo priemonę.

▼C1

Gyvūnų skaičius

Testą reikėtų taip suplanuoti, kad iš anksto būtų numatytas jo jautrumas ir skiriamoji geba. Dažnai pasireiškiančios spontaninės mutacijos, stebimos atitinkamose kontrolėse turės didelės įtakos chromosomų, paveiktų bandomąja medžiaga ir kurios turi būti analizuojamos, skaičiui.

Davimo būdas

Bandomoji medžiaga gali būti duodama per virškinamąjį traktą, ją injekuojant arba veikiant dujomis ar garais. Bandomąją medžiagą galima duoti ir su maistu, tačiau šitai daroma naudojant cukraus tirpalą. Jeigu reikia, medžiagos gali būti ištirpinamos 0,7 % NaCl tirpale ir injekuojamos į stemplę ar pilvelį.

Teigiamų ir neigiamų kontrolių naudojimas

Reikėtų naudoti neigiamas (priemonė) ir teigiamas kontroles. Tačiau, jei galima pasinaudoti anksčiau atliktų laboratorinių bandymų duomenimis, tuo pačiu metu kontrolių naudoti nereikia.

Veikimo dozė

Reikėtų naudoti tris veikimo dozes. Atliekant išankstinį bandomosios medžiagos įvertinimą, galima naudoti vieną dozę, kuri yra arba didžiausia toleruojamoji koncentracija, arba kuri sukelia kai kuriuos toksiškumo požymius. Veikiant netoksiškomis medžiagomis, reikėtų naudoti maksimalią veikimo koncentraciją.

Bandymo eiga

Laukinio tipo patinai (3–5 dienų amžiaus) veikiami bandomąja medžiaga ir poruojami individualiai su daugeliu Muller-5 ar kitos atitinkamai pažymėtos (turinčios daug invertuotų X-chromosomų) padermės nekaltų patelių. Kiekvieną 1–3 dieną apvaisintos patelės keičiamos nekaltomis patelėmis tam, kad būtų panaudotas visas embrioninių ląstelių ciklas. Šių patelių palikuonys vertinami pagal letalius poveikius subrendusios spermos, vidurinėje ar vėlyvojoje stadijoje esančių spermatidžių, spermatocitų ir spermatogonijų atžvilgiu veikimo metu.

Ankstesniuose kryžminimuose naudotoms heterozigotinėms pirmos palikuonių kartos (F_1) patelėms leidžiama kryžmintis individualiai (viena patelė inde) su jų broliais. Kiekviena F_2 karta įvertinama pagal laukinio tipo patinų neegzistavimą. Jei nustatoma, kad kultūra yra paimta iš F_1 patelės, turinčios letalią X-chromosomos mutaciją (pvz., nebuvo pastebėta patinų su paveikta chromosoma), tai turėtų būti bandomos tą patį genotipą turinčios šios patelės dukterys tam, kad būtų galima įsitikinti jog letalumas pasikartoja kitoje kartoje.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti pateikti lentelėse, nurodant ištirtų X-chromosomų skaičių, nevaisingų patinų skaičių ir kiekvieno paveikto patino kiekvieno poravimosi periodo metu nustatytų letalių chromosomų skaičių, esant kiekvienai bandomosios medžiagos koncentracijai, reikėtų registruoti skirtingų dydžių genų klasterių kiekvieno patino genome skaičių. Šie rezultatai turi būti patvirtinti, atlikus atskirą eksperimentą.

▼C1

Įvertinant su lytimi sukibusių recesyvių letalių genų testų rezultatus, reikėtų panaudoti atitinkamus statistinius metodus. Remiantis atitinkamais statistiniais metodais, reikėtų įvertinti ir apsvarstyti vieno patino recesyvių letalių genų kaupimąsi.

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

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

— padermė: panaudotos *Drosophila* padermės ar kamienai, vabzdžių amžius, paveiktų patinų skaičius, sterilių patinų skaičius, sukurtų F2 kartos kultūrų skaičius, F2 kultūrų, neturinčių palikuonių, skaičius, chromosomų, turinčių letalią mutaciją, nustatytą embrioninės linijos ląstelėse, skaičius,

— grupių, kurios veikiamos, dydžio nustatymo kriterijai,

— bandymo sąlygos: išsamus veikimo ir mėginių paėmimo tvarkaraštis, veikimo koncentracijos, toksiškumo bandymo duomenys, neigiamos (tirpiklis) ir teigiamos kontrolės, jeigu reikia,

— letalių mutacijų įvertinimo kriterijai,

— dozės ir atsako sąsaja, jei įmanoma,

— duomenų įvertinimas,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų aiškinimas.

3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼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 kanilę 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.

▼C1

B.24. **PELIŲ TAŠKINIS 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

Šis bandymas atliekamas naudojant peles, kuriose besivystantys embrionai yra veikiami cheminėmis medžiagomis. Šios medžiagos veikia besivystančių embrionų ląsteles -melanoblastus, kuriuose lokalizuoti genai, kontroliuojantys kailio plaukų spalvą. Besivystantys embrionai yra heterozigotiški pagal daugelį genų, apsprendžiančių kailio spalvą. Įvykus mutacijai melanoblasto tokio geno dominantiniame alelyje arba šį alelį praradus (dėl daugelio genetinių įvykių), iš melanoblasto atsirandančios ląstelės palikuonės įgyja recesyvų fenotipą ir dėl to pelių palikuonių kailyje atsiranda skirtingos spalvos taškai. Nustatomas palikuonių, turinčių tokius taškus, bei juos sukeliančių skaičius bei mutacijų dažnis ir palyginama su palikuonių, kilusių iš embrionų tik tirpikliu, taškų bei juos sukėlusių mutacijų skaičiumi ir dažniu. Pelių taškinio bandymo metu nustatomos spėjamos gemalinių ląstelių somatinės mutacijos.

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 atitinkamas priemones. Naudojama priemonė neturi trukdyti nei bandomajai cheminei medžiagai veikti, nei toksiniams poveikiams pasireikšti. Reikėtų naudoti šviežiai paruoštus bandomosios cheminės medžiagos preparatus.

Eksperimentiniai gyvūnai

T kamieno (*nonagouti*, a/a; šinšilos, rožinių akių, c^{ch} p/c^{ch} p; rudos, b/b; atmieštos spalvos, trumpų ausų, d se/d se; margas taškuotumas, s/s) pelės yra poruojamos arba su HT kamieno (blyškios, *nonagouti*, trumpų kojų, pa a bp/pa a bp; labai tankaus kailio ln fz/ln fz; perlų spalvos pe/pe) arba su C57 BL (*nonagouti*, a/a) pelėmis. Taip pat galima poruoti kamienų NMRI (*nonagouti*, a/a; albinosai, c/c) ir DBA (*nonagouti*, a/a; rudos, b/b; atmieštos spalvos d/d) peles tam, kad jų palikuonys turėtų *nonagouti* tipo mutaciją.

▼C1

Skaičius ir lytis

Pakankamai vaikingų patelių veikiamos bandomąja medžiaga, kad kiekvieną dozę gavusios patelės atsivestų reikiamą gyvų palikuonių skaičių. Paimant atitinkamo dydžio mėginį, atsižvelgiama į pelių, paveiktų bandomąja medžiaga, taškuotumą bei kontrolinių duomenų gausą. Neigiamas rezultatas laikomas priimtinu, jei buvo įvertinta mažiausiai 300 palikuonių, kuriuos atsivedė patelės, paveiktos bandomąja medžiaga.

Teigiamų ir neigiamų kontrolių naudojimas

Turi būti gaunami kontroliniai duomenys, vienu metu ištyrus peles, paveiktas tik nešikliu (neigiamomis kontrolėmis). Anksčiau toje pačioje laboratorijoje atliktų bandymų kontroliniai duomenys irgi gali būti surenkami, kad būtų užtikrintas duomenų vientisumas ir padidėtų bandymo jautrumas. Jei buvo nustatyta, kad bandomoji cheminė medžiaga nėra mutageniška, toje pačioje laboratorijoje turi būti atliekamas bandymas su mutageniška bandomąja medžiaga ir gaunami teigiamų kontrolių bandymo duomenys.

Davimo būdas

Paprastai bandomoji medžiaga duodama vaikingoms patelėms per vamzdelį, įvestą į trachėją arba atliekant injekciją į pilvą.

Veikimo dozė

Naudojamos trys veikimo dozės, iš kurių viena sukelia toksiškumo požymius arba sumažina vados dydį. Naudojant netoksines chemines medžiagas, reikėtų duoti pačią didžiausią dozę, kuri praktiškai įmanoma.

Bandymo eiga

Pavienis veikimas bandomąja medžiaga įprastai atliekamas 8, 9 ar 10 gestacijos dieną, skaičiuojant nuo 1 dienos, kuri laikoma ta diena, kai makšties kamštis buvo pastebėtas pirmąsyk. Šios dienos atitinka 7,25, 8,25 ir 9,25 dienas, praėjusias nuo apvaisinimo. Tomis dienomis galima sėkmingai atlikti veikimus bandomosiomis medžiagomis.

Analizė

Palikuonys yra užkoduojami ir, praėjus 3–4 savaitėms po gimimo, įvertinami pagal taškus. Skiriamos trys taškų klasės:

a) baltos spalvos 5 mm diametro taškai, išsidėstę pilvo dalyje ir tikriausiai atsiradę dėl ląstelių žūties (BVPT);

b) geltonos spalvos, panašūs į agučio (*agouti-like*) taškai, stebimi krūties, lytinių liaukų, viršugalvio ašinėje ir kirkšninėje srityse, kurie, kaip manoma, atsirado dėl sutrikusios ląstelių diferenciacijos (SDT);

c) pigmentuoti ir baltos spalvos taškai, išsimėtę kailyje ir, manoma, kad tai susiję su somatinėmis mutacijomis (SMT).

▼C1

Visos trys taškų klasės, išskyrus paskutiniąją, įvertinamos pagal genetinę reikšmę. Problemos, atsirandančios dėl taškų, atsirandančių sutrikus ląstelių diferenciacijai, ar somatinių mutacijų, atskyrimo išsprendžiamos, atlikus kailio mėginių fluorescencinę analizę.

Reikėtų registruoti akivaizdžias pagrindines morfologines anomalijas, pasireiškiančias palikuonių tarpe.

2. **DUOMENYS**

Pateikiant duomenis, reikėtų nurodyti ištirtus palikuonius bei pateikti gyvūnų, turinčių vieną ar daugiau spėjamų somatinių mutacijų, skaičių. Paveiktų ir neigiamų kontrolinių grupių bandymų duomenys turėtų būti palyginti atitinkamais metodais. Duomenys pateikiami, atsižvelgiant į kiekvieną vadą.

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

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

— poravimui panaudoti kamienai,

— bandomoje bei kontrolinėse grupėse esančių vaikingų patelių skaičius,

— vidutinis vados dydis bandomojoje bei kontrolinėje grupėse gimimo bei atjunkymo metu,

— bandomosios cheminės medžiagos dozės,

— metodas, kuriuo nustatoma, kad suporavimas įvyko,

— panaudotas tirpiklis, – gestacijos diena, kurią buvo pradėtas veikimas bandomąja medžiaga,

— veikimo būdas,

— absoliutus įvertintų palikuonių ir bandomojoje bei kontrolinėje grupėse esančių BVPT, SMT ir SPT skaičius,

— pagrindinės morfologinės anomalijos,

— jei įmanoma, dozės ir atsako sąsaja SPT bandymo atveju,

— 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.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 gimininges 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 triglicerido, 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 gimininigas 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 gimininigų 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

▼M4

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.

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]
Limfmazgiai (labiausiai nutolę nuo infekcijos vartų)	Trachėja (ne mažiau kaip du lygiai, iš kurių vienas – išilginis keteros pjūvis, ir vienas – skersinis pjūvis
Pieno liauka (patelių)	[Šlapimtakis]
Raumuo (šlaunies)	[Šlaplė]
Nosiaryklės audiniai (ne mažiau keturių lygių; į vieną lygį įtraukiant nosiaryklės latakus ir nosies limfinius audinius (NLA))	Šlapimo pūslė
	Gimda
	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., gimininogos 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 tinka įprastas laboratorijose naudojamas pašaras, neribojant geriamojo vandens kiekio. Šėrimo režimas turėtų atitikti visus bandomųjų gyvūnų

▼M4

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 (kaip aprašyta 22 skirsnyje) ir vienalaikės kontrolės grupėje,

▼M4

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,

▼M4

kad 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 gimininguų 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.

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.

▼C1

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

▼M4

būdui naudojamas nešiklis neturėtų gadinti kraujo arba jo apytakos. Jeigu 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.

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 gimiringas 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 (viduriņ-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 gimiringas 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 κΩ 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 κΩ 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 κΩ, 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 κΩ 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/nesurištam 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 nesurištas 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 × $l0^4$, 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.

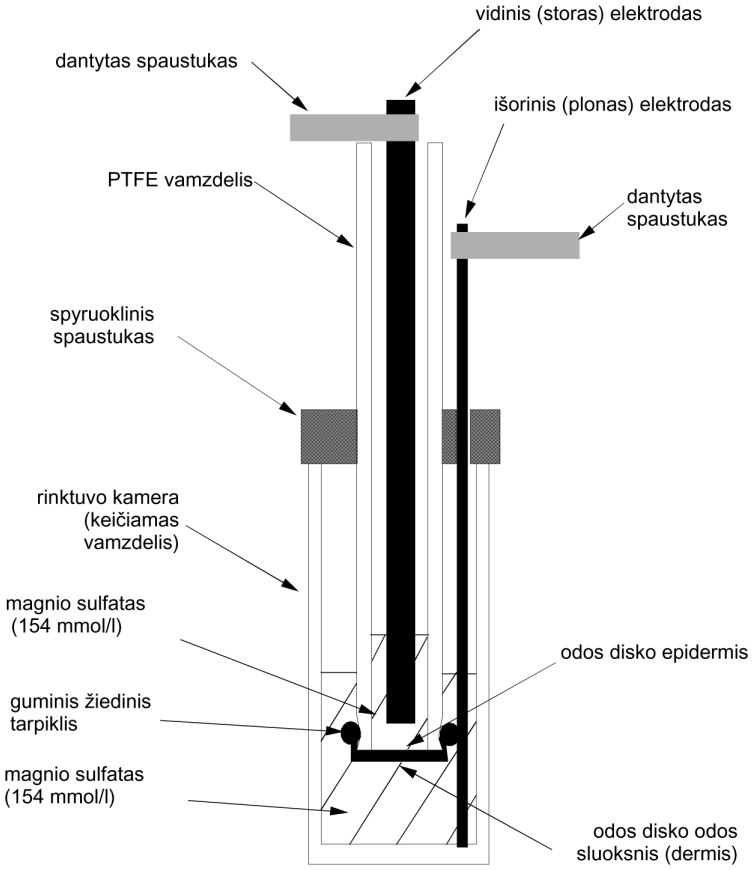
15) Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, h.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. Fd. Chem. Toxicol. 35, p. 845–852.

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

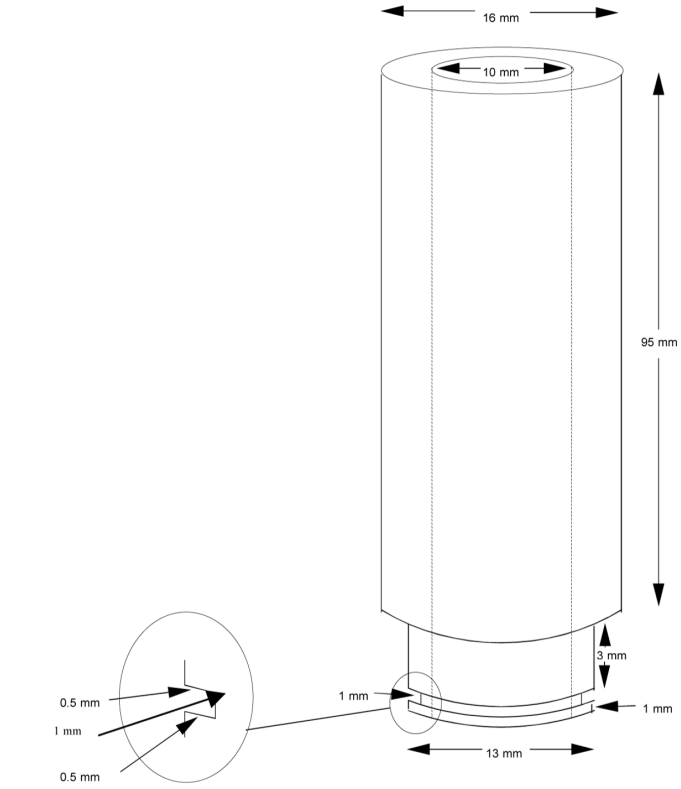
Žiurkių odos OSEV bandymo aparatas

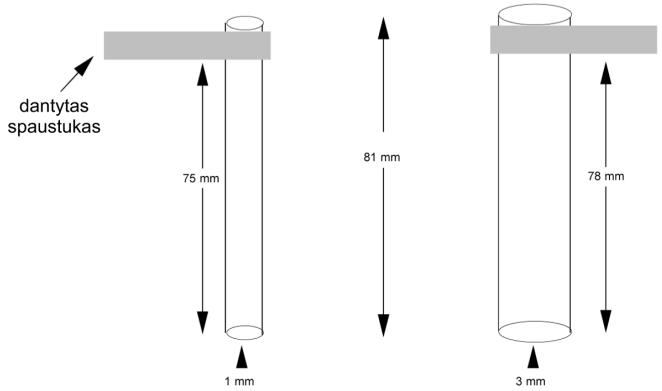


▼C1

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 FOTOTOKSIŠKUMO *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

$$t(\text{min}) = \left(\frac{(\text{švitinimo dozė } (J / (cm)^2) \times 1\,000)}{(\text{energinė apšvieta } (mW / (cm)^2) \times 60)} \right) (1\ J = 1W \times s)$$

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 1×10^5 ląstelių/ml kultivavimo terpės (= 1×10^4 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. $PE_C = RE_C$ x DE_C. Atsako efektas RE_C yra atsakų, nustatomų tamsoje ir veikiant šviesa, skirtumas, t. y. $RE_C = R_C$ (-Irr) – R_C (+ 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 (-Irr), dozės efektas prilyginamas 1. Svoriniai faktoriai w_i nustatomi pagal didžiausią atsako vertę, t. y. $W_i = MAX\{R_i (+ Irr), R_i (-Irr)\}$. 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.

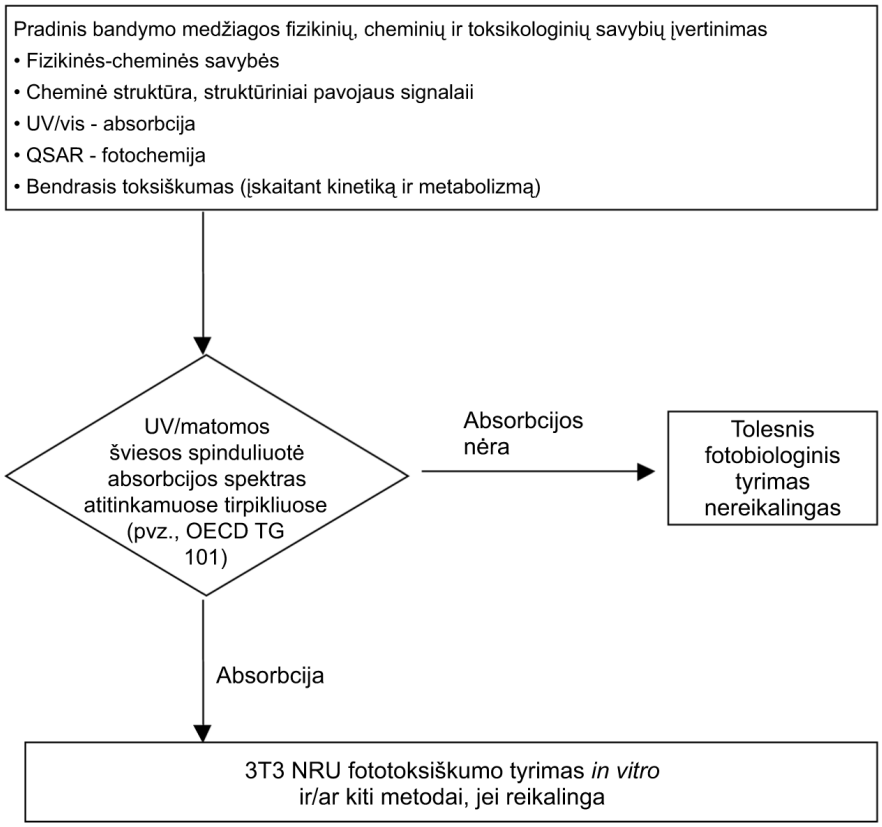
20) Holzhūtter, h.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, p. 445–462.

21) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_l_l_l_l,00. html

▼C1

1 PRIEDĖLIS

3T3 NRU fototoksiškumo bandymo svarba, taikant nuoseklųjį metodą cheminių medžiagų fototoksiškumui tirti

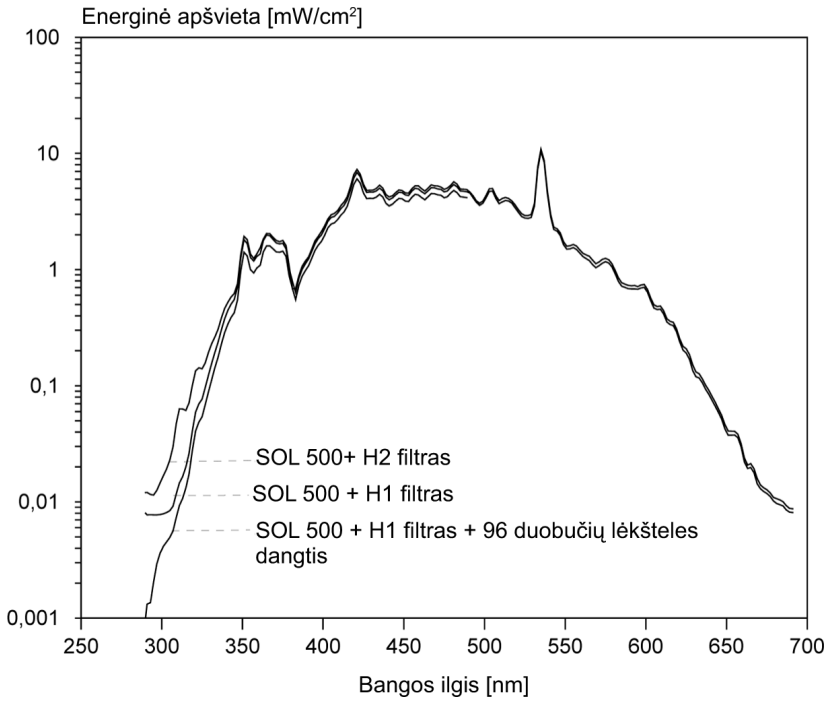


▼C1

2 PRIEDĖLIS

1 paveikslas

Filtruoto saulės šviesos imitatoriaus spektrinės galios skirstinys



(žr. 1.4.1.5.1 skirsnio antrąją pastraipą)

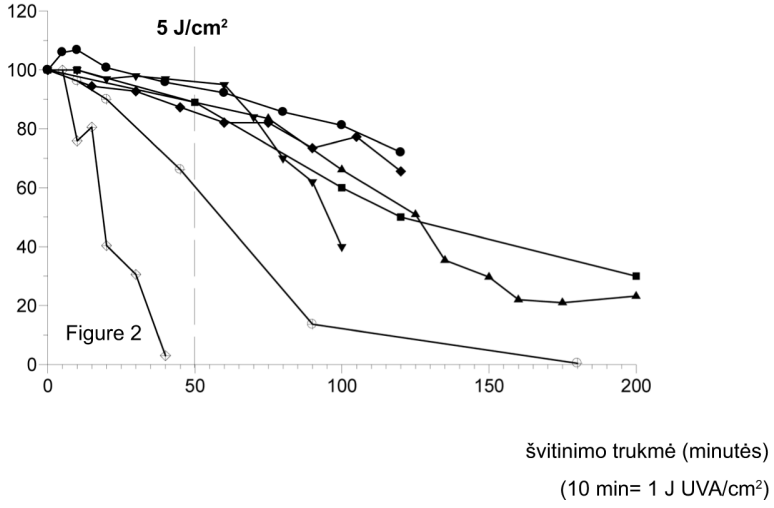
1 paveiksle pateiktas filtruoto saulės šviesos imitatoriaus priimtino spektrinės energinės apšvietos skirstinio pavyzdys. Jis yra gautas metalų halogenidais legiruotam šaltiniui, naudojamam 3T3 NRU fototoksiškumo bandymo tinkamumo patvirtinimo tyrime (6) (8) (17). Parodyta dviejų skirtingų filtrų ir 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 medžiagą. Tokia informacija apima bandomosios

▼M3

medžiagos 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 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 turi sukelti teigiamą LLNA atsaką esant tokiam poveikio lygiui, kad SI padidėtų iki daugiau kaip 3, palyginti su neigiamo poveikio kontrolinės

▼M3

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 bandomaja 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 virškinamąjį 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 virškinamąjį 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 gimininges 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, kliniciniam 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 µl/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.

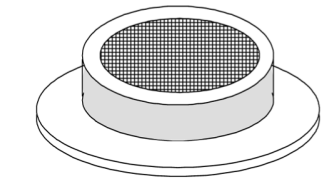
8) Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic*. 28, p. 369–373.

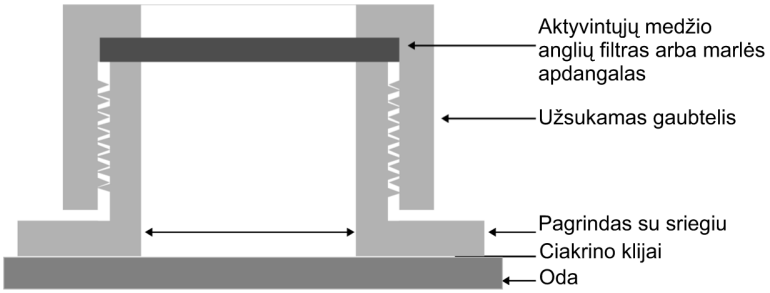
9) Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol*. 54, p. 399–404.

▼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 odą, 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

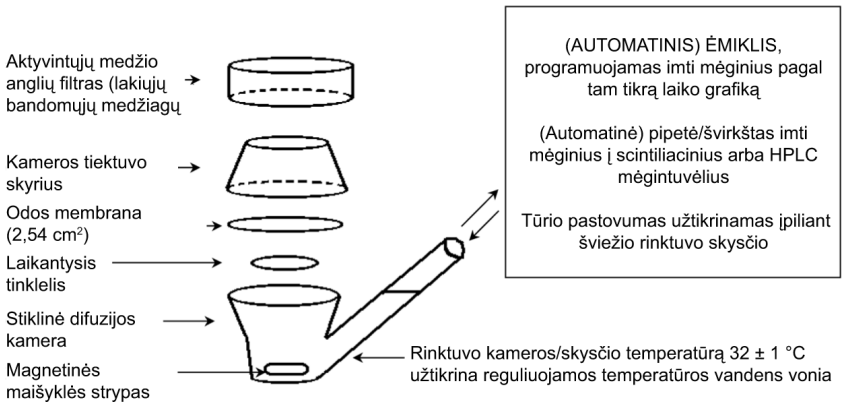
11) Schaefer h and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

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 gyvybingą 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 chemines 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

([1]) OL L 225, 2001 8 21, p. 1.

▼M3

ženklinimui 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 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

▼M3

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.*) (3)
1-dekanolis (2)	*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 (2)	*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).

▼M2

B.47. **GALVIJŲ RAGENOS PADRUMSTĖJIMO IR PRALAIDUMO BANDYMO METODAS AKIS ĖSDINANČIOMS IR STIPRIAI DIRGINANČIOMS MEDŽIAGOMS NUSTATYTI**

ĮVADAS

1. Galvijų ragenos padrumstėjimo ir pralaidumo (angl. *Bovine Corneal Opacity and Permeability*, BCOP) bandymo metodas yra *in vitro* bandymo metodas, kurį tam tikromis aplinkybėmis ir su tam tikrais apribojimais galima taikyti chemines medžiagas ir mišinius klasifikuojant kaip „akis ėsdinančias ir stipriai dirginančias medžiagas“ (1) (2) (3). Pagal šį bandymų metodą stipriai dirginančios medžiagos apibrėžiamos kaip medžiagos, sukeliančios akių pažeidimus, kurie triušiui nepraeina per 21 dieną po paveikimo ta medžiaga. Nors BCOP bandymas nėra laikomas tinkamu visiškai pakeisti triušio akies *in vivo* bandymą, šį bandymą rekomenduojama atlikti kaip vieną iš pakopinės bandymo strategijos, taikomos reguliavimo tikslais klasifikuojant ir ženklinant tam tikroje srityje naudojamas medžiagas, sudedamųjų dalių (4) (5). Bandomąsias medžiagas ir mišinius (6) galima klasifikuoti kaip akis ėsdinančias arba stipriai dirginančias medžiagas neatliekant papildomų bandymų su triušiais. Cheminė medžiaga, kurios bandymo rezultatai neigiami, turėtų būti išbandyta su triušiais, taikant nuosekliąją bandymų metodiką, aprašytą OECD bandymų gairėse Nr. 405 (7) (šio priedo B.5 skyrius).

2. Šio bandymo metodo paskirtis – aprašyti procedūras, taikomas vertinant, ar bandomoji medžiaga gali sukelti ėsdinimą arba stiprų dirginimą, sprendžiant pagal jos gebėjimą sukelti izoliuotos galvijo ragenos padrumstėjimą arba didesnį pralaidumą. Toksinis poveikis ragenai vertinamas pagal: i) sumažėjusią šviesos skvarbą (padrumstėjimą) ir ii) padidėjusią fluoresceino natrio druskos dažiklio skvarbą (pralaidumą). Bandomąja medžiaga paveiktos ragenos padrumstėjimo ir pralaidumo vertinimo rezultatai susumuojami siekiant apskaičiuoti *in vitro* dirginimo skaitinę vertę (angl. *In Vitro Irritancy Score*, IVIS), kuri naudojama klasifikuojant bandomosios medžiagos dirginimo lygį.

3. Akis dirginančios medžiagos, sukeliančios akių pažeidimus, kurie praeina mažiau kaip per 21 dieną, ir akių nedirginančios medžiagos taip pat buvo išbandytos taikant BCOP bandymo metodą. Tačiau BCOP bandymo metodo tikslumas ir patikimumas bandant šių kategorijų chemines medžiagas nėra oficialiai įvertintas.

4. Apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI SVARSTYMAI IR APRIBOJIMAI

5. Šis bandymo metodas pagrįstas Alternatyvių metodų patvirtinimo tarpžinybinio koordinavimo komiteto (angl. *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, ICCVAM) BCOP bandymo metodo protokolu (8), parengtu atlikus tarptautinį patvirtinimo tyrimą (4) (5) (9), padedant Europos alternatyvių metodų patvirtinimo centrui (angl. *European Centre for the Validation of Alternative Methods*, ECVAM) bei Japonijos alternatyvių metodų patvirtinimo centrui (angl. *Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods*, JaCVAM). Šis protokolas parengtas remiantis informacija, gauta iš In vitro bandymų metodų instituto (angl. *Institute for In Vitro Sciences*, IIVS) ir iš INVITTOX protokolo Nr. 124 (10), kuris buvo naudojamas 1997–1998 m. atliekant Europos bendrijos finansuotą BCOP bandymo metodo preliminaraus patvirtinimo tyrimą. Abu šie protokolai parengti remiantis BCOP bandymo metodika, kurią pirmasis aprašė Gautheron *et al.* (11).

▼M2

6. Nustatyti šio metodo apribojimai susiję su didele klaidingai teigiamų rezultatų dalimi alkoholių bei ketonų atveju ir didele klaidingai neigiamų rezultatų dalimi kietųjų medžiagų atveju, kaip nurodyta patvirtinimo duomenų bazėje (žr. 44 skirsnį) (5). Iš duomenų bazės pašalinus šių cheminių ir fizikinių kategorijų chemines medžiagas, BCOP bandymo metodo tikslumas pagal ES, EPA ir GHS klasifikavimo sistemas iš esmės pagerėjo (5). Remiantis šių bandymų tikslu (t. y. tiktai nustatyti akis ėsdinančias ir (arba) stipriai dirginančias medžiagas), klaidingi neigiami rezultatai neturi lemiamos reikšmės, nes šios cheminės medžiagos vėliau bus išbandytos su triušiais arba taikant kitus deramai patvirtintus *in vitro* bandymus, atsižvelgiant į reguliavimo reikalavimus ir taikant nuosekliąją bandymo metodiką pagal įrodomosios duomenų galios metodą. Be to, naudojant dabartinę patvirtinimo duomenų bazę negalima deramai įvertinti tam tikrų klasių cheminių medžiagų arba produktų (pvz., mišinių). Tačiau tyrėjai galėtų apsvarstyti šio bandymo metodo taikymo visų tipų bandomosioms medžiagoms (įskaitant mišinius) galimybes, kai teigiamas rezultatas galėtų būti priimtas kaip orientacinis akių ėsdinimo arba stipraus dirginimo atsakas. Tačiau teigiami rezultatai, gauti bandant alkoholius arba ketonus, turėtų būti aiškinami atsargiai, vengiant nepagrįstų prognozių.

7. 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 (12).

8. Šio bandymo metodo apribojimas yra tas, kad, nors pagal jį ir atsižvelgiama į tam tikrą poveikį akims, vertinamą pagal triušio akių dirginimo bandymo metodą, ir iš dalies į to poveikio lygį, pagal šį metodą neatsižvelgiama į akies junginės ir rainelės pažeidimus. Be to, nors pagal BCOP bandymo metodą ir negalima įvertinti ragenos pažeidimų grįžtamumo *per se*, pasiūlyta, remiantis triušio akių tyrimais, pagal pradinį ragenos pažeidimų gylio vertinimą nustatyti, ar poveikis negrįžtamas, ar grįžtamas (13). Galiausiai pagal BCOP bandymo metodą negalima įvertinti galimo sisteminio toksiškumo, susijusio su poveikiu akims.

9. Toliau dedamos pastangos siekiant geriau apibūdinti BCOP bandymo metodo naudingumą ir apribojimus, jį naudojant silpnai dirginančioms ir nedirginančioms medžiagoms nustatyti (taip pat žr. 45 skirsnį). Be to, naudotojai kviečiami teikti patvirtinimo organizacijoms pavyzdžius ir (arba) duomenis, kuriais remiantis būtų galima oficialiai įvertinti galimą būsimą BCOP bandymo metodo paskirtį, įskaitant silpnai dirginančių medžiagų ir nedirginančių medžiagų nustatymą.

10. Kiekviena laboratorija, pradedanti taikyti šį bandymo metodą, turėtų naudoti 2 priedėlyje nurodytas patikros chemines medžiagas (angl. *proficiency substances*). Laboratorija gali naudoti šias chemines medžiagas norėdama įrodyti savo techninę kompetenciją taikyti BCOP bandymo metodą, prieš pateikdama BCOP bandymo duomenis teisės aktuose numatytais pavojų klasifikavimo tikslais.

BANDYMO PRINCIPAS

11. 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 medžiagos sukeltas pažeidimas nustatomas kiekybiškai įvertinant ragenos padrumstėjimo ir pralaidumo pokyčius, atitinkamai naudojant drumsties matuoklį (angl. *opacitometer*) ir regimosios šviesos spektrofotometrą. Abu matavimai atliekami siekiant apskaičiuoti IVIS, kuri naudojama *in vitro* dirginimo pavojaus kategorijai nustatyti, kad būtų galima prognozuoti bandomosios medžiagos gebą dirginti akis *in vivo* (žr. „Sprendimo kriterijai“).

▼M2

12. Pagal BCOP bandymo metodą naudojamos izoliuotos ragenos, paimtos iš ką tik paskerstų galvijų akių. Ragenos padrumstėjimas kiekybiškai įvertinamas matuojant ragenos praleidžiamą šviesos kiekį. Ragenos pralaidumas kiekybiškai įvertinamas kaip fluoresceino natrio druskos dažiklio kiekis, prasiskverbęs per visą ragenos storį, matuojant užpakalinės kameros terpėje. Bandomosios medžiagos uždedamos ant ragenos epitelio paviršiaus jos įdedant į ragenos laikiklio priekinę kamerą. 3 priedėlyje pateiktas ragenos laikiklio, naudojamo atliekant BCOP bandymą, aprašas ir schema. Ragenų laikiklių galima įsigyti iš įvairių komercinių šaltinių arba pasidaryti.

Galvijų akių šaltinis bei amžius ir gyvūnų rūšies pasirinkimas

13. Į skerdyklas atvežti galvijai paprastai paskerdžiami vartoti žmonėms arba kitais komerciniais tikslais. Kaip BCOP bandymams skirtų ragenų šaltinis gali būti naudojami tik sveiki gyvūnai, kurie laikomi tinkamais naudoti žmonių maisto grandinėje. Kadangi galvijų svorio intervalas gana didelis ir priklauso nuo veislės, amžiaus bei lyties, rekomenduojamo skerdžiamo gyvūno svorio nenustatyta.

14. Ragenų dydžiai gali skirtis dėl gyvūnų amžiaus skirtumo. Ragenos, kurių horizontalus skersmuo didesnis kaip 30,5 mm, o ragenos storis per vidurį ne mažesnis kaip 1 100 μm, paprastai gaunamos iš senesnių kaip aštuonerių metų galvijų, o ragenos, kurių horizontalus skersmuo mažesnis kaip 28,5 mm, o ragenos storis per vidurį mažesnis kaip 900 μm, paprastai gaunamos iš jaunesnių kaip penkerių metų galvijų (14). Dėl šios priežasties senesnių kaip 60 mėnesių galvijų akys paprastai nenaudojamos. Galvijų, kurių amžius mažesnis kaip 12 mėnesių, akys paprastai nebūdavo naudojamos, nes jos dar nevisiškai išsivysčiusios, ir jų ragenos storis bei skersmuo yra gerokai mažesni nei suaugusių galvijų. Tačiau jaunų gyvūnų (t. y. 6–12 mėnesių) ragenas naudoti leidžiama, nes jų naudojimas teikia tam tikrų pranašumų, pvz., jų lengviau gauti, amžiaus intervalas yra nedidelis ir darbuotojams kyla mažiau pavojų, susijusių su galvijų spongiforminės encefalopatijos poveikiu (15). Kadangi būtų naudinga geriau įvertinti ragenos dydžio arba storio sąryšį su ėsdinančių ir dirginančių medžiagų poveikiu, naudotojai kviečiami teikti duomenis apie apytikslį gyvūnų, iš kurių gautos per tyrimą naudotos ragenos, amžių ir (arba) svorį.

Akių rinkimas ir gabenimas į laboratoriją

15. Akis surenka skerdyklų darbuotojai. Kad mechaninis ir kitoks akių pažeidimas būtų kuo mažesnis, gyvūną paskerdus, akys turi būti išimamos kuo greičiau. Kad ant akių nepatektų galinčių dirginti cheminių medžiagų, skerdyklų darbuotojai turėtų nenaudoti valiklių gyvūno galvai nuplauti.

16. Akys turi būti visiškai panardintos į Hankso subalansuotą druskos tirpalą (angl. *Hanks' Balanced Salt Solution*, HBSS), supiltą į tinkamo dydžio talpyklą, ir vežamos į laboratoriją taip, kad būtų kuo mažiau pažeistos ir (arba) užkrėstos bakterijomis. Kadangi akys renkamos skerdžiant gyvūnus, jos gali būti išteptos krauju ir kitomis biologinėmis medžiagomis, įskaitant bakterijas ir kitus mikroorganizmus. Todėl svarbu užtikrinti, kad užteršimo pavojus būtų kuo mažesnis (pvz., laikant indą su akimis ant drėgno ledo, į HBSS, naudojamą vežant akis, įdedant antibiotikų [pvz., 100 IU/mL penicilino ir 100 μg/mL streptomicino]).

▼M2

17. Laikotarpis nuo akių surinkimo iki ragenų panaudojimo per BCOP bandymą turėtų būti kuo mažesnis (paprastai renkama ir naudojama tą pačią dieną), ir turi būti įrodyta, kad šis laiko tarpas neturės neigiamos įtakos bandymo rezultatams. Šie rezultatai grindžiami akių atrankos kriterijais ir atsaku į teigiamas bei neigiamas kontrolines medžiagas. Visos akys, naudojamos atliekant bandymą, turėtų būti iš to paties tam tikrą dieną surinktos akių rinkinio.

BCOP bandymui skirtų akių atrankos kriterijai

18. Akis atvežus į laboratoriją, atidžiai apžiūrima, ar jos neturi trūkumų, įskaitant padidėjusį drumstumą, įbrėžimus ir neovaskuliarizaciją. Turėtų būti naudojamos tik tokių trūkumų neturinčių akių ragenos.

19. Be to, vėliau, per tam tikrus bandymo etapus, įvertinama kiekvienos ragenos kokybė. Ragenos, kurių padrumstėjimas po pradinio vienos valandos trukmės kalibravimo laikotarpio yra didesnė kaip septyni drumsties vienetai, atmetamos (PASTABA: drumsties matuoklis turėtų būti kalibruotas pagal standartus, taikomus drumsties vienetams nustatyti, žr. 3 priedėlį).

20. Kiekviena apdorojamų (bandomąja medžiaga, kartu naudojamomis neigiamomis ir teigiamomis kontrolinėmis medžiagomis) mėginių grupė turi būti sudaryta ne mažiau kaip iš trijų akių. Atliekant BCOP bandymą trys ragenos turėtų būti apdorojamos neigiamomis kontrolinėmis medžiagomis. Kadangi visos ragenos yra išimamos iš viso akies obuolio ir įdedamos į ragenų kameras, gali likti šių žmogaus veiksmų padarinių, kurie turės įtakos kai kurių ragenų padrumstėjimo ir pralaidumo vertėms (atsižvelgiant į neigiamas kontrolines medžiagas). Be to, padrumstėjimo ir pralaidumo vertės, gautos naudojant neigiamas kontrolines grupes, naudojamos bandomosios medžiagos ir teigiamos kontrolinės grupės padrumstėjimo ir pralaidumo vertėms, naudojamoms apskaičiuojant IVIS vertes, pakoreguoti.

EIGA

Akių paruošimas

21. Trūkumų neturinčios ragenos, stengiantis nepažeisti ragenos epitelio ir endotelio, išpjaunamos su 2–3 mm pločio skleros apvadu, kuris paliekamas tam, kad vėliau būtų patogiau paimti rageną. Izoliuotos ragenos įdedamos į specialius ragenų laikiklius, sudarytus iš priekinių ir užpakalinių kamerų, kurios liečiasi su atitinkamai ragenos epitelio ir endotelio paviršiumi. Abi kameros iki viršaus pripildomos pašildyta Eagle'o minimalia pagrindine terpe (angl. *Eagle's Minimum Essential Medium*, EMEM) (pirmiau užpakalinė kamera) taip, kad nesusidarytų burbulų. Tada ne trumpiau kaip vieną valandą palaikoma 32 ± 1 °C įtaiso temperatūra, kad susilygintų ragenų bei terpės temperatūra ir, kiek tai įmanoma, būtų pasiektas normalus medžiagų apykaitos aktyvumas (apytikslė ragenos paviršiaus temperatūra *in vivo* yra 32 °C).

22. Po temperatūros nusistovėjimo laikotarpio, abi kameros pripildomos naujos pašildytos EMEM, ir registruojami pamatiniai kiekvienos ragenos padrumstėjimo rodmenys. Visos ragenos, turinčios makroskopinių audinio pažeidimų (pvz., įbrėžimų, pigmento sankaupų, neovaskuliarizacijos požymių) arba kurių drumstis yra didesnė kaip septyni drumsties vienetai, atmetamos. Apskaičiuojama visų stabilios būsenos ragenų drumsties vidutinė vertė. Ne mažiau kaip trys ragenos, kurių drumsties vertės yra artimos vidutinei visų ragenų drumsties vertei, pasirenkamos kaip neigiama (arba tirpiklio) kontrolinė mėginių grupė. Likusios ragenos padalijamos į bandomąją grupę ir teigiamą kontrolinę grupę.

▼M2

23. Kadangi vandens šiluminė talpa didesnė už oro, vanduo užtikrina stabilesnę inkubacinę temperatūrą. Todėl ragenos laikiklį ir jo turinį rekomenduojama laikyti vandens vonioje, kurioje būtų palaikoma 32 ± 1 °C temperatūra. Tačiau gali būti naudojami ir oro inkubatoriai, jeigu bus imtasi priemonių vienodai temperatūrai palaikyti (pvz., iš anksto pašildant laikiklius ir terpę).

Bandomosios medžiagos uždėjimas

24. Taikomi du skirtingi apdorojimo protokolai: vienas – skysčiams ir paviršinio aktyvumo medžiagoms (kietosioms medžiagoms arba skysčiams), kitas – kietosioms ne paviršinio aktyvumo medžiagoms.

25. Skysčiai bandomi neskiesti, o paviršinio aktyvumo medžiagos – naudojant 10 proc. koncentracijos tirpalą (pagal masę), medžiagą ištirpinant 0,9 % natrio chlorido tirpale, distiliuotame vandenyje arba kitame tirpiklyje, kuris, kaip buvo įrodyta, neturi neigiamo poveikio bandymo sistemai. Pusiau kietosios medžiagos, tepalai ir vaškai paprastai bandomi kaip skysčiai. Jeigu naudojama kitokia skiedimo koncentracija, tai turi būti deramai pagrįsta. Ragenos veikiamos skysčiais ir paviršinio aktyvumo medžiagomis 10 minučių. Jeigu taikoma kitokia poveikio trukmė, tai turi būti tinkamai moksliškai pagrįsta.

26. Nepaviršinio aktyvumo medžiagos paprastai bandomos naudojant 20 proc. koncentracijos tirpalus arba suspensijas, pagamintus medžiagą ištirpinus 0,9 % natrio chlorido tirpale, distiliuotame vandenyje arba kitame tirpiklyje, kuris, kaip buvo įrodyta, neturi neigiamo poveikio bandymo sistemai. Tam tikromis aplinkybėmis ir pateikus deramą mokslinį pagrindimą, kietosios medžiagos taip pat gali būti bandomos neatskiestos, jas tiesiogiai uždedant ant ragenos paviršiaus, taikant atviros kameros metodą (žr. 29 skirsnį). Ragenos veikiamos kietosiomis medžiagomis keturias valandas, tačiau skysčių ir aktyviųjų paviršiaus medžiagų atveju gali būti taikoma kitokia poveikio trukmė, pateikiant tinkamą mokslinį pagrindimą.

27. Atsižvelgiant į bandomosios medžiagos fizikines ir chemines savybes (pvz., ar tai kietoji medžiaga, ar klampus arba neklampus skystis), galima taikyti įvairius apdorojimo būdus. Pagrindinis kriterijus – užtikrinti, kad bandomoji medžiaga tinkamai padengtų epitelio paviršių ir kad ji būtų gerai nuvalyta per plovimo etapus. Neklampiems ir mažai klampiems skysčiams paprastai taikomas uždaros kameros metodas, o pusiau klampioms bei klampioms skystoms bandomosioms medžiagoms ir neatskiestoms kietosioms medžiagoms – atviros kameros metodas.

28. Pagal uždaros kameros metodą bandomosios medžiagos kiekis, kurio pakanka ragenos epitelio paviršiui padengti (750 µL), įdedamas į priekinę kamerą per dozavimo angas, esančias viršutiniame kameros paviršiuje; veikimo laikotarpiui kameros angos uždaromos. Svarbu užtikrinti, kad kiekviena ragena būtų veikiama bandomąja medžiaga tinkamą laiko tarpą.

29. Pagal atviros kameros metodą prieš apdorojimą iš priekinės kameros išimamas lango užrakto žiedas ir stiklinis langas. Kontrolinė arba bandomoji medžiaga (750 µL arba toks bandomosios medžiagos kiekis, kurio pakaktų visai ragenai padengti) tiesiogiai uždedama ant ragenos epitelio paviršiaus naudojant mikropipetę. Jeigu bandomąją medžiagą sunku įtraukti į pipetę, bandomoji medžiaga gali būti spaudimo būdu įstumiama į stūmoklinę pipetę, naudojamą dozuojant. Stūmoklinės pipetės galas įkišamas į švirkšto dozavimo galiuką taip, kad cheminę medžiagą spaudimo būdu būti galima įšvirkšti į stūmoklinės pipetės galiuką. Švirkšto stūmoklis stumiamas, tuo pat metu pipetės stūmoklį traukiant į viršų. Jeigu pipetės galiuke atsiranda oro burbuliukų, bandomoji medžiaga pašalinama (išstumiama), ir procedūra kartojama tol, kol galiukas užpildomas be oro burbuliukų. Prireikus gali būti naudojamas įprastas švirkštas (be adatos), kadangi jį naudojant galima tiksliai išmatuoti bandomosios medžiagos kiekį ir lengviau padengti ragenos epitelio paviršių. Baigus dozuoti, stiklinis langas įdedamas atgal į priekinę kamerą, taip vėl atkuriant uždarą sistemą.

▼M2

Inkubacija pasibaigus veikimui medžiaga

30. Pasibaigus veikimo laikotarpiui, bandomoji medžiaga, neigiama kontrolinė medžiaga arba teigiama kontrolinė medžiaga pašalinama iš priekinės kameros, epitelis nuplaunamas ne mažiau kaip tris kartus (arba kol nelieka matomų bandomosios medžiagos žymių) naudojant EMEM (kurios sudėtyje yra raudonojo fenolio). Nuplovimui naudojama terpė, kurios sudėtyje yra raudonojo fenolio, nes taip galima stebėti raudonojo fenolio spalvos pokytį ir nustatyti rūgštinių arba šarminių medžiagų nuplovimo veiksmingumą. Jeigu raudonasis fenolis vis dar praranda spalvą (yra geltonas arba purpurinis) arba jeigu bandomoji medžiaga yra vis dar matoma, ragenos plaunamos daugiau kaip tris kartus. Iš terpės pašalinus bandomąją medžiagą, ragenos paskutinį kartą nuplaunamos naudojant EMEM (be raudonojo fenolio). EMEM (be raudonojo fenolio) paskutiniam plovimui naudojama tam, kad prieš drumsties matavimą raudonasis fenolis tikrai būtų pašalintas iš priekinės kameros. Tada priekinė kamera iš naujo pripildoma nauja EMEM be raudonojo fenolio.

31. Jeigu bandymas atliekamas naudojant skysčius arba paviršinio aktyvumo medžiagas, nuplautos ragenos dar dvi valandas laikomos 32 ± 1 °C temperatūroje. Tam tikrais atvejais ragenas gali būti naudinga palaikyti ir ilgiau nei dvi valandas po veikimo bandomąja medžiaga; dėl to sprendžiama kiekvienu konkrečiu atveju. Ragenos, kurios buvo veikiamos kietosiomis medžiagomis, pasibaigus keturių valandų veikimo laikotarpiui kruopščiai nuplaunamos, bet papildomai inkubuoti jų nereikia.

32. Pasibaigus inkubacijos laikotarpiui, jeigu bandymai atliekami su skysčiais ir paviršinio aktyvumo medžiagomis, ir pasibaigus keturių valandų veikimo laikotarpiui, jeigu bandymai atliekami su kietosiomis nepaviršinio aktyvumo medžiagomis, registruojamas kiekvienos ragenos padrumstėjimas ir pralaidumas. Be to, kiekviena ragena apžiūrima vizualiai ir registruojamos susijusios pastabos (pvz., audinio nusilupimas, bandomosios medžiagos likučiai, nevienodas padrumstėjimas). Šios pastabos gali būti svarbios, nes jos gali būti susijusios su drumsties matuoklio rodmenų svyravimais.

Kontrolinės medžiagos

33. Per kiekvieną bandymą kartu naudojamos neigiamos kontrolinės medžiagos arba tirpiklis (nešiklis) bei teigiamos kontrolinės medžiagos.

34. Kai bandoma 100 % grynumo skysta cheminė medžiaga, pagal BCOP bandymo metodą kartu naudojama neigiama kontrolinė medžiaga (pvz., 0,9 % natrio chlorido tirpalas arba distiliuotas vanduo), kad bandymo sistemoje būtų galima aptikti netipinius pokyčius ir gauti pamatinius duomenis, kuriais remiantis būtų galima įvertinti bandymo rezultatus. Be to, taip užtikrinama, kad bandymo sąlygos neturėtų netinkamos įtakos atsakui į dirginimą.

35. Kai bandoma atskiesta skysta, paviršinio aktyvumo arba kietoji cheminė medžiaga, pagal BCOP bandymo metodą tuo pat metu išbandoma tirpiklio (nešiklio) kontrolinė mėginių grupė, kad bandymo sistemoje būtų galima aptikti netipinius pokyčius ir gauti pamatinius duomenis, kuriais remiantis būtų galima įvertinti bandymo rezultatus. Galima naudoti tik tokius tirpiklius (nešiklius), kurie, kaip buvo įrodyta, neturi neigiamos įtakos bandymo sistemai.

36. Norint patikrinti, ar sukeliamas tinkamas atsakas, per kiekvieną bandymą tuo pat metu patikrinama teigiama kontrolinė medžiaga, kuri yra žinoma kaip akis dirginanti medžiaga. Kadangi pagal šį bandymo metodą BCOP bandymas atliekamas siekiant nustatyti ėsdinančias arba stipriai dirginančias medžiagas, geriausia kaip teigiamą kontrolinę medžiagą naudoti etaloninę cheminę medžiagą (angl. *reference substance*), kuri naudojama pagal šį bandymo metodą sukelia stiprų atsaką. Tačiau norint užtikrinti galimybę įvertinti atsako į teigiamą kontrolinę medžiagą kaitą per tam tikrą laiką, dirginamasis poveikis neturėtų būti pernelyg stiprus.

37. Pavyzdžiui, bandant skystas medžiagas tinkamos naudoti teigiamos kontrolinės medžiagos yra dimetilformamidas arba 1 % natrio hidroksidas. Bandant kietas medžiagas tinkamos naudoti teigiamos kontrolinės medžiagos pavyzdys yra 20 % (m/t) imidazolis 0,9 % natrio chlorido tirpale.

▼M2

38. Lyginamosios cheminės medžiagos (angl. *benchmark substances*) yra naudingos norint įvertinti tam tikrai cheminių medžiagų arba produktų kategorijai priskiriamų nežinomų cheminių medžiagų akių dirginimo potencialą arba santykinį akis dirginančios medžiagos dirginimo potencialą tam tikrame atsako į dirginimą intervale.

Išmatuoti rezultatai

39. Padrumstėjimas nustatomas pagal ragenos praleidžiamą šviesos kiekį. Ragenos padrumstėjimas kiekybiškai vertinamas naudojant drumsties matuoklį, kuriuo gaunamos drumsties vertės tolydžioje skalėje.

40. 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, įpilama 1 mL fluoresceino natrio druskos tirpalo (4 arba 5 mg/mL, kai atitinkamai bandomos skystos ir paviršinio aktyvumo medžiagos arba nepaviršinio aktyvumo medžiagos), o į užpakalinę kamerą, kuri liečiasi su ragenos endotelio paviršiumi, pripilama naujos EMEM. Tada laikiklis horizontalioje padėtyje 90 ± 5 min. laikomas 32 ± 1 °C temperatūroje. Naudojant UV/VIS spektrofotometrijos metodiką, išmatuojamas fluoresceino natrio druskos, prasiskverbusios į užpakalinę kamerą, kiekis. Spektrofotometrinio matavimo duomenys, gauti naudojant 490 nm ilgio bangas, registruojami kaip optinio tankio (OD_{490}) arba sugerties vertės, išmatuotos tolydžioje skalėje. Fluoresceino pralaidumo vertės nustatomos kaip OD_{490} vertės, išmatuotos regimosios šviesos spektrofotometru, taikant standartinį 1 cm storio sluoksnį.

41. Arba galima naudoti 96 duobučių mikrotitravimo lėkštelės skaitytuvą, jeigu: i) galima nustatyti lėkštelės skaitytuvo, skirto fluoresceino OD_{490} vertėms nustatyti, tiesinį intervalą ir ii) 96 duobučių plokštelėje, naudojamoje OD_{490} vertėms, atitinkančioms standartinį 1 cm storio sluoksnį, nustatyti, naudojamas tinkamas fluoresceino mėginių kiekis (tam gali reikėti pilnai pripildyti duobutę [įprastas kiekis – 360µL]).

DUOMENYS IR JŲ TEIKIMAS

Duomenų vertinimas

42. Padrumstėjimo ir vidutinio pralaidumo (OD_{490}) vertes pakoregavus atsižvelgiant į normalios drumsties ir neigiamos kontrolinės medžiagos pralaidumo OD_{490} vertes, kiekvienos apdorotų mėginių grupės vidutinės padrumstėjimo ir pralaidumo OD_{490} vertės turi būti įrašytos į empiriniu būdu gautą formulę, skirtą kiekvienos apdorotų mėginių grupės *in vitro* dirginimo skaitinei vertei (IVIS) apskaičiuoti:

IVIS = vidutinė padrumstėjimo vertė + (15 × vidutinė pralaidumo OD_{490} vertė).

Sina *et al.* (16) nurodė, kad ši formulė buvo gauta atliekant vidaus ir tarplaboratorinius tyrimus. Buvo atlikta duomenų, gautų atlikus 36 junginių serijos tyrimą daugelyje laboratorijų, daugiavariantė analizė, siekiant gauti geriausiai *in vivo* ir *in vitro* duomenis atitinkančią lygtį. Šią analizę atlikę dviejų skirtingų bendrovių mokslininkai gavo beveik tapačias lygtis.

43. Be to, padrumstėjimo ir pralaidumo vertės turėtų būti įvertintos atskirai, siekiant nustatyti, ar bandomoji medžiaga sukėlė ėsdinimą arba stiprų dirginimą vien dėl padrumstėjimo arba vien dėl pralaidumo rezultatų (žr. „Sprendimo kriterijai“).

▼M2

Sprendimo kriterijai

44. Cheminė medžiaga, kurios IVIS ne mažesnė kaip 55,1, laikoma ėsdinančia arba stipriai dirginančia medžiaga. Kaip nurodyta 1 skirsnyje, jeigu nenustatoma, kad cheminė medžiaga yra akis ėsdinanti arba stipriai dirginanti medžiaga, klasifikavimo ir ženklinimo tikslais turėtų būti atlikti papildomi bandymai. Lyginant su triušio akies *in vivo* bandymo metodo duomenimis, klasifikuojamais pagal EPA (1), ES (2) arba GHS (3) klasifikavimo sistemas, bendras BCOP bandymo metodo tikslumas – nuo 79 % (113/143) iki 81 % (119/147), klaidingai teigiamų rezultatų dalis – nuo 19 % (20/103) iki 21 % (22/103), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – nuo 16 % (7/43) iki 25 % (10/40). Iš duomenų bazės pašalinus tam tikrų cheminių (pvz., alkoholius, ketonus) arba fizikinių (pvz., kietąsias medžiagas) kategorijų chemines medžiagas, BCOP bandymo metodo tikslumas pagal ES, EPA ir GHS klasifikavimo sistemas yra nuo 87 % (72/83) iki 92 % (78/85), klaidingai teigiamų rezultatų dalis – nuo 12 %. (7/58) iki 16 % (9/56), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – nuo 0 % (0/27) iki 12 % (3/26).

45. Net jeigu bandomoji medžiaga nepriskiriama akis ėsdinančių arba stipriai dirginančių medžiagų kategorijai, BCOP bandymų duomenys, naudojami kartu su triušio akies *in vivo* bandymo arba deramai patvirtinto *in vitro* bandymo duomenimis, gali būti naudingi toliau vertinant BCOP bandymų, kuriais siekiama nustatyti silpnai dirginančias ir nedirginančias medžiagas, metodo naudingumą ir apribojimus (šiuo metu rengiamos toksiškumo akims *in vitro* bandymų metodų rekomendacinis dokumentas).

Tyrimo priimtinumo kriterijai

46. Tyrimas laikomas priimtinu, jeigu naudojant teigiamą kontrolinę medžiagą gauta IVIS neviršija dviejų dabartinio istorinio vidurkio, atnaujinamo ne rečiau kaip kartą per tris mėnesius arba, kai bandymai atliekami nedažnai (t. y. rečiau kaip kartą per mėnesį), kiekvieną kartą laboratorijose atlikus priimtiną bandymą, standartinių nuokrypių. Vertinant atsaką į neigiamą kontrolinę medžiagą arba tirpiklį (nešiklį) gautos padrumstėjimo ir pralaidumo vertės neturėtų viršyti nustatytų normalios drumsties ir pralaidumo verčių viršutinių ribų, nustatytų galvijų ragenoms, apdorotoms tinkama neigiama kontroline medžiaga arba tirpikliu (nešikliu).

Bandymo ataskaita

47. Bandymų ataskaitoje turėtų būti pateikta toliau nurodyta informacija, jeigu ji yra svarbi atlikto tyrimo atžvilgiu.

Bandomosios ir kontrolinės medžiagos

Cheminės medžiagos pavadinimas (-ai), pvz., Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos (angl. *Chemical Abstracts Service*, CAS) naudojamas struktūrinis pavadinimas ir kiti pavadinimai, jeigu jie žinomi;

CAS registracijos numeris (RN), jeigu jis žinomas;

cheminės medžiagos arba mišinio grynumas ir sudėtis (masės procentinėmis dalimis), kiek tai žinoma remiantis turima informacija;

tyrimui svarbios fizikinės ir cheminės savybės, pvz., fizinis būvis, lakumas, pH, stabilumas, cheminių junginių klasė, tirpumas vandenyje;

bandomosios ir (arba) kontrolinės cheminės medžiagos apdorojimas prieš bandymą, jeigu tai atliekama (pvz., pašildymas, sumalimas);

stabilumas, jeigu jis žinomas.

▼M2

Informacija apie rėmėją ir bandymų laboratoriją

Rėmėjo pavadinimas ir adresas, bandymų laboratorija ir tyrimo vadovas;

informacija apie akių šaltinį (t. y. vieta, kurioje buvo paimtos akys);

akių laikymo ir gabenimo sąlygos (pvz., akių paėmimo data ir laikas, laikotarpis iki bandymų pradžios, gabenimo terpė ir temperatūra, antibiotikai (jei jie naudoti));

jeigu yra informacijos, specifinės gyvūnų, iš kurių buvo paimtos akys, charakteristikos (pvz., gyvūno, kurio akys buvo paimtos, amžius, lytis, svoris).

Taikyto bandymo metodo ir protokolo pagrindimas

Bandymo metodo integralumas

Bandymo metodo integralumo (t. y. tikslumo ir patikimumo) užtikrinimo per tam tikrą laiką procedūra (pvz., periodiniai bandymai su patikros medžiagomis, istorinių duomenų apie neigiamas ir teigiamas kontrolines medžiagas naudojimas).

Bandymo priimtinumo kriterijai

Priimtini kartu naudojamų teigiamų ir neigiamų kontrolinių grupių verčių intervalai, atsižvelgiant į istorinius duomenis;

jeigu turima, priimtini kartu naudojamų lyginamųjų medžiagų kontrolinės grupės verčių intervalai, atsižvelgiant į istorinius duomenis.

Bandymo sąlygos

Taikytos bandymo sistemos aprašas;

naudoto ragenų laikiklio tipas;

prietaisų, naudotų matuojant padrumstėjimą ir pralaidumą (pvz., drumsties matuoklio ir spektrofotometro), kalibravimo informacija;

informacija apie naudotas galvijų ragenas, įskaitant informaciją apie jų kokybę;

išsami informacija apie taikytą bandymo metodą;

naudota (-os) bandomosios medžiagos koncentracija (-os);

bandymo metodo pakeitimų, jeigu jų buvo padaryta, aprašas;

informacija apie istorinius duomenis, gautus taikant šį modelį (pvz., neigiamos ir teigiamos kontrolinės medžiagos; patikros medžiagos, lyginamosios cheminės medžiagos);

taikytų vertinimo kriterijų aprašas.

Rezultatai

Atskirų mėginių duomenų lentelė (pvz., padrumstėjimo ir OD_{490} vertės, bandomajai medžiagai ir teigiamoms, neigiamoms bei lyginamosioms cheminėms medžiagoms [jeigu jos naudojamos] apskaičiuotos IVIS vertės, pateiktos lentelės pavidalu, jeigu taikytina, kartu pateikiant atliktų pakartotinių bandymų duomenis ir vidutines kiekvieno bandymo rezultatų vertes su standartiniais nuokrypiais);

kitų nustatytų poveikių apibūdinimas.

Aptarimas ir rezultatai

Išvada

LITERATŪRA

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

▼M2

(2) 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.

(3) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. Paskelbta:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

(4) 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. Paskelbta:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(5) 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 Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Paskelbta:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(6) EB (2006). 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.

(7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Paskelbta:

[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_ 1_1_1_1,00.html]

(8) ICCVAM (2007). 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 Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Paskelbta:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(9) 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. Paskelbta:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]

(10) 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).

▼M2

(11) 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.

(12) 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. Paskelbta:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

(13) 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.

(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) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Paskelbta:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

(18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Paskelbta:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

▼M2

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo metodo naudojimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas pakaitomis su terminu „sutapimas“ reikšme „tinkamų bandymo metodo rezultatų dalis“.

Lyginamoji cheminė medžiaga – cheminė medžiaga, naudojama kaip standartas, su kuriuo lyginama bandomoji medžiaga. Lyginamoji cheminė medžiaga turi turėti tokias savybes: i) tinkamą (-us) ir patikimą (-us) šaltinį (-ius); ii) jos struktūrinės ir funkcinės savybės turi būti panašios į bandomųjų medžiagų kategorijos savybes; iii) turi būti žinomos jos fizikinės ir cheminės savybės; iv) turi būti duomenų, patvirtinančių žinomą poveikį; v) turi būti žinomas jos stiprumas pageidaujamo poveikio intervalo ribose.

Ragena – permatoma priekinė akies obuolio dalis, dengianti rainelę bei vyzdį ir praleidžianti šviesą į vidų.

Ragenos padrumstėjimas – išmatuota ragenos padrumstėjimo vertė, gauta rageną baigus veikti bandomąja medžiaga. Padidėjusi ragenos drumstis rodo ragenos pažeidimą. Padrumstėjimą galima vertinti subjektyviai, kaip tai daroma per Draize‘o triušio akies bandymą, arba objektyviai, naudojant prietaisą, pvz., drumsties matuoklį.

Ragenos pralaidumas – kiekybinis ragenos epitelio pažeidimo įvertinimas nustatant fluoresceino natrio druskos dažiklio kiekį, prasiskverbiantį per visus ragenos ląstelių sluoksnius.

EPA 1 kategorija – ėsdinimas (negrįžtamas akies audinio suardymas) arba ragenos pakenkimas arba dirginimas, trunkantis ilgiau kaip 21 dieną (1).

ES R41 kategorija – akies audinio pažeidimas arba smarkus fizinis regėjimo pablogėjimas po to, kai ant išorinio akies paviršiaus buvo uždėta bandomosios medžiagos, iki galo nepraeinantis per 21 dieną nuo uždėjimo.

Klaidingai neigiamų rezultatų dalis – visų teigiamų medžiagų, kurios taikant bandymo metodą buvo klaidingai identifikuotos kaip neigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo metodo naudojimo charakteristikų rodiklių.

Klaidingai teigiamų rezultatų dalis – visų neigiamų medžiagų, kurios taikant bandymo metodą buvo klaidingai identifikuotos kaip teigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo metodo naudojimo charakteristikų rodiklių.

GHS (Visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema) – sistema, kurioje pateikiama cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikacija 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 (3).

▼M2

GHS 1 kategorija – akies audinio pažeidimas arba smarkus fizinis regėjimo pablogėjimas po to, kai ant išorinio akies paviršiaus buvo uždėta bandomosios medžiagos, iki galo nepraeinantis per 21 dieną nuo uždėjimo (3).

Pavojus – medžiagos savybė arba aplinkybės, dėl kurių organizmui, sistemai arba populiacijai (arba jos daliai), kurią veikia toji medžiaga, gali būti padarytas kenksmingas poveikis.

In vitro **dirginimo skaitinė vertė (IVIS) –** empiriniu būdu gauta formulė, naudojama atliekant BCOP bandymą, kai kiekvienos bandomųjų mėginių grupės vidutinės padrumstėjimo ir pralaidumo vertės susumuojamos, kad būtų apskaičiuota kiekvienos bandomųjų mėginių grupės bendra *in vitro* skaitinė vertė. *IVIS* = vidutinė padrumstėjimo vertė + (15 x vidutinė pralaidumo vertė).

Neigiamas kontrolinis mėginys – bandomąja medžiaga neapdorota mėginio kopija, turinti visas sudedamąsias bandymo sistemos dalis. Šis mėginys tiriamas kartu su bandomąja medžiaga apdorotais mėginiais ir kitais kontroliniais mėginiais, siekiant nustatyti, ar tirpiklis veikia bandymo sistemą.

Nedirginančios medžiagos – cheminės medžiagos, nepriskiriamos EPA I, II arba III kategorijos, ES R41 arba R36 kategorijos arba GHS 1, 2A arba 2B kategorijos akis dirginančioms medžiagoms.

Akis ėsdinanti medžiaga – a) cheminė medžiaga, negrįžtamai suardanti akies audinį; b) cheminės medžiagos, priskiriamos GHS 1 kategorijos, EPA I kategorijos arba ES R41 kategorijos akis dirginančioms medžiagoms (1) (2) (3).

Akis dirginanti medžiaga – a) cheminė medžiaga, kuri, uždėta ant priekinio akies paviršiaus, sukelia grįžtamus akies pažeidimus; b) cheminės medžiagos, priskiriamos EPA II arba III kategorijos, ES R36 kategorijos arba GHS 2A arba 2B kategorijos akis dirginančioms medžiagoms (1) (2) (3).

Akis stipriai dirginanti medžiaga – a) cheminė medžiaga, kuri, uždėta ant priekinio akies paviršiaus, sukelia akies audinio pažeidimus, nepraeinančius per 21 dieną nuo tos medžiagos uždėjimo, arba sukelia didelį fizinį regos pablogėjimą; b) cheminės medžiagos, priskiriamos GHS 1 kategorijos, EPA I kategorijos arba ES R41 kategorijos akis dirginančioms medžiagoms (1) (2) (3).

Drumsties matuoklis – prietaisas, naudojamas ragenos padrumstėjimui išmatuoti kiekybiškai įvertinant šviesos prasiskverbimą 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 prietaiso nulinei padėčiai nustatyti. Halogeninės lempos šviesa perduodama per kontrolinį skyrių (tuščią kamerą be langų ar skysčių) į fotoelementą ir lyginama su šviesa, perduota į fotoelementą per bandymo skyrių, kuriame yra kamera su ragena. Palyginamas iš fotoelementų perduoto šviesos kiekio skirtumas ir skaitmeniniame ekrane parodoma skaitinė drumsties vertė.

Teigiamas kontrolinis mėginys – mėginio kopija, turinti visas sudedamąsias bandymo sistemos dalis ir apdorota chemine medžiaga, kuri, kaip yra žinoma, sukelia teigiamą atsaką. Norint užtikrinti galimybę įvertinti atsako į teigiamą kontrolinę medžiagą kaitą per tam tikrą laiką, dirginamasis poveikis neturėtų būti pernelyg stiprus.

▼M2

Patikimumas – bandymo metodo, taikomo pagal tą patį protokolą, atkuriamumo toje pačioje laboratorijoje ir kitose laboratorijose matas. Patikimumas įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų ir pakartojamumą laboratorijoje.

Tirpiklio (nešiklio) kontrolinis mėginys – neapdorotas mėginys, turintis visas sudedamąsias bandymo sistemos dalis, įskaitant tirpiklį (nešiklį), kuris tiriamas kartu su bandomąja medžiaga apdorotais mėginiais ir kitais kontroliniais mėginiais, siekiant nustatyti pamatinį mėginių, apdorotų tuo pačiu tirpikliu (nešikliu), atsaką. Atliekant bandymą kartu su neigiamu kontroliniu mėginiu, šis mėginys taip pat parodo, ar tirpiklis (nešiklis) veikia bandymo sistemą.

Pakopiniai bandymai – nuosekli bandymo metodika, pagal kurią tam tikra eilės tvarka nagrinėjama visa turima informacija apie bandomąją medžiagą, kiekvienoje pakopoje taikant įrodomosios duomenų galios metodiką siekiant nustatyti, ar yra pakankamai duomenų sprendimui dėl pavojingumo kategorijos priimti, prieš pereinant prie kitos pakopos. Jeigu bandomosios medžiagos gebą dirginti akis galima nustatyti remiantis turima informacija, papildomų bandymų atlikti nereikia. Jeigu bandomosios medžiagos dirginamosios gebos nustatyti remiantis turima informacija negalima, taikoma nuosekli gyvūnų bandymo metodika, kol gaunami duomenys, kuriais remiantis galima aiškiai nustatyti tos medžiagos kategoriją.

Patvirtintas bandymo metodas – bandymo metodas, kurio patvirtinimo tyrimai buvo atlikti siekiant nustatyti jo tinkamumą (įskaitant tikslumą) ir patikimumą konkrečiai paskirčiai. Svarbu atkreipti dėmesį, kad patvirtintas bandymo metodas gali būti nepakankamai tikslus ir patikimas, kad jį būtų galima pripažinti tinkamu siūlomai paskirčiai.

Įrodomoji duomenų galia – metodika, pagal kurią vertinamos tam tikrų informacijos dalių privalumai ir trūkumai, siekiant priimti ir pagrįsti sprendimą dėl cheminės medžiagos pavojingumo.

▼M2

2 priedėlis

Patikros medžiagos BCOP bandymo atveju

Prieš pradėdamos sistemingai taikyti bandymo metodą, susijusį su šiuo bandymo metodu, laboratorijos gali pageidauti įsitikinti savo techniniu tinkamumu šiam bandymui atlikti. Tokiu tikslu jos pamėgina teisingai nustatyti dešimties 1 lentelėje siūlomų cheminių medžiagų akių ėsdinimo kategoriją. Šios cheminės medžiagos parinktos atsižvelgiant į įvairų vietinio akies dirginimo ir (arba) ėsdinimo atsaką, pagrįstą triušio akies *in vivo* bandymo rezultatais (TG 405) (t. y. JT GHS 1, 2A, 2B kategorijos arba „Neklasifikuojama ir neženklinama“) (3) (7). Tačiau, atsižvelgiant į patvirtintą šių bandymų naudingumą (t. y. tik nustatyti akis ėsdinančias ir (arba) stipriai dirginančias medžiagas), klasifikavimui aktualūs rezultatai, susiję su tinkamumo pasitikrinimu, yra tik du (ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti arba neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti medžiaga). Kiti atrankos kriterijai yra šie: cheminės medžiagos turi būti parduodamos rinkoje, turi būti kokybiškų *in vivo* pamatinių duomenų ir turi būti kokybiškų duomenų apie abu *in vitro* metodus, apie kuriuos yra rengiamos bandymų gairės. Dėl šios priežasties dirginančios cheminės medžiagos buvo atrinktos iš ICCVAM rekomenduojamų 122 etaloninių cheminių medžiagų, skirtų *in vitro* toksiškumo akims bandymo metodams patvirtinti, sąrašo (žr. H priedėlį: ICCVAM rekomenduojamos etaloninės cheminės medžiagos) (5). Pamatiniai duomenys pateikti ICCVAM istorinės apžvalgos dokumentuose, skirtuose BCOP ir izoliuotos vištos akies (angl. *Isolated Chicken Eye*, ICE) bandymo metodams (17) (18).

1 lentelė

BCOP bandymo atveju rekomenduojamos techninės patikros cheminės medžiagos

Cheminė medžiaga	CASNR	Cheminės medžiagos klasė ([1])	Fizinis būvis	*In vivo* kategorija ([2])	*In vitro* kategorija ([3])
Benzalkonio chloridas (5 %)	8001-54-5	Onio junginys	Skysta	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
Chlorheksidinas	55-56-1	Aminas, amidinas	Kieta	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
Dibenzoil-L-vyno rūgštis	2743-38-6	Karboksirūgšties esteris	Kieta	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
Imidazolas	288-32-4	Heterociklinis junginys	Kieta	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
Trichloracto rūgštis (30 %)	76-03-9	Karboksirūgštis	Skysta	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
2,6-dibenzoil-chloridas	4659-45-4	Acilhalogenidas	Skysta	2A kategorija	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti
Etil-2-metil acetoacetatas	609-14-3	Ketonas, esteris	Skysta	2B kategorija	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti
Amonio nitratas	6484-52-2	Neorganinė druska	Kieta	2A kategorija	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti

▼**M2**

Cheminė medžiaga	CASNR	Cheminės medžiagos klasė (1)	Fizinis būvis	*In vivo* kategorija (2)	*In vitro* kategorija (3)
Glicerinas	56-81-5	Alkoholis	Skysta	Neženklinama	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti
n-heksanas	110-54-3	Angliavandenilis (aciklinis)	Skysta	Neženklinama	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti

Santrumpos: CASRN – Cheminių medžiagų pavadinimų santrumpų tarnybos registracijos numeris.

(1) Cheminės medžiagos klasės kiekvienai bandomajai medžiagai priskirtos taikant standartinę klasifikavimo sistemą, remiantis Nacionalinės medicinos bibliotekos medicinos objektų pavadinimų (MeSH) klasifikavimo sistema (paskelbta http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Remiantis rezultatais, gautais atlikus triušio akies *in vivo* bandymą (OECD TG 405), ir taikant JT GHS (3)(7).

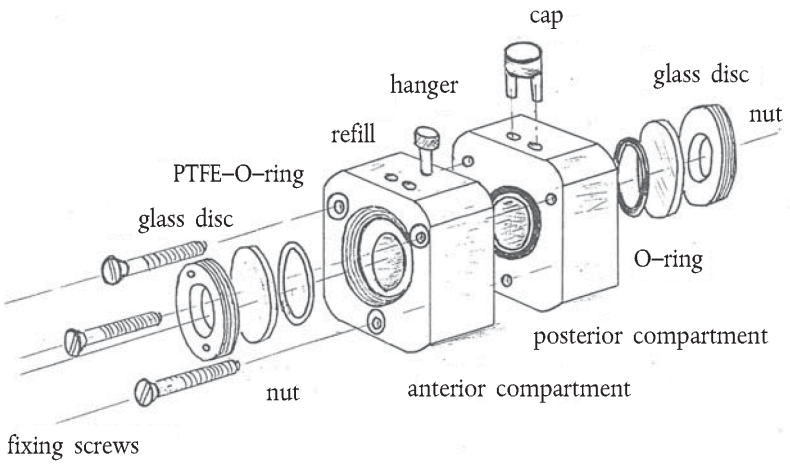
(3) Remiantis BCOP ir ICE rezultatais.

▼M2

3 priedėlis

BCOP BANDYMUI NAUDOJAMAS RAGENOS LAIKIKLIS

1. 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 talpa yra 5 ml, jų galuose yra stikliniai langai, per kuriuos registruojamos padrumstėjimo matavimų vertės. Kiekviena vidinė kamera yra 1,7 cm skersmens ir 2,2 cm gylio ([1]). Kad būtų išvengta nutekėjimo, ant užpakalinės kameros uždedamas apvalus žiedas. Ragenos endoteliu į apačią padedamos ant apvalaus užpakalinių kamerų žiedo, o priekinės kameros padedamos ant ragenų epitelio. Kameros įtvirtinamos trimis nerūdijančiais varžtais, esančiais ties išoriniais kameros kraštais. Kiekvienos kameros gale yra stiklinis langas, kurį galima išimti, kad būtų patogiau pasiekti rageną. Kad būtų išvengta nutekėjimo, tarp stiklinio lango ir kameros taip pat įdedamas apvalus žiedas. Kiekvienos kameros viršuje yra dvi angos, per kurias įpilama bei pašalinama terpė ir bandomieji junginiai. Apdorojimo ir inkubacijos laikotarpiais jos uždaromos guminiais dangteliais.



Žodynėlis:

Glass disc: stiklinis diskas

PTFE-O-ring: PTFE apvalus žiedas

Refill: pripildymo anga

Hanger: laikiklis

Cap: dangtelis

Nut: veržlė

O-ring: apvalus žiedas

Posterior compartment: galinis skyrius

Anterior compartment: priekinis skyrius

Fixing screws: fiksuojamieji varžtai

([1]) Pateikti matmenys yra pagrįsti ragenos laikikliu, naudojamu 12–60 mėnesių karvėms. Jeigu naudojami 6–12 mėnesių gyvūnai, laikiklis turėtų būti pagamintas taip, kad kiekvienos kameros talpa būtų 4 ml, o kiekvienos vidinės kameros skersmuo – 1,5 cm, gylis – 2,2 cm. Projektuojant naujus ragenų laikiklius, labai svarbu užtikrinti, kad priekinėje kameroje veikiamo ragenos paviršiaus ploto ir užpakalinės kameros talpos santykis būtų toks pat, kaip įprastam ragenų laikikliui apskaičiuotas santykis. Tai yra būtina tam, kad būtų teisingai nustatytos pralaidumo vertės, nustatomos IVIS skaičiavimams pagal siūlomą formulę.

▼**M2**

DRUMSTIES MATUOKLIS

2. Drumsties matuoklis yra šviesos skvarbos matavimo prietaisas. Halogeninės lempos šviesa perduodama per kontrolinį skyrių (tuščią kamerą be langų ar skyscių) į fotoelementą ir lyginama su šviesa, į fotoelementą perduota per bandymo skyrių, kuriame yra kamera su ragena. Palyginamas iš fotoelementų perduoto šviesos kiekio skirtumas ir skaitmeniniame ekrane parodoma skaitinė drumsties vertė. Nustatomi drumsties vienetai.

3. Drumsties matuokliu turi būti gaunamas tiesinis atsakas tam tikrame drumsties rodmenų intervale, apimančiame ribas, taikomas pagal įvairius klasifikatorius, aprašytus pagal prognozavimo modelį (t. y. iki ribos, susijusios su ėsdinimu ir (arba) stipriu dirginimu). Norint užtikrinti tikslius tiesinius rodmenis iki 75–80 drumsties vienetų, būtina sukalibruoti drumsties matuoklį naudojant įvairius kalibratorius. Kalibratoriai (neskaidrūs poliesterio lapai) įdedami į kalibravimo kamerą (ragenos kamerą, pritaikytą kalibravimo priemonėms laikyti) ir registruojami drumsties matuoklio rodmenys. Kalibravimo kamera pritaikoma laikyti kalibratorius tarp šviesos šaltinio ir fotoelemento daugmaž tokiu atstumu, kokiu įdedamos ragenos atliekant padrumstėjimo matavimus. Pirmiausia drumsties matuoklis sukalibruojamas iki 0 drumsties vienetų, naudojant kalibravimo kamerą be kalibratoriaus. Tada vienas po kito į kalibravimo kamerą dedami trys kalibratoriai ir matuojama drumstis. Naudojant kalibratorius Nr. 1, 2 ir 3 turėtų būti gauti drumsties rodmenys, atitinkantys nustatytas tų kalibratorių vertes – atitinkamai 75, 150 ir 225 drumsties vienetus su 5 proc. paklaida.

▼M2

B.48. IZOLIUOTOS VIŠTOS AKIES BANDYMO METODAS AKIS ĖSDINANČIOMS IR STIPRIAI DIRGINANČIOMS MEDŽIAGOMS NUSTATYTI

ĮVADAS

1. Izoliuotos vištos akies (angl. *Isolated Chicken Eye*, ICE) bandymo metodas yra *in vitro* bandymo metodas, kurį tam tikromis aplinkybėmis ir su tam tikrais apribojimais galima taikyti siekiant chemines medžiagas ir mišinius suklasifikuoti kaip akis ėsdinančias ir stipriai dirginančias medžiagas (1) (2) (3). Šiose bandymų gairėse stipriai dirginančios medžiagos apibrėžiamos kaip medžiagos, sukeliančios akių pažeidimus, kurie triušiui nepraeina per 21 dieną po paveikimo ta medžiaga. Nors šis bandymo metodas nėra laikomas tinkamu visiškai pakeisti triušio akies *in vivo* bandymą, ICE bandymo metodą rekomenduojama taikyti kaip vieną iš pakopinės bandymo strategijos, taikomos reguliavimo tikslais klasifikuojant ir ženklinant tam tikroje srityje naudojamas medžiagas, sudedamųjų dalių (4) (5). Bandomąsias medžiagas ir mišinius (6), kurie, atliekant šį bandymą, priskiriami teigiamų medžiagų kategorijai, galima klasifikuoti kaip akis ėsdinančias arba stipriai dirginančias medžiagas neatliekant papildomų bandymų su triušiais. Cheminė medžiaga, kurios bandymo rezultatai neigiami, turėtų būti išbandyta su triušiais, taikant nuosekliąją bandymo metodiką, aprašytą OECD bandymų gairėse Nr. 405 (7) (šio priedo B.5 skyrius).

2. Šio bandymo metodo paskirtis – aprašyti procedūras, taikomas vertinant, ar bandomoji medžiaga gali sukelti ėsdinimą arba stiprų dirginimą, sprendžiant pagal jos gebėjimą sukelti toksinį poveikį išimtai vištos akiai. Toksinis poveikis ragenai matuojamas šiais būdais: i) kokybiškai vertinant padrumstėjimą, ii) kokybiškai vertinant epitelio pažeidimus ant akies uždėjus fluoresceino (fluoresceino sulaikymas), iii) kiekybiškai matuojant storio padidėjimą (pabrinkimą) ir iv) kokybiškai vertinant makroskopinius morfologinius paviršiaus pažeidimus. Ragenos padrumstėjimo, pabrinkimo ir pažeidimų vertinimas baigus veikti bandomąja medžiaga atliekamas atskirai ir tada susumuojamas siekiant nustatyti akies dirginimo kategorijas.

3. Akis dirginančios medžiagos, sukeliančios akių pažeidimus, kurie praeina mažiau kaip per 21 dieną, ir akių nedirginančios medžiagos taip pat buvo išbandytos taikant ICE bandymo metodą. Tačiau ICE bandymo metodo tikslumas ir patikimumas bandant šių kategorijų chemines medžiagas nėra oficialiai įvertintas.

4. Apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI SVARSTYMAI IR APRIBOJIMAI

5. Šis bandymo metodas pagrįstas Alternatyvių metodų patvirtinimo tarpžinybinio koordinavimo komiteto (ICCVAM) ICE bandymo metodo protokolu (8), parengtu atlikus tarptautinį patvirtinimo tyrimą (4) (5) (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).

▼M2

6. Nustatyti šio metodo apribojimai pagrįsti klaidingai teigiamų rezultatų dalimi alkoholių atveju ir klaidingai neigiamų rezultatų dalimis kietųjų medžiagų ir paviršinio aktyvumo medžiagų atveju (žr. 47 skirsnį) (4). Iš duomenų bazės pašalinus šių cheminių ir fizikinių kategorijų chemines medžiagas, ICE bandymo metodo tikslumas pagal ES, EPA ir GHS klasifikavimo sistemas iš esmės pagerėjo (4). Remiantis šių bandymų tikslu (t. y. tiktai nustatyti akis ėsdinančias ir (arba) stipriai dirginančias medžiagas), klaidingi neigiami rezultatai neturi lemiamos reikšmės, nes šios cheminės medžiagos vėliau bus išbandytos su triušiais arba taikant kitus deramai patvirtintus *in vitro* bandymus, atsižvelgiant į reguliavimo reikalavimus ir taikant nuosekliąją bandymo metodiką pagal įrodomosios duomenų galios metodą. Be to, naudojant dabartinę patvirtinimo duomenų bazę negalima deramai įvertinti tam tikrų klasių cheminių medžiagų arba produktų (pvz., mišinių). Tačiau tyrėjai galėtų apsvarstyti šio bandymo metodo taikymo visų tipų cheminėms medžiagoms (įskaitant mišinius) galimybes, kai teigiamas rezultatas galėtų būti priimtas kaip orientacinis akių ėsdinimo arba stipraus dirginimo atsakas. Tačiau teigiami rezultatai, gauti bandant alkoholius, turėtų būti aiškinami atsargiai, vengiant nepagrįstų prognozių.

7. Visos procedūros su vištų 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 (15).

8. Šio bandymo metodo apribojimas yra tas, kad, nors pagal jį ir atsižvelgiama į tam tikrą poveikį akims, vertinamą pagal triušio akių dirginimo bandymo metodą, ir iš dalies į to poveikio lygį, pagal šį metodą neatsižvelgiama į akies junginės ir rainelės pažeidimus. Be to, nors pagal ICE bandymo metodą ir negalima įvertinti ragenos pažeidimų grįžtamumo *per se*, remiantis triušio akių tyrimais pasiūlyta naudoti pradinį ragenos pažeidimų gylio vertinimą, siekiant atskirti, ar poveikis negrįžtamas, ar grįžtamas (16). Galiausiai pagal ICE bandymo metodą negalima įvertinti galimo sisteminio toksiškumo, susijusio su poveikiu akims.

9. Toliau dedamos pastangos siekiant geriau apibūdinti ICE bandymo metodo naudingumą ir apribojimus, siekiant nustatyti silpnai dirginančias ir nedirginančias medžiagas (taip pat žr. 48 skirsnį). Be to, naudotojai kviečiami teikti patvirtinimo organizacijoms pavyzdžius ir (arba) duomenis, kuriais remiantis būtų galima oficialiai įvertinti galimą būsimą ICE bandymo metodo paskirtį, įskaitant silpnai dirginančių akis medžiagų ir nedirginančių medžiagų nustatymą.

10. Kiekviena laboratorija, pradedanti taikyti šį bandymo metodą, turėtų naudoti 2 priedėlyje nurodytas patikros chemines medžiagas. 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

11. ICE bandymo metodas yra tipinis konkretaus organo tyrimo modelis, pagal kurį galima išsaugoti trumpalaikį vištos akies funkcionavimą *in vitro*. Pagal šį bandymo metodą bandomosios medžiagos padarytas pažeidimas nustatomas įvertinant ragenos pabrinkimą, padrumstėjimą ir fluoresceino sulaikymą. Pirmieji du parametrai vertinami kokybiškai, o ragenos pabrinkimas – kiekybiškai. Kiekvieno matavimo rezultatai paverčiami skaitine verte, kuri naudojama bendram dirginimo indeksui apskaičiuoti, arba priskiriami tam tikrai kokybinei kategorijai, kuri naudojama *in vitro* akies ėsdinimo ir stipraus dirginimo kategorijai nustatyti. Tada kiekvieną iš šių rezultatų galima naudoti prognozuoti bandomosios medžiagos gebą ėsdinti arba stipriai dirginti akis *in vivo* (žr. „Sprendimo kriterijai“).

▼M2

Vištų akių šaltinis ir amžius

12. Paprastai šiam bandymui būdavo naudojamos vištų akys, paimtos skerdykloje, kurioje vištos būdavo paskerdžiamos vartoti žmonėms, taip pašalinant poreikį naudoti laboratorinius gyvūnus. Naudojamos tik sveikų gyvūnų, kurie laikomi tinkamais naudoti žmonių maisto grandinėje, akys.

13. Nors kontroliuojamas tyrimas, kuriuo būtų siekiama įvertinti tinkamiausią vištų amžių, nebuvo atliktas, pagal šį bandymo metodą anksčiau būdavo naudojamos tokio amžiaus ir svorio vištos, kokio paprastai būna pavasariniai viščiukai, apdorojami paukščių skerdykloje (t. y. apie 7 savaičių amžiaus, 1,5–2,5 kg svorio).

Akių paėmimas ir gabenimas į laboratoriją

14. Galvos turėtų būti nuimtos iš karto po to, kai viščiukai numarinami, paprastai elektrošoku, ir įpjaunant kaklą, kad nubėgtų kraujas. Turėtų būti rastas netoli laboratorijos esantis vietinis vištų šaltinis, kad galvas būtų galima nuvežti iš skerdyklos į laboratoriją pakankamai greitai, taip užtikrinant, kad jų pažeidimo ir (arba) užteršimo bakterijomis tikimybė būtų kuo mažesnė. Laikotarpis nuo vištų galvų surinkimo iki akių panaudojimo per ICE bandymą turėtų būti kuo mažesnis (paprastai iki dviejų valandų), ir turi būti įrodyta, kad šis laikotarpis neturės neigiamos įtakos bandymo rezultatams. Šie rezultatai grindžiami akių atrankos kriterijais ir atsaku į teigiamų ir neigiamų kontrolinių medžiagų poveikį. Visos akys, naudojamos atliekant bandymą, turėtų būti iš to paties tam tikrą dieną surinkto akių rinkinio.

15. Kadangi akys išpjaunamos laboratorijoje, iš skerdyklos vežamos sveikos galvos laikomos aplinkos temperatūroje, plastikinėse dėžėse, drėkinamose izotoniniu druskos tirpalu sudrėkintomis audinio skiautėmis.

ICE bandymui skirtų akių atrankos kriterijai

16. Išimtos akys, kurių pamatinės nusidažymo fluoresceinu arba ragenos padrumstėjimo vertės yra didelės (t. y. didesnės kaip 0,5), išmetamos.

17. Kiekviena apdorojamų mėginių grupė ir kartu naudojama kontrolinė mėginių grupė sudaroma ne mažiau kaip iš trijų akių. Neigiama kontrolinė grupė ir tirpiklio (nešiklio) kontrolinė grupė (jeigu naudojamas tirpiklis nėra druskos tirpalas) sudaroma bent iš vienos akies.

EIGA

Akių paruošimas

18. Atsargiai, nepažeidžiant ragenos, išpjaunami akių vokai. Ragenos sveikumas greitai įvertinamas ant ragenos paviršiaus kelioms sekundėms užlašinus 2 % (m/t) fluoresceino natrio druskos tirpalo lašą ir jį nuplovus izotoniniu druskos tirpalu. Tada fluoresceinu apdorotos akys apžiūrimos naudojant mikroskopą su plyšine lempa, siekiant įsitikinti, kad ragena yra nepažeista (t. y. kad fluoresceino sulaikymo ir ragenos padrumstėjimo vertės yra ne didesnės kaip 0,5).

19. Jeigu 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 pernelyg nespausti ragenos (pvz., spaudžiamaisiais įrankiais), kad ji nebūtų pažeista.

20. Akį išėmus iš akiduobės, matoma regos nervo dalis turėtų būti palikta. Iš akiduobės išimta akis padedama ant sugeriamojo audinio, tada nupjaunama mirksimoji membrana ir kiti jungiamieji audiniai.

▼M2

21. Išimta akis įtvirtinama nerūdijančio plieno dėkle taip, kad ragena būtų pasukta vertikaliai. Tada dėklas perkeliamas į superfuzijos aparato kamerą (16). Dėklai superfuzijos aparate padedami taip, kad lašantis izotoninio druskos tirpalas patektų ant visos ragenos. Superfuzijos aparato kamerose turėtų būti palaikoma 32 ± 1,5 °C temperatūra. 3 priedėlyje pateikta superfuzijos aparato ir akių dėklų, kuriuos galima nusipirkti arba pasigaminti, schema. Aparato konstrukcija gali būti pakeista atsižvelgiant į konkrečios laboratorijos poreikius (pvz., norint sudaryti galimybę įdėti kitokį akių skaičių).

22. Akis įdėjus į superfuzijos aparatą, jos dar kartą apžiūrimos per plyšinį mikroskopą, siekiant įsitikinti, ar jos nebuvo pažeistos per išpjovimo procedūrą. Kartu turi būti išmatuotas ragenos storis ties ragenos viršūne, naudojant gylio matavimo prietaisą, įrengtą mikroskope su plyšine lempa. Akys, kurių i) fluoresceino sulaikymo skaitinė vertė didesnė kaip 0,5, ii) ragenų drumstis didesnė kaip 0,5 arba kurios iii) turi kitokių pažeidimo požymių, turėtų būti pakeistos. Iš akių, kurios nebuvo atmestos pagal kurį nors iš šių kriterijų, grupės turi būti atmestos tos akys, kurių ragenos storio nuokrypis nuo visų akių vidurkio didesnis kaip 10 %. Naudotojai turėtų žinoti, kad naudojant mikroskopus su plyšine lempa gauti ragenų storio duomenys gali skirtis, jeigu bus pasirinktos nevienodos plyšio pločio nuostatos. Turėtų būti nustatytas 0,095 mm pločio plyšys.

23. Apžiūrėjus akis ir įsitikinus jų tinkamumu, jos daugmaž 45–60 minučių laikomos inkubacinėmis sąlygomis, kad iki dozavimo jų temperatūra susilygintų su bandymo sistemos temperatūra. Pasibaigus temperatūros nusistovėjimo laikotarpiui, registruojamos ragenos storio ir drumsties nulinės atskaitos vertės, kurios bus naudojamos kaip pamatinės (t. y. laikas = 0). Kaip pamatinė vertė naudojama fluoresceino skaitinė vertė išpjovimo metu.

Bandomosios medžiagos uždėjimas

24. Iš karto po to, kai užrašomi nulinės atskaitos matavimai, akis (su dėklu) išimama iš superfuzijos aparato, padedama horizontaliai ir ant ragenos uždedama bandomosios medžiagos.

25. Skystos bandomosios medžiagos paprastai bandomos grynos, tačiau prireikus (t. y. pagal tam tikrą tyrimo plano dalį) jas galima atskiesti. Pageidautina, kad cheminėms medžiagoms skiesti būtų naudojamas fiziologinis tirpalas. Kontroliuojamomis sąlygomis gali būti naudojami ir kiti tirpikliai, tačiau būtina įrodyti tirpiklio, kuris nėra fiziologinis tirpalas, tinkamumą.

26. Skystos bandomosios medžiagos ant ragenos užlašinamos taip, kad visas ragenos paviršius būtų tolygiai padengtas bandomąja medžiaga; standartinis kiekis yra 0,03 ml.

27. Jeigu įmanoma, kietosios medžiagos turėtų būti kuo smulkiau sutrinamos grūstuvėje su piesta arba panašioje smulkinimo priemonėje. Milteliai ant ragenos beriami taip, kad jos paviršius būtų tolygiai padengtas bandomąja medžiaga; standartinis kiekis yra 0,03 g.

28. Bandomoji medžiaga (skysta arba kieta) uždėta palaikoma 10 sekundžių, tada nuplaunama nuo akies aplinkos temperatūros izotoniniu druskos tirpalu (naudojant apie 20 ml tirpalo). Tada akis (įdėta į laikiklį) vėl įdedama į superfuzijos aparatą, į pradinę vertikalią padėtį.

Kontrolinės medžiagos

29. Per kiekvieną bandymą kartu turėtų būti naudojami kontroliniai neigiami mėginiai, tirpiklio (nešiklio) kontroliniai mėginiai ir teigiami kontroliniai mėginiai.

▼M2

30. Kai bandomi gryni skysčiai arba kietosios cheminės medžiagos, pagal ICE bandymo metodą kartu kaip neigiama kontrolinė medžiaga naudojamas fiziologinis tirpalas, kad būtų galima aptikti netipinius bandymo sistemos pokyčius ir kad bandymo sąlygos neturėtų netinkamos įtakos atsakui į dirginimą.

31. Kai bandomi atskiesti skysčiai, tam, kad būtų galima aptikti netipinius bandymo sistemos pokyčius ir kad bandymo sąlygos neturėtų netinkamos įtakos atsakui į dirginimą, taikant bandymo metodą kartu naudojama kontrolinė tirpiklio (nešiklio) mėginių grupė. Kaip nurodyta 25 skirsnyje, galima naudoti tik tokius tirpiklius (nešiklius), kurie, kaip įrodyta, neturi neigiamos įtakos bandymo sistemai.

32. Norint patikrinti, ar sukeliamas tinkamas atsakas, per kiekvieną bandymą kaip teigiama kontrolinė medžiaga naudojama žinoma akis dirginanti medžiaga. Kadangi pagal šį bandymo metodą ICE bandymas atliekamas siekiant nustatyti ėsdinančias arba stipriai dirginančias medžiagas, kaip teigiamą kontrolinę medžiagą reikėtų naudoti etaloninę cheminę medžiagą, kuri naudojama pagal šį bandymo metodą sukelia stiprų dirginimą. Tačiau, norint užtikrinti galimybę įvertinti atsako į teigiamą kontrolinę medžiagą kaitą per tam tikrą laiką, dirginamasis poveikis neturėtų būti pernelyg stiprus. Turėtų būti gauta pakankamai *in vitro* duomenų apie teigiamą kontrolinę medžiagą, kad būtų galima apskaičiuoti statistiškai apibrėžtą priimtiną teigiamos kontrolinės medžiagos poveikio intervalą. Jeigu tinkamų istorinių ICE bandymo metodo duomenų apie tam tikrą teigiamą kontrolinę medžiagą nėra, gali reikėti atlikti tyrimus šiai informacijai gauti.

33. Pavyzdžiui, per skystų cheminių medžiagų bandymus tinkamos naudoti teigiamos kontrolinės medžiagos yra 10 % acto rūgštis arba 5 %. benzalkonio chloridas, o kietųjų cheminių medžiagų bandymams tinkamų naudoti teigiamų kontrolinių medžiagų pavyzdžiai yra natrio hidroksidas arba imidazolis.

34. Lyginamosios cheminės medžiagos yra naudingos norint įvertinti tam tikrai cheminių medžiagų arba gaminių kategorijai priskiriamų nežinomų cheminių medžiagų gebą dirginti akis arba santykinę akis dirginančios medžiagos dirginamąją gebą tam tikrame atsako į dirginimą intervale.

Išmatuoti rezultatai

35. Apdorojamos ragenos vertinamos prieš apdorojimą ir po 30, 75, 120, 180 bei 240 minučių (± 5 minutės) nuo nuplovimo apdorojus. Taikant šiuos laiko momentus, užtikrinamas tinkamas matavimų kiekis per keturių valandų veikimo laikotarpį, o tarp matavimų paliekama pakankamai laiko reikiamoms visų akių apžiūroms.

36. Vertinami tokie poveikiai: ragenos padrumstėjimas, pabrinkimas, fluoresceino sulaikymas ir morfologiniai padariniai (pvz., epitelio išopėjimas arba atsilaisvinimas). Visi poveikiai, išskyrus fluoresceino sulaikymą (jis nustatomas tik prieš apdorojimą ir po 30 minučių nuo apdorojimo bandomąja medžiaga), vertinami kiekvienu pirmiau nurodytu laiko momentu.

37. Patariama padaryti ragenos padrumstėjimo, fluoresceino sulaikymo, morfologinių padarinių ir, jei atliekami histopatologiniai tyrimai, jų metu nustatytų padarinių nuotraukas.

38. Baigus keturių valandų tyrimą, naudotojams siūloma išsaugoti akis tinkamame fiksatyve (pvz., neutraliame buferiniame formalino tirpale), kad būtų galima ištirti galimus histopatologinius pakitimus.

▼**M2**

39. Ragenų pabrinkimas nustatomas remiantis ragenos storio matavimais, atliekamais optiniu stormačiu, įrengtu mikroskope su plyšine lempa. Jis išreiškiamas procentais ir apskaičiuojamas remiantis ragenos storio matavimais pagal šią formulę:

$$\left[\frac{\textit{ragenos storis laiko momentu } t \; - \; \textit{ragenos storis laiko momentu } = 0}{\textit{ragenos storis laiko momentu } = 0}\right] \times 100$$

40. Apskaičiuojamas visų bandomųjų akių vidutinis procentinis ragenos pabrinkimas kiekvienu stebėjimo laiko momentu. Remiantis didžiausiąja vidutine ragenos pabrinkimo verte, nustatyta kuriuo nors laiko momentu, kiekvienai bandomajai medžiagai priskiriama bendra kategorinė vertė.

41. Nustatant skaitines vertes, ragenos padrumstėjimas skaičiuojamas tame ragenos plote, kuris labiausiai nepraleidžia šviesos. Apskaičiuojama visų bandomųjų akių vidutinė ragenos padrumstėjimo vertė kiekvienu stebėjimo laiko momentu. Remiantis didžiausia vidutine ragenos padrumstėjimo verte, nustatyta kuriuo nors laiko momentu, kiekvienai bandomajai medžiagai suteikiama bendra kategorinė vertė (1 lentelė).

1 lentelė

Ragenos padrumstėjimo vertės

Vertė	Stebėjimo išvados
0	Jokios padrumstėjimo
0,5	Labai nežymus padrumstėjimas
1	Padrumstėję pavieniai ploteliai; rainelės raštas aiškiai matomas
2	Aiškiai matomas pusskaidris plotas; rainelės raštas šiek tiek neryškus
3	Stiprus ragenos padrumstėjimas; rainelės rašto aiškiai nematyti; vyzdžio dydis beveik neįžiūrimas
4	Visiškas ragenos susidrumstimas; rainelės nematyti

42. Vidutinė fluoresceino sulaikymo vertė visoms bandomosioms akims apskaičiuojama tik po 30 minučių nuo stebėjimo pradžios; pagal šią vertę nustatoma kiekvienos bandomosios medžiagos bendra kategorinė vertė (2 lentelė).

2 lentelė

Fluoresceino sulaikymo vertės

Vertė	Stebėjimo išvados
0	Fluoresceino sulaikymo nepastebėta
0,5	Labai mažas sulaikymas pavienėse ląstelėse
1	Sulaikymas pavienėse ląstelėse, išsidėsčiusiose per visą apdorotą ragenos plotą
2	Sulaikymas sutelktuose arba susisiekiančiuose pavienių ląstelių plotuose
3	Fluoresceino sulaikymas dideliuose susisiekiančiuose ragenos plotuose

▼M2

43. Morfologinis poveikis apima ragenos epitelio ląstelių „išopėjimą“, epitelio „atsilaisvinimą“, ragenos paviršiaus „šiurkštėjimą“ ir bandomosios medžiagos „prilipimą“ prie ragenos. Šių požymių lygis gali būti įvairus, požymiai gali pasireikšti kartu. Šių požymių klasifikavimas yra subjektyvus, priklauso nuo tyrėjo interpretacijos.

DUOMENYS IR JŲ TEIKIMAS

Duomenų vertinimas

44. Nustatant kiekvieno ICE bandymų metu gauto rezultato kategoriją, ragenų padrumstėjimo, pabrinkimo ir fluoresceino sulaikymo matavimo rezultatai turėtų būti vertinami atskirai. Tada visų ICE bandymų rezultatų kategorijos susumuojamos ir nustatoma kiekvienos bandomosios medžiagos dirginimo kategorija.

Sprendimo kriterijai

45. Įvertinus kiekvieną rezultatą, remiantis iš anksto nustatytais intervalais, galima nustatyti ICE kategorijas. Ragenos storio (3 lentelė), padrumstėjimo (4 lentelė) ir fluoresceino sulaikymo (5 lentelė) rezultatai aiškinami pagal šias skales:

3 lentelė

ICE klasifikavimo kriterijai atsižvelgiant į ragenos storį

Vidutinis ragenos pabrinkimas (proc.) (*)	ICE kategorija
0–5	I
Daugiau kaip 5, bet ne daugiau kaip 12	II
Daugiau kaip 12, bet ne daugiau kaip 18 (praėjus daugiau kaip 75 min. nuo apdorojimo)	II
Daugiau kaip 12, bet ne daugiau kaip 18 (praėjus ne daugiau kaip 75 min. nuo apdorojimo)	III
Daugiau kaip 18, bet ne daugiau kaip 26	III
Daugiau kaip 26, bet ne daugiau kaip 32 (praėjus daugiau kaip 75 min. nuo apdorojimo)	III
Daugiau kaip 26, bet ne daugiau kaip 32 (praėjus ne daugiau kaip 75 min. nuo apdorojimo)	IV
Daugiau kaip 32	IV

(*) Ragenų pabrinkimo vertės naudojamos tik tada, kai storis matuojamas naudojant *Haag-Streit BP900* mikroskopą su plyšine lempa su gylio matuokliu Nr. I ir nustačius plyšio plotį ties rodmeniu 9½, atitinkančiu 0,095 mm. Naudotojams reikėtų žinoti, kad naudojant mikroskopus su plyšine lempa gauti ragenų storio duomenys gali skirtis, jeigu bus pasirinktas nevienodas plyšio plotis.

4 lentelė

ICE klasifikavimo kriterijai atsižvelgiant į padrumstėjimą

Vidutinė didžiausia padrumstėjimo vertė (*)	ICE kategorija
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–4,0	IV

(*) Žr. 1 lentelę.

▼M2

5 lentelė

ICE klasifikavimo kriterijai atsižvelgiant į vidutinį fluoresceino sulaikymą

Vidutinė fluoresceino sulaikymo vertė praėjus 30 min. nuo apdorojimo (*)	ICE kategorija
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–3,0	IV

(*) Žr. 2 lentelę.

46. Bendra bandomosios medžiagos *in vitro* dirginimo kategorija nustatoma pagal dirginimo klasifikatorių, kuriuo apibendrinamos nustatytos ragenų pabrinkimo, padrumstėjimo ir fluoresceino sulaikymo kategorijos pagal 6 lentelėje pateiktą sistemą.

6 lentelė

Bendrosios *in vitro* dirginimo kategorijos

Kategorija	Trijų rezultatų deriniai
Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti cheminė medžiaga	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Ragenos drumstis po 30 min. ne mažesnė kaip 3 (ne mažiau kaip dviejų akių) Ragenos drumstis kuriuo nors laiko momentu yra lygi 4 (ne mažiau kaip dviejų akių) Didelis epitelio susilpnėjimas (bent vienos akies)

(*) Retai pasitaikantys deriniai.

47. Kaip nurodyta 1 skirsnyje, jeigu nenustatoma, kad cheminė medžiaga yra akis ėsdinanti arba stipriai dirginanti medžiaga, klasifikavimo ir ženklinimo tikslais turėtų būti atlikti papildomi bandymai. Lyginant su triušio akies *in vivo* bandymo metodo duomenimis, klasifikuojamais pagal EPA (1), ES (2) arba GHS (3) klasifikavimo sistemas, bendras ICE bandymo metodo tikslumas nustatant akis ėsdinančias ir stipriai dirginančias medžiagas yra nuo 83 % (120/144) iki 87 % (134/154), klaidingai teigiamų rezultatų dalis – nuo 6 % (7/122) iki 8 % (9/116), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – nuo 41 % (13/32) iki 50 %. (15/30). Iš duomenų bazės pašalinus tam tikrų cheminių (pvz., alkoholius ir aktyviąsias paviršiaus medžiagas) arba fizikinių (pvz., kietąsias medžiagas) klasių chemines medžiagas, ICE bandymo metodo tikslumas pagal ES, EPA ir GHS klasifikavimo sistemas yra nuo 91 % (75/82) iki 92 % (69/75), klaidingai teigiamų rezultatų dalis – nuo 5 % (4/73) iki 6 % (4/70), klaidingai neigiamų rezultatų dalis – nuo 29 % (2/7) iki 33 % (3/9) (4).

48. Net jeigu bandomoji medžiaga nepriskiriama akis ėsdinančių arba stipriai dirginančių medžiagų kategorijai, ICE bandymų duomenys, naudojami kartu su triušio akies *in vivo* bandymo arba deramai patvirtinto *in vitro* bandymo duomenimis, gali būti naudingi toliau vertinant ICE bandymų, kuriais siekiama nustatyti silpnai dirginančias ir nedirginančias medžiagas, metodo naudingumą ir apribojimus (šiuo metu rengiamos toksiškumo akims *in vitro* bandymų metodų rekomendacinis dokumentas).

▼M2

Tyrimo priimtinumo kriterijai

49. Tyrimas laikomas priimtinu, jeigu kartu naudojant neigiamą kontrolinę grupę, tirpiklio (nešiklio) kontrolinę grupę ir teigiamą kontrolinę grupę, nustatoma, kad cheminė medžiaga atitinkamai priskirtina nedirginančių medžiagų arba stipriai dirginančių ir (arba) ėsdinančių medžiagų kategorijai.

Bandymo ataskaita

50. Bandymų ataskaitoje turėtų būti pateikta toliau nurodyta informacija, jeigu ji yra svarbi atlikto tyrimo atžvilgiu.

Bandomosios ir kontrolinės medžiagos

Cheminės medžiagos pavadinimas (-ai), pvz., Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos (angl. *Chemical Abstracts Service*, CAS) naudojamas struktūrinis pavadinimas ir kiti pavadinimai, jeigu jie žinomi;

CAS registracijos numeris (RN), jeigu jis žinomas;

cheminės medžiagos arba mišinio grynumas ir sudėtis (masės procentinėmis dalimis), kiek tai žinoma remiantis turima informacija;

tyrimui svarbios fizikinės ir cheminės savybės, pvz., fizinis būvis, lakumas, pH, stabilumas, cheminės medžiagos klasė, tirpumas vandenyje;

bandomosios ir (arba) kontrolinės medžiagos apdorojimas prieš bandymą, jeigu tai atliekama (pvz., pašildymas, sumalimas);

stabilumas, jeigu jis žinomas.

Informacija apie rėmėją ir bandymų laboratoriją

Rėmėjo pavadinimas ir adresas, bandymų laboratorija ir tyrimo vadovas;

informacija apie akių šaltinį (pvz., vieta, kurioje buvo paimtos akys);

akių laikymo ir gabenimo sąlygos (pvz., akių surinkimo data ir laikas, laiko-tarpis iki bandymų pradžios);

jeigu yra informacijos, specifinės gyvūnų, iš kurių buvo paimtos akys, charakteristikos (pvz., gyvūno, kurio akys buvo paimtos, amžius, lytis, svoris).

Taikyto bandymo metodo ir protokolo pagrindimas

Bandymo metodo integralumas

Bandymo metodo integralumo (t. y. tikslumo ir patikimumo) užtikrinimo per tam tikrą laiką procedūra (pvz., periodiniai bandymai su patikros cheminėmis medžiagomis, istorinių duomenų apie neigiamas ir teigiamas kontrolines medžiagas naudojimas).

Bandymo priimtinumo kriterijai

Jeigu turima, priimtini kartu naudojamų lyginamųjų kontrolinių medžiagų poveikio intervalai, pagrįsti istoriniais duomenimis.

Bandymo sąlygos

Taikytos bandymo sistemos aprašas;

naudotas mikroskopas su plyšine lempa(pvz., modelis);

naudoto mikroskopo su plyšine lempa instrumentinės nuostatos;

informacija apie naudotas vištų akis, įskaitant informaciją apie jų kokybę;

▼M2

išsami informacija apie taikytą bandymo metodiką;

naudota (-os) bandomosios medžiagos koncentracija (-os);

bandymo metodikos pakeitimų, jeigu jų buvo padaryta, aprašas;

informacija apie istorinius duomenis, gautus taikant šį modelį (pvz., neigiamos ir teigiamos kontrolinės medžiagos, patikros cheminės medžiagos, lyginamosios cheminės medžiagos);

taikytų vertinimo kriterijų aprašas.

Rezultatai

Kitų nustatytų poveikių apibūdinimas;

akies nuotraukos, jeigu reikia.

Aptarimas ir rezultatai

Išvada

LITERATŪRA

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(2) 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.

(3) United nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Paskelbta:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

(4) 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. Paskelbta:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(5) 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. Paskelbta:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(6) EB (2006). 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.

(7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Paskelbta:

[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

▼**M2**

(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE 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. Paskelbta:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(9) ICCVAM. (2006). 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. Paskelbta:

[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) INVITTOX (1994). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET). Paskelbta:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(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.

(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) 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. Paskelbta:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf].

(16) 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.

(17) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼**M2**

(18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method.

Paskelbta: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

(19) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Paskelbta:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

▼M2

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių sutapimo artumas. Tikslumas yra bandymo metodo naudojimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas pakaitomis su terminu „sutapimas“ reikšme „tinkamų bandymo metodo rezultatų dalis“.

Lyginamoji cheminė medžiaga – cheminė medžiaga, naudojama kaip standartas, su kuriuo lyginama bandomoji medžiaga. Lyginamoji cheminė medžiaga turi turėti tokias savybes: i) tinkamą (-us) ir patikimą (-us) šaltinį (-ius); ii) jos struktūrinės ir funkcinės savybės turi būti panašios į bandomųjų medžiagų kategorijos savybes; iii) turi būti žinomos jos fizikinės ir cheminės savybės; iv) turi būti duomenų, patvirtinančių žinomą poveikį; v) turi būti žinomas jos stiprumas pageidaujamo atsako intervalo ribose.

Ragena – permatoma priekinė akies obuolio dalis, dengianti rainelę bei vyzdį ir praleidžianti šviesą į vidų.

Ragenos padrumstėjimas – išmatuota ragenos padrumstėjimo vertė, gauta rageną baigus veikti bandomąja medžiaga. Padidėjusi ragenos drumstis rodo ragenos pažeidimą.

Ragenos pabrinkimas – objektyvi per ICE bandymą nustatoma ragenos išsipūtimo lygio vertė, gauta rageną baigus veikti bandomąja medžiaga. Išreiškiamas procentais ir apskaičiuojamas remiantis išmatuotu pamatiniu (nustatytu prieš skiriant dozę) ragenos storiu ir ragenos storiu, vienodais intervalais užregistruotu rageną baigus veikti bandomąja medžiaga per ICE bandymą. Ragenos pabrinkimo lygis rodo ragenos pažeidimą.

EPA 1 kategorija – ėsdinimas (negrįžtamas akies audinio suardymas) arba ragenos pakenkimas arba dirginimas, trunkantis ilgiau kaip 21 dieną (1).

ES R41 kategorija – akies audinio pažeidimas arba smarkus fizinis regėjimo pablogėjimas, ant išorinio akies paviršiaus uždėjus bandomosios medžiagos, iki galo nepraeinantis per 21 dieną nuo uždėjimo (2).

Klaidingai neigiamų rezultatų dalis – visų teigiamų medžiagų, kurios taikant bandymo metodą buvo klaidingai identifikuotos kaip neigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo metodo naudojimo charakteristikų rodiklių.

Klaidingai teigiamų rezultatų dalis – visų neigiamų medžiagų, kurios taikant bandymo metodą buvo klaidingai identifikuotos kaip teigiamos, dalis. Tai yra vienas iš bandymo metodo naudojimo charakteristikų rodiklių.

Fluoresceino sulaikymas – per ICE bandymą subjektyviai nustatomas fluoresceino natrio druskos kiekis, išlikęs ragenos epitelio ląstelėse, rageną baigus veikti bandomąja medžiaga. Fluoresceino sulaikymo laipsnis rodo ragenos epitelio pažeidimą.

GHS (Visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistema) – sistema, kurioje pateikiama cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikacija 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 (3).

▼M2

GHS 1 kategorija – akies audinio pažeidimas arba smarkus fizinis regėjimo pablogėjimas, ant išorinio akies paviršiaus uždėjus bandomosios medžiagos, iki galo nepraeinantis per 21 dieną nuo uždėjimo (3).

Pavojus – medžiagos savybė arba aplinkybės, dėl kurių organizmui, sistemai arba populiacijai (arba jos daliai), kurią veikia toji medžiaga, gali būti padarytas kenksmingas poveikis.

Neigiamas kontrolinis mėginys – bandomąja medžiaga neapdorota mėginio kopija, turinti visas sudedamąsias bandymo sistemos dalis. Šis mėginys tiriamas kartu su bandomąja medžiaga paveiktais mėginiais ir kitais kontroliniais mėginiais, siekiant nustatyti, ar tirpiklis veikia bandymo sistemą.

Nedirginančios medžiagos – cheminės medžiagos, nepriskiriamos EPA I, II arba III kategorijos, ES R41 arba R36 kategorijos arba GHS 1, 2A arba 2B kategorijos akis dirginančioms medžiagoms (1) (2) (3).

Akis ėsdinanti medžiaga – a) cheminė medžiaga, negrįžtamai suardanti akies audinį; b) cheminės medžiagos, priskiriamos GHS 1 kategorijos, EPA I kategorijos arba ES R41 kategorijos akis dirginančioms medžiagoms (1) (2) (3).

Akis dirginanti medžiaga – a) cheminė medžiaga, kuri, uždėta ant priekinio akies paviršiaus, sukelia grįžtamus akies pažeidimus; b) cheminės medžiagos, priskiriamos EPA II arba III kategorijos, ES R36 kategorijos arba GHS 2A arba 2B kategorijos akis dirginančioms medžiagoms (1) (2) (3).

Akis stipriai dirginanti medžiaga – a) cheminė medžiaga, kuri, uždėta ant priekinio akies paviršiaus, sukelia akies audinio pažeidimus, nepraeinančius per 21 dieną nuo tos medžiagos uždėjimo, arba sukelia didelį fizinį regos pablogėjimą; b) cheminės medžiagos, priskiriamos GHS 1 kategorijos, EPA I kategorijos arba ES R41 kategorijos akis dirginančioms medžiagoms (1) (2) (3).

Teigiamas kontrolinis mėginys – mėginio kopija, turinti visas sudedamąsias bandymo sistemos dalis ir apdorota chemine medžiaga, kuri, kaip yra žinoma, sukelia teigiamą atsaką. Norint užtikrinti galimybę įvertinti atsako į teigiamą kontrolinę medžiagą kaitą per tam tikrą laiką, dirginamasis poveikis neturėtų būti pernelyg stiprus.

Patikimumas – bandymo metodo, taikomo pagal tą patį protokolą, atkuriamumo toje pačioje laboratorijoje ir kitose laboratorijose matas. Patikimumas įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų ir pakartojamumą laboratorijoje.

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 vištos akies priekinėms sudedamosios dalims apžiūrėti ir ragenos storiui objektyviai išmatuoti pritaisytu gylio matavimo prietaisu.

Tirpiklio (nešiklio) kontrolinis mėginys – neapdorotas mėginys, turintis visas sudedamąsias bandymo sistemos dalis, įskaitant tirpiklį (nešiklį), kuris tiriamas kartu su bandomąja medžiaga apdorotais mėginiais ir kitais kontroliniais mėginiais, siekiant nustatyti pamatinį mėginių, apdorotų tuo pačiu tirpikliu (nešikliu), atsaką. Atliekant bandymą kartu su neigiamu kontroliniu mėginiu, šis mėginys taip pat parodo, ar tirpiklis (nešiklis) veikia bandymo sistemą.

▼M2

Pakopiniai bandymai – nuosekli bandymo metodika, pagal kurią tam tikra eilės tvarka nagrinėjama visa turima informacija apie bandomąją medžiagą, kiekvienoje pakopoje taikant įrodomosios duomenų galios metodiką siekiant nustatyti, ar yra pakankamai duomenų sprendimui dėl pavojingumo kategorijos priimti, prieš pereinant prie kitos pakopos. Jeigu bandomosios medžiagos gebą dirginti akis galima nustatyti remiantis turima informacija, papildomų bandymų atlikti nereikia. Jeigu bandomosios medžiagos dirginamosios gebos nustatyti remiantis turima informacija negalima, taikoma nuosekli gyvūnų bandymo metodika, kol gaunami duomenys, kuriais remiantis galima aiškiai nustatyti tos medžiagos kategoriją.

Patvirtintas bandymo metodas – bandymo metodas, kurio patvirtinimo tyrimai buvo atlikti siekiant nustatyti jo tinkamumą (įskaitant tikslumą) ir patikimumą konkrečiai paskirčiai. Svarbu atkreipti dėmesį, kad patvirtintas bandymo metodas gali būti nepakankamai tikslus ir patikimas, kad jį būtų galima pripažinti tinkamu siūlomai paskirčiai.

Įrodomoji duomenų galia – metodika, pagal kurią vertinamos tam tikrų informacijos dalių privalumai ir trūkumai, siekiant priimti ir pagrįsti sprendimą dėl cheminės medžiagos pavojingumo.

▼M2

2 priedėlis

PATIKROS CHEMINĖS MEDŽIAGOS ICE BANDYMŲ METODO ATVEJU

Prieš pradėdamos sistemingai taikyti bandymo metodą, susijusį su šiomis bandymų gairėmis, laboratorijos gali pageidauti įsitikinti savo techniniu tinkamumu pamėgindamos teisingai nustatyti dešimties 1 lentelėje siūlomų cheminių medžiagų akių ėsdinimo kategoriją. Šios cheminės medžiagos parinktos atsižvelgiant į įvairų vietinio akies dirginimo ir (arba) ėsdinimo atsaką, pagrįstą triušio akies *in vivo* bandymo rezultatais (TG 405) (t. y. JT GHS 1, 2A, 2B kategorijos arba „Neklasifikuojama arba neženklinama“) (3) (7). Tačiau, atsižvelgiant į patvirtintą šių bandymų naudingumą (t. y. tik nustatyti akis ėsdinančias ir (arba) stipriai dirginančias medžiagas), klasifikavimui aktualūs rezultatai, susiję su techninio tinkamumo pasitikrinimu, yra tik du (ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti arba neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti medžiaga). Kiti atrankos kriterijai yra šie: cheminės medžiagos turi būti parduodamos rinkoje, turi būti kokybiškų *in vivo* pamatinių duomenų ir turi būti kokybiškų duomenų apie abu *in vitro* metodus, apie kuriuos yra rengiamos bandymų gairės. Dėl šios priežasties dirginančios cheminės medžiagos buvo atrinktos iš ICCVAM rekomenduojamų 122 etaloninių cheminių medžiagų, skirtų *in vitro* toksiškumo akims bandymo metodams patvirtinti, sąrašo (žr. H priedėlyje pateiktą ICCVAM rekomenduojamų etaloninių cheminių medžiagų sąrašą) (4). Pamatiniai duomenys pateikti ICCVAM istorinės apžvalgos dokumentuose, skirtuose galvijų ragenos padrumstėjimo ir pralaidumo (BCOP) ir ICE bandymo metodams (17) (18).

1 lentelė

ICE bandymų metodo atveju rekomenduojamos patikros cheminės medžiagos

Cheminė medžiaga	CASNR	Cheminės medžiagos klasė (1)	Fizinis būvis	*In vivo* kategorija (2)	*In vitro* kategorija (3)
Benzalkonio chloridas (5 %)	8001-54-5	Onio junginys	Skysta	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
Chlorheksidinas	55-56-1	Aminas, amidinas	Kieta	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
Dibenzoil-L-vyno rūgštis	2743-38-6	Karboksirūgšties esteris	Kieta	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
Imidazolas	288-32-4	Heterociklinis junginys	Kieta	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
Trichloracto rūgštis (30 %)	76-03-9	Karboksirūgštis	Skysta	1 kategorija	Ėsdinanti ir (arba) stipriai dirginanti
2,6-dichlorbenzoil-chloridas	4659-45-4	Acilhalogenidas	Skysta	2A kategorija	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti
Etil-2-metil acetoacetatas	609-14-3	Ketonas, esteris	Skysta	2B kategorija	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti
Amonio nitratas	6484-52-2	Neorganinė druska	Kieta	2A kategorija	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti

▼M2

Cheminė medžiaga	CASNR	Cheminės medžiagos klasė (1)	Fizinis būvis	*In vivo* kategorija (2)	*In vitro* kategorija (3)
Glicerinas	56-81-5	Alkoholis	Skysta	Neženklinama	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti
n-heksanas	110-54-3	Angliavandenilis (aciklinis)	Skysta	Neženklinama	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti

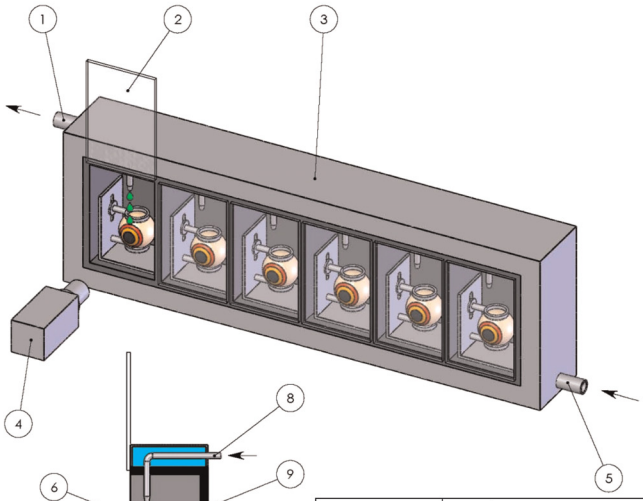
Santrumpos: CASRN – Cheminių medžiagų pavadinimų santrumpų tarnybos registracijos numeris.
(1) Cheminės klasės kiekvienai bandomajai medžiagai priskirtos taikant standartinę klasifikavimo sistemą, remiantis Nacionalinės medicinos bibliotekos medicinos objektų pavadinimų (MeSH) klasifikavimo sistema (paskelbta http//www.nlm.nih.gov/mesh).
(2) Remiantis rezultatais, gautais atlikus triušio akies *in vivo* bandymą (OECD TG 405), ir taikant JT GHS (3)(7).
(3) Remiantis BCOP ir ICE rezultatais.

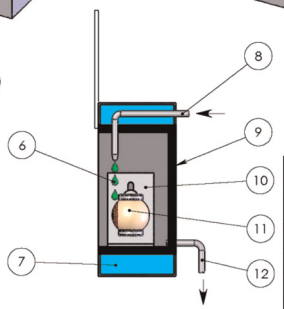
▼M2

3 priedėlis

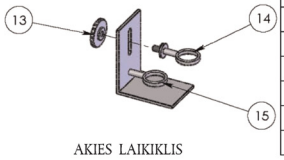
ICE superfuzijos aparato ir akių dėklų schemos

(Daugiau bendrosios informacijos apie superfuzijos aparatą ir akies dėklą pateikta Burton et al. (17))





SKERSINIS KAMEROS PJŪVIS



AKIES LAIKIKLIS

SUDEDAMOSIOS DALIES NUMERIS	APRAŠYMAS
1	ŠILTO VANDENS IŠLEIDIMO ANGA
2	STUMDOMOSIOS DURELĖS
3	SUPERFUZIJOS APARATAS
4	OPTINIS MATAVIMO PRIETAISAS
5	ŠILTO VANDENS ĮLEIDIMO ANGA
6	DRUSKOS TIRPALAS
7	ŠILTAS VANDUO
8	DRUSKOS TIRPALO ĮLEIDIMO ANGA
9	KAMERA
10	AKIES LAIKIKLIS
11	VIŠTOS AKIS
12	DRUSKOS TIRPALO IŠLEIDIMO ANGA
13	NUSTATYMO VERŽLĖ
14	REGULIUOJAMA VIRŠUTINĖ RANKENA
15	NEJUDAMA APATINĖ RANKENA

▼M3

B.49. *IN VITRO* ŽINDUOLIŲ LĄSTELĖS MIKROBRANDUOLIO BANDYMAS

ĮVADAS

1. *In vitro* mikrobranduolio (MNvit) tyrimas yra genotoksiškumo bandymas, skirtas tarpfazinių ląstelių citoplazmos mikrobranduoliams (angl. *micronuclei*, MN) aptikti. Mikrobranduoliai gali susidaryti iš acentrinių chromosomų fragmentų (t. y. neturinčių centromeros) arba ištisų chromosomų, kurie ląstelių dalijimosi anafazės etapu negali migruoti link polių. Šiuo tyrimu aptinkamas klastogeninių ir aneugeninių cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) (1) (2) aktyvumas ląstelėse, kurios dalijosi veikiant bandomąja medžiaga arba po veikimo. Pagal šį bandymo metodą (BM) galima naudoti protokolus su aktino polimerizacijos inhibitoriumi citochalazinu B (citoB) arba be jo. CitoB pridėjimas prieš tikslinę mitozę suteikia galimybę atpažinti ir selektyviai analizuoti mikrobranduolių dažnumą ląstelėse, kuriose įvyko viena mitozė, nes tokios ląstelės turi du branduolius (3) (4). Pagal šį bandymo metodą taip pat galima naudoti protokolus be citokenezės blokavimo, jei yra įrodymų, kad analizuojamoje ląstelių populiacijoje įvyko mitozė.

2. Be MNvit tyrimo naudojimo cheminėms medžiagoms (medžiagoms ir mišiniams), kurios indukuoja mikrobranduolius, atpažinti, citokinezės blokavimo, imunocheminio kinetochorų ženklinimo arba hibridizacijos su centromeriniais/telomeriniais zondais (fluorescencinė *in situ* hibridizacija (FISH)) naudojimas taip pat gali suteikti informacijos apie chromosomų pažeidimo ir mikrobranduolių formavimosi mechanizmus (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Ženklinimo ir hibridizacijos procedūras galima taikyti, kai yra padidėjęs mikrobranduolių formavimasis ir tyrėjas nori nustatyti, ar tą padidėjimą sukėlė klastrogeniniai ir (arba) aneugeniniai reiškiniai.

3. Mikrobranduoliai parodo pažeidimą, kuris buvo perduotas dukterinėms ląstelėms, o metafazės ląstelėse užfiksuotos chromosomų aberacijos negali būti perduodamos. Kadangi mikrobranduolius inferfazės ląstelėse galima įvertinti palyginti objektyviai, laboratorijos darbuotojai turi tik nustatyti, ar įvyko ląstelių dalijimasis ir kiek ląstelių turi mikrobranduolį. Todėl preparatai gali būti įvertinti palyginti sparčiai ir analizė gali būti automatizuota. Todėl vienos operacijos metu įmanoma įvertinti ne šimtus, o tūkstančius ląstelių, todėl tyrimo našumas padidėja. Galiausiai, kadangi mikrobranduoliai gali susidaryti chromosomoms įgaunant pirminę struktūrą („išnykstant“), yra galimybė aptikti aneuploidiją sukeliančias medžiagas, kurias sunku tyrinėti įprastais chromosomų aberacijos bandymais, pvz., OECD bandymų metodika 473 (šio priedo B.10 skyrius) (17). Vis dėlto MNvit tyrimas nesuteikia galimybės atskirti poliploidiją sukeliančias chemines medžiagas nuo sukeliančių klastogeniškumą, jei netaikoma speciali metodika, pvz., FISH, aprašyta 2 pastraipoje.

4. MNvit tyrimas yra *in vitro* metodas, kuriame paprastai naudojamos kultivuotos žmogaus arba graužikų ląstelės. Jis suteikia išsamų pagrindą ištyrinėti chromosomų pažeidimo potencialią *in vitro*, kadangi galima aptikti tiek aneugenus, tiek klastogenus.

5. MNvit tyrimas yra patikimas ir veiksmingas įvairių tipų ląstelėms ir esant citoB arba jo nesant. Yra daug duomenų, patvirtinančių MNvit tyrimo tinkamumą naudojant įvairias graužikų ląstelių linijas (CHO, V79, CHL/IU ir L5178Y) ir žmogaus limfocitus (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Pirmiausia tai yra tarptautiniai tinkamumo patvirtinimo tyrimai, kuriuos koordinavo Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22), ir tarptautinio genotoksiškumo bandymų seminaro ataskaitos (4) (16). Turimi duomenys buvo pakartotinai įvertinti įrodymų visumos retrospektyviniu tinkamumo patvirtinimo tyrimu, kurį atliko Europos Komisijos Europos alternatyvių

▼M3

metodų tinkamumo patvirtinimo centras (ECVAM), o ECVAM mokslinis patariamasis komitetas (ESAC) patvirtino tyrimo metodą kaip moksliškai patikimą (32) (33) (34). Buvo aprašytas žmogaus TK6 limfoblastų linijos (35), HepG2 ląstelių (36) (37) ir pagrindinių Sirijos žiurkėno embrioninių ląstelių (38) naudojimas, nors jos nebuvo naudojamos tinkamumo patvirtinimo tyrimuose.

APIBRĖŽTYS

6. Vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI

7. Bandymus atliekant *in vitro* paprastai reikia naudoti egzogeninį metabolinio suaktyvinimo šaltinį, nebent ląstelės yra metaboliškai pajėgios bandomųjų medžiagų atžvilgiu. Egzogeninė metabolinio suaktyvinimo sistema nevisiškai atkartoja *in vivo* sąlygas. Taip pat reikia pasirūpinti išvengti sąlygų, dėl kurių būtų gauti dirbtinai teigiami rezultatai, kurie neperteikia būdingo mutageniškumo ir gali atsirasti dėl tokių veiksnių kaip ryškūs pH ar osmoliškumo pokyčiai arba aukštas citoksiškumo lygis (39) (40) (41). Jei bandomoji cheminė medžiaga pridėjimo metu sukelia pH pokytį terpėje, pH turi būti pakoreguotas, geriausia – pagrindinio tirpalo buferiu, kad visi kiekiai esant bandomajai koncentracijai, ir visų kontrolinių medžiagų rodikliai išliktų tokie patys.

8. Mikrobranduolių indukcijai analizuoti svarbiausia, kad tiek paveiktose, tiek nepaveiktose kultūrose būtų įvykusi mitozė. Informatyviausias mikrobranduolių vertinimo etapas vyksta ląstelėse, kuriose veikiant bandomąja medžiaga arba po to įvyko viena mitozė.

BANDYMO PRINCIPAS

9. Žmogaus arba žinduolių kilmės ląstelių kultūros veikiamos bandomąja medžiaga tiek naudojant egzogeninį metabolinio suaktyvinimo šaltinį, tiek jo nenaudojant, nebent naudojamos pakankamos metabolizacinės gebos ląstelės. Visuose bandymuose naudojamas lygiagretus tirpiklis/nešiklis (VC) ir teigiamo poveikio kontrolinės cheminės medžiagos (PC).

10. Veikiant bandomąja medžiaga arba po to ląstelės auginamos pakankamą laikotarpį, kad įvyktų chromosomos arba verpstės pažeidimas, dėl kurio interfazinėse ląstelėse imtų formuotis mikrobranduoliai. Aneuploidijai indukuoti bandomoji medžiaga paprastai turi veikti mitozės metu. Surinktos ir nudažytos interfazinės ląstelės analizuojamos ieškant mikrobranduolių. Geriausia, jei mikrobranduoliai vertinami tik tose ląstelėse, kuriose mitozė baigta veikiant bandomąja medžiaga arba laikotarpiu po veikimo, jei toks taikomas. Citokinezės blokatoriumi paveiktose kultūrose tai pasiekiama vertinant tik dvibranduolines ląsteles. Jei nėra citokinezės blokatoriaus, svarbu įrodyti, kad analizuotos ląstelės greičiausiai būtų besidalijusios veikiant bandomąja medžiaga arba po to. Pagal visus protokolus svarbu įrodyti, kad ląstelių proliferacija įvyko tiek kontrolinėje, tiek paveiktoje kultūrose, ir bandomosios medžiagos sukeltą citotoksiškumą arba citostazę reikia įvertinti kultūrose (arba lygiagrečiose kultūrose), kuriose įvertinti mikrobranduoliai.

▼M3

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Preparatai

11. Galima naudoti kultivuotus pagrindinius žmogaus periferinius kraujo limfocitus (5) (19) (42) (43) ir keletą graužikų ląstelių linijų, pvz., CHO, V79, CHL/IU ir L5178Y ląsteles (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Kitų ląstelių linijų ir tipų naudojimas turi būti pagrįstas remiantis įrodytomis jų naudojimo charakteristikomis tyrime, kaip aprašyta priimtinumo kriterijų skyriuje. Kadangi tyrimo jautrumui turės poveikį foninis mikrobranduolių dažnis, rekomenduojama naudoti ląstelių tipus, pasižyminčius žemu ir stabiliu mikrobranduolių formavimosi foniniu dažniu.

12. Žmogaus periferiniai kraujo limfocitai turi būti gauti iš jaunų (maždaug 18–35 metų amžiaus), sveikų, nerūkančių asmenų, kurie neseniai žinomai nebuvo paveikti genotiksiškomis cheminėmis medžiagomis ar spinduliuote. Jei ląstelės naudojimui surenkamos daugiau kaip iš vieno donoro, turi būti nurodytas donorų skaičius. Mikrobranduolių dažnis didėja su amžiumi ir ši tendencija ryškesnė moteryse, nei vyruose (44) ir į tai turi būti atsižvelgta parenkant kelių donorų ląsteles.

Terpės ir kultūros sąlygos

13. Kultūroms palaikyti turi būti naudojama atitinkama kultūrų terpė ir inkubacijos sąlygos (indai su kultūromis, CO_2 koncentracija ir drėgmė). Nustatytos ląstelių linijos ir atmainos turi būti reguliariai tikrinamos, ar nesikeičia modalinis chromosomų skaičius ir nėra užteršimo mikoplazma, o užsiteršus arba pakitus modaliniam chromosomų skaičiui neturi būti naudojamos. Turi būti žinomas normali ląstelių ciklo trukmė taikomomis kultūros sąlygomis bandymus atliekančioje laboratorijoje. Jei naudojamas citokinezės blokavimo metodas, citokinezės inhibitoriaus koncentracija turi būti optimizuota konkrečiam ląstelių tipui ir užtikrinti gerą dvibranduolinių ląstelių gamybą įvertinimui atlikti.

Kultūrų paruošimas

14. Nustatytos ląstelių linijos ir atmainos: ląstelės paskleidžiamas iš pradinių kultūrų, pasėjamos kultūros terpėje tokiu tankiu, kad kultūros nepasiektų monosluoksnių susiliejimo, o suspensijų kultūros nepasiektų per didelio tankio prieš surinkimo laiką, ir inkubuojamos 37 °C temperatūroje.

15. Limfocitai: antikoaguliantu (pvz., heparinu) apdorotas kraujas arba atskirti limfocitai kultivuojami esant mitogenui, pvz., fitohemaglutininui (PHA), prieš paveikiant bandomąja medžiaga ir citoB.

Metabolinis suaktyvinimas

16. Kai naudojamos nepakankamo endogeninio metabolinio pajėgumo ląstelės, turi būti naudojamos egzogeninės metabolizavimo sistemos. Dažniausiai naudojama sistema yra kofaktoriumi papildyta pomitochondrinė frakcija (S9), paruošta iš graužikų kepenų, apdorota fermentus indukuojančiomis medžiagomis, pvz., „Aroclor 1254“ (45) (46), arba fenobarbitono ir β-naftoflavono deriniu (46) (47) (48) (49). Pastarasis derinys neprieštarauja Stokholmo konvencijai dėl patvariųjų organinių teršalų (50) ir Reglamentui (EB) Nr. 850/2004 dėl patvariųjų organinių teršalų (66) ir įrodyta, kad jis toks pat veiksmingas kaip „Aroclor 1254“ indukuojant mišrios funkcijos oksidazes (46) (47) (48) (49). S9 frakcija paprastai naudojama 1–10 % (tūrio dalys) koncentracijos galutinėje bandymo terpėje. Metabolinio suaktyvinimo sistemos būsena gali priklausyti nuo bandomos cheminės medžiagos klasės ir kai kuriais atvejais gali būti tikslinga naudoti daugiau kaip vieną S9 koncentraciją.

▼M3

17. Naudojant genetiškai modifikuotas ląstelių linijos, išreiškiančias tam tikrus žmogaus arba graužikų aktyvinančius fermentus, gali nebereikėti egzogeninės metabolinio suaktyvinimo sistemos ir jos gali būti naudojamos kaip bandomosios ląstelės. Tokiais atvejais ląstelių linijų parinkimas turi būti moksliškai pagrįstas, pvz., mišriosios funkcijos oksidazių tinkamumu bandomosios medžiagos metabolizmui (51) ir jų reagavimu į žinomus klastogenus ir aneugenus (žr. atskirą skyrių apie priimtinumo kriterijus). Reikia pripažinti, kad bandomosios medžiagos gali nepavykti metabolizuoti išreikštos mišrios funkcijos oksidaze (-ėmis); tokiu atveju neigiami rezultatai nerodytų, kad bandomoji medžiaga negali indukuoti mikrobranduolių.

Bandomosios medžiagos paruošimas

18. Prieš apdorojant ląsteles, kietosios cheminės medžiagos ištirpinamos atitinkamuose tirpikliuose arba nešikliuose ir, jei reikia, atskiedžiamos. Skystos medžiagos gali būti pilamos tiesiai į bandymo sistemas ir (arba) prieš apdorojimą atskiedžiamos. Dujos ar lakiosios cheminės medžiagos turi būti bandomos atitinkamai pakeitus standartinius protokolus, pvz., apdorojant sandariuose induose (52) (53). Turi būti naudojama šviežiai paruošta bandomoji medžiaga, nebent stabilumo duomenys rodo, kad ją galima laikyti ilgesnį laiką.

Bandymo sąlygos

Tirpikliai / nešikliai:

19. Naudojamos koncentracijos tirpiklis / nešiklis neturi reaguoti su bandomąja medžiaga arba būti nesuderinamas su ląstelių išgyvenimu arba S9 veiklos palaikymu. Jei naudojamas kitas nei dažniausiai naudojamas tirpiklis / nešiklis (pvz., vanduo, ląstelių kultūros terpė, dimetilo sulfoksidas), jų naudojimas turi būti pagrįstas duomenimis, rodančiais jų suderinamumą su bandomąja medžiaga ir genetinio toksiškumo nebuvimą. Rekomenduojama, kad, kai įmanoma, pirmiausia būtų įvertinta galimybė naudoti vandeninį tirpiklį / nešiklį.

CitoB kaip citokinezės blokatoriaus naudojimas

20. Vienas iš svarbiausių MNvit tyrimo naudojimo charakteristikų aspektų yra užtikrinimas, kad vertinamos ląstelės poveikio metu arba laikotarpiu po poveikio, jei toks taikomas, būtų baigusios mitozę. CitoB yra medžiaga, kuri plačiausiai naudojama citokinezei blokuoti, nes slopina aktino susijungimą ir taip neleidžia dukterinėms ląstelėms atsiskirti po mitozės, dėl ko ima formuotis dvibranduolinės ląstelės (5) (54) (55). Todėl mikrobranduolių vertinimą galima apriboti ląstelėmis, kuriose mitozė įvyko poveikio metu arba po jo. Kartu galima matuoti bandomosios medžiagos poveikį ląstelių proliferacijos kinetikai. CitoB turi būti naudojamas kaip citokinezės blokatorius, kai naudojami žmogaus limfocitai, kadangi ląstelių ciklo trukmė tarp kultūrų ir donorų skirsis ir ne visi limfocitai reaguos į PHA. Bandant ląstelių linijas, kai norima nustatyti, ar vertinamos ląstelės pasidalijo, yra taikomi kiti metodai – jie aprašyti toliau (žr. 26 skirsnį).

21. Reikiamą citoB koncentraciją laboratorija turi nustatyti kiekvienam ląstelių tipui, kad pasiektų optimalų dvibranduolinių ląstelių dažnį tirpiklio/nešiklio kontrolinėse kultūrose. Tinkama citoB koncentracija paprastai yra 3–6 μg/ml.

▼M3

Ląstelių proliferacijos bei citotoksiškumo matavimas ir poveikio koncentracijos parinkimas

22. Nustatant didžiausią bandymui naudojamą bandomosios medžiagos koncentraciją reikia vengti koncentracijų, kurios gali sukelti dirbtinių teigiamų rezultatų, pvz., tokių kurios sukelia per didelį citotoksiškumą, nusėdimą kultūros terpėje ir žymius pH arba osmoliškumo pokyčius (39) (40) (41).

23. Ląstelių proliferacijos matavimai atliekami siekiant užtikrinti, kad paveiktose ląstelėse tyrimo metu įvyko mitozė ir kad paveikimas atliekamas palaikant reikiamą citotoksiškumo lygį (žr. 29 skirsnį). Ląstelėse, kurioms būtinas metabolinis suaktyvinimas naudojant santykinį ląstelių skaičiaus padidėjimą (angl. *relative increase in cell counts*, RICC) arba santykinį populiacijos padvigubėjimą (angl. *relative population doubling*, RPD), citotoksiškumas turi būti nustatytas su metaboliniu ląstelių suaktyvinimu ir be jo, nebent naudojamas citoB. Kai naudojamas citoB, citotoksiškumas gali būti nustatytas taikant replikacijos indeksą (RI) (formulė pateikta 2 priedėlyje).

24. Ląstelių apdorojimas citoB ir santykinio vienbranduolinių, dvibranduolinių ir daugiabranduolinių ląstelių dažnio kultūroje išmatavimas yra tikslus metodas ląstelių proliferacijos poveikiui ir poveikio medžiaga cititoksiškam ar citostatiškam aktyvumui kiekybiškai įvertinti (5) ir užtikrina, kad būtų įvertintos tik tos ląstelės, kurios pasidalijo veikimo metu arba po to.

25. Tyrimuose naudojant citoB citostazė / citotoksiškumas gali būti kiekybiškai įvertinti pagal citokinezės blokavimo proliferacijos indeksą (angl. *cytokinesis-block proliferation index*, CBPI) (5) (26) (56) arba nustatyti pagal RI, apskaičiuotą pagal ne mažiau kaip 500 kultūros ląstelių (formulės pateiktos 2 priedėlyje). Kai citoB naudojamas ląstelių proliferacijai įvertinti, CBPI arba RI turi būti nustatyti pagal ne mažiau kaip 500 kultūros ląstelių. Šiuos ir kitus matavimus galima naudoti citotoksiškumui nustatyti palyginant paveiktas ir kontrolines kultūras. Naudingos informacijos gali suteikti kitų citotoksiškumo žymeklių įvertinimas (pvz., susiliejimo, ląstelių skaičiaus, apoptozės, nekrozės, metafazės skaičiaus).

26. Tyrimuose be citoB būtina įrodyti, kad kultūroje įvertintų ląstelių dalijimasis įvyko veikiant bandomąja medžiaga arba po to, nes kitaip galimos klaidingai neigiamos reakcijos. Tarp metodų, kurie naudojami užtikrinti, kad būtų vertinamos pasidalijusios ląstelės, yra bromodeoksiuridino (BrdU) įterpimas ir paskesnis aptikimas, nustatant pasidalijusias ląsteles (57), klonų formavimas, kai paveikiamos ląstelės iš nuolatinių ląstelių linijų ir įvertinamos *in situ* ant mikroskopo objektinio stiklelio (proliferacijos indeksas, PI) (25) (26) (27) (28) arba santykinio populiacijos padvigubėjimo (RPD) ar santykinio ląstelių skaičiaus padidėjimo (RICC) matavimas ar kiti patvirtini metodai (16) (56) (58) (59) (formulės pateiktos 2 priedėlyje). Naudingos informacijos gali suteikti kitų citotoksiškumo ar citostazės žymeklių įvertinimas (pvz., susiliejimo, ląstelių skaičiaus, apoptozės, nekrozės, metafazės skaičiaus).

27. Turi būti įvertinos bent trys analizuojamos bandymo koncentracijos. Norint tai padaryti gali prireikti atlikti eksperimentą naudojant didesnį skaičių nedaug besiskiriančių koncentracijų ir išanalizuoti mikrobranduolių formavimąsi tose koncentracijose, sudarančiose reikiamą citotoksiškumo intervalą. Kita galima strategija – atlikti išankstinį citotoksiškumo bandymą, skirtą susiaurinti galutinio bandymo intervalą.

28. Didžiausia koncentracija turi būti siekiama sudaryti 55 ± 5 % citotoksiškumą. Didesni lygiai gali sukelti chromosomų pažeidimą – šalutinį citotoksiškumo poveikį (60). Jei pasireiškia citotoksiškumas, parinktos bandomosios koncentracijos turi apimti intervalą nuo sukeliančios 55 ± 5 % citotoksiškumą iki mažo arba jokio citotoksiškumo.

▼M3

29. Jei stebima, kad citotoksiškumo nėra arba iškrenta nuosėdos, didžiausia bandomoji koncentracija turi atitikti 0,01 M, 5 mg/ml arba 5 µl/ml, taikant mažiausią vertę. Analizei parinktas koncentracijas paprastai turi skirti ne daugiau kaip 10 % intervalas. Jei bandomųjų medžiagų koncentracijos ir atsako sąryšio kreivė yra stati, gali reikėti glaudžiau išdėstyti bandomosios medžiagos koncentracijas, kad būtų įvertintos ir vidutinio bei mažo toksiškumo intervalo kultūros.

30. Jei ribojantis veiksnys yra tirpumas, didžiausia koncentracija, jeigu jos neriboja citotoksiškumas, turi būti mažiausia koncentracija, kuriai esant kultūrose matoma šiek tiek nuosėdų, jei tai netrukdo įvertinimui. Nuosėdų iškritimas turi būti įvertintas tokiais metodais kaip šviesos mikroskopija, užfiksuojant nuosėdas, kurios išlieka arba atsiranda kultivavimo metu (iki veikimo pabaigos).

Kontrolinės medžiagos

31. Kiekvieno eksperimento metu turi būti naudojamos lygiagrečios teigiamos ir tirpiklio/nešiklio kontrolinės medžiagos tiek su metaboliniu suaktyvinimu, tiek be jo.

32. PC būtinos įrodyti naudojamų ląstelių ir bandymo protokolo gebėjimą identifikuoti klastogenus bei aneugenus ir patvirtinti S9 preparato metabolinę gebą. PC turi būti naudojami žinomi mikrobranduolių formavimosi sukėlikliai, o jų koncentracija turi būti tokia, kad būtų nedidelis bet atkuriamas padidėjimas nuo foninio ir įrodytas bandymo sistemos jautrumas. PC koncentracijos turi būti parinktos taip, kad poveikiai būtų aiškūs, bet iškart neatskleistų vertintojui koduotų preparatų ant objektinio stiklelio tapatumo.

33. Bandymo sistemos metaboliniam pajėgumui ir gebai aptikti klastogeną įrodyti turi būti naudojamos klastogenas, kuriame būtinas metabolinis suaktyvinimas (pvz., ciklofosfamidas, benzo[a]pirenas). Jei pateisinama, galima naudot kitas PC. Kadangi kai kurios PC, kurioms būtinas metabolinis suaktyvinimas, tam tikromis poveikio sąlygomis ar tam tikrose ląstelių linijose gali būti aktyvios be egzogeninio metabolinio suaktyvinimo, jo poreikis ir S9 preparato aktyvumas turi būti išbandyti parinktoje ląstelių linijoje ir naudojant parinktas koncentracijas.

34. Šiuo metu nežinoma jokių aneugenų, kurių genotoksiniam aktyvumui būtinas metabolinis suaktyvinimas (16). Šiuo metu pripažintos aneugeninio aktyvumo PC yra, pvz., kolchicinas ir vinblastinas. Kitos cheminės medžiagos gali būti naudojamos, jei jos indukuoja mikrobranduolius vien tik arba daugiausia dėl aneugeninio aktyvumo. Siekiant išvengti dviejų PC (klastogeniškumui ir aneugeniškumui) be metabolinio suaktyvinimo, aneugeniškumo kontrolinė medžiaga gali būti naudojama kaip PC be S9, o klastogeniškumo kontrolinė medžiaga – naudojamos metabolinio suaktyvinimo sistemos tinkamumui išbandyti. PC klastogeniškumui ir aneugeniškumui turi būti naudojamos ląstelėse, kurioms nereikia S9. Siūlomos PC įtrauktos į 3 priedėlį.

35. Galima apsvarstyti su cheminės medžiagos klase susijusios PC naudojimo galimybę, jei turima tinkamų cheminių medžiagų. Visos naudojamos PC turi būti tinkamos ląstelių tipui ir suaktyvinimo sąlygoms.

▼M3

36. Tirpiklio / nešiklio kontrolinė medžiagos turi būti naudojamos kiekvienu užaugintos kultūros surinkimo metu. Be to, turi būti naudojama ir nepaveikta NC (jei nėra tirpiklio / nešiklio), nebent yra paskelbtų arba anksčiau laboratorijoje sukauptų duomenų apie kontrolę, rodančių, kad pasirinktu tirpikliu esant naudojamai koncentracijai nesukeliama jokių genotoksiškų ar kitų kenksmingų poveikių.

BANDYMO EIGA

Poveikio medžiaga planas

37. Siekiant padidinti aneugenų ar klastogenų, veikiančių tam tikru ląstelės ciklo etapu, aptikimo tikimybę, svarbu, kad bandomąja medžiaga visais ląstelių ciklais būtų paveiktas pakankamas skaičius ląstelių. Todėl ląstelių linijų ir pagrindinių ląstelių kultūrų veikimo medžiaga planas gali kiek skirtis nuo limfocitų plano, nes jų ląstelių ciklui pradėti būtinas mitogeninis stimuliavimas; tai išnagrinėta 41–43 skirsniuose (16).

38. Teoriniai aptarimai, kaip ir paskelbti duomenys (18), rodo, kad dauguma aneugenų ir klastogenų bus aptikti per trumpą 3–6 val. poveikio laikotarpį esant ir nesant S9, po ko bandomoji medžiaga pašalinama ir tęsiamas 1,5–2,0 ląstelių ciklų augimo laikotarpis (6). Ląstelės mėginiams imamos praėjus laikui, kuris lygus 1,5–2,0 normalių (t. y. neapdorotų) ląstelių ciklų, po poveikio medžiaga pradžios arba pabaigos (žr. 1 lentelę). Mėginių ėmimo ar atsigavimo trukmė gali būti pailginta, jei žinoma arba įtariama, kad bandomoji medžiaga turi poveikį ląstelių ciklo trukmei (pvz., bandant nukleozidų analogus).

39. Dėl S9 preparatų galimo citotoksiškumo kultivuotoms žinduolių ląstelėms, pailginta 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų poveikio trukmė taikoma tik nenaudojant S9. Kai veikimas pailgintas, siūlomi variantai, kaip paveikti ląsteles bandomąja chemine medžiaga naudojant citoB arba jo nenaudojant. Šie variantai skirti situacijoms, kai gali būti nerimaujama dėl galimos bandomosios medžiagos ir citoB sąveikos.

40. Siūlomi ląstelių veikimo medžiaga planai pateikti 1 lentelėje. Šie bendrosios paskirties veikimo medžiaga planai gali būti pakeisti, atsižvelgiant į bandomosios medžiagos stabilumą ar reaktyvumą ar naudojamų ląstelių savitas augimo charakteristikas. Bet koks veikimas medžiaga turi prasidėti ir baigtis ląstelėms augant eksponentiškai. Šie planai išsamiau pateikti 41–47 skirsniuose.

1 lentelė

MNvit tyrimo ląstelių veikimo ir surinkimo laikas

Limfocitai, pagrindinės ląstelės ir ląstelių linijos, veikiamos medžiaga naudojant citoB	+ S9	Paveikite 3–6 val. esant S9; pašalinkite S9 ir veikimo terpę; pridėkite naują terpę ir citoB; surinkite praėjus 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų.
	– S9 Trumpas poveikis	Paveikite 3–6 val.; pašalinkite veikimo terpę; pridėkite naują terpę ir citoB; surinkite praėjus 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų.

▼M3

	– S9 Pailgintas poveikis	*A variantas:* paveikite 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų, esant citoB; surinkite pasibaigus poveikio laikotarpiui. *B variantas:* paveikite 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų; pašalinkite bandomąją medžiagą; pridėkite naują terpę ir citoB; surinkite praėjus 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų.
Ląstelių linijos, veikiamos medžiaga nenaudojant citoB (taip pat, kaip pagal pirmiau nurodytą planą, tik nepridedant citoB)		

Limfocitai, pagrindinės ląstelės ir ląstelių linijos su citoB

41. Jei tai limfocitai, veiksmingiausias metodas yra pradėti veikti bandomąja medžiaga praėjus 44–48 val. po stimuliavimo PHA, kai bus pasibaigęs ciklo sinchronizavimas (5). Pradiniame tyrime ląstelės 3–6 val. veikiamos bandomąja medžiaga nesant ir esant S9. Veikimo terpė pašalinama ir pakeičiama nauja terpe, kurioje yra citoB, o ląstelės surenkamos po 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų.

42. Jei abiejų pradinių trumpalaikio (3–6 val.) veikimo bandymų rezultatai yra neigiami arba dviprasmiai, naudojamas pailgintas veikimas medžiaga be S9. Galimi du veikimo variantai, kurie vienodai priimtini. Tačiau gali būti tikslingiau rinktis A variantą stimuliuojamiems limfocitams, kai eksponentinis augimas gali imti mažėti praėjus 96 val. po stimuliavimo. Be to, pagal B variantą paskutinio mėginio ėmimo metu ląstelių kultūros turi nebūti pasiekusios susiliejimo.

— A variantas: ląstelės veikiamos bandomąja medžiaga 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų su surenkamos praėjus veikimo laikui.

— B variantas: ląstelės veikiamos bandomąja medžiaga 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų. Veikimo terpė pašalinama ir pakeičiama nauja, o ląstelės surenkamos po papildomų 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų.

43. Pagrindinės ląstelės ir ląstelių linijos turi būti veikiamos panašiai kaip limfocitai, išskyrus tai, kad jų nebūtina 44–48 val. stimuliuoti PHA. Jei ląstelės ne limfocitai, jos turi būti veikiamos taip, kad baigiantis tyrimui tevyktų jų logaritminio augimo etapas.

Ląstelių linijos be citoB

44. Ląstelės turi būti 3–6 val. veikiamos esant ir nesant S9. Veikimo terpė pašalinama ir pakeičiama nauja terpe, o ląstelės surenkamos po 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų.

▼M3

45. Jei abiejų pradinių trumpalaikio (3–6 val.) veikimo bandymų rezultatai yra neigiami arba dviprasmiai, naudojamas pailgintas veikimas medžiaga (be S9). Galimi du veikimo variantai, kurie vienodai priimtini:

— A variantas: ląstelės veikiamos bandomąja medžiaga 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų su surenkamos praėjus poveikio laikui.

— B variantas: ląstelės veikiamos bandomąja medžiaga 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų. Veikimo terpė pašalinama ir pakeičiama nauja, o ląstelės surenkamos po papildomų 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų.

46. 3–6 val. veikimo medžiaga pabaigoje monosluoksniuose gali būti mitozinių ląstelių (atpažįstamų iš apvalios formos ir atsiskyrimo nuo paviršiaus). Kadangi šios mitozinės ląstelės lengvai atsiskiria, jas galima prarasti pašalinant terpę su bandomąja medžiaga. Reikia pasirūpinti surinkti jas plaunant kultūras ir grąžinti atgal, kad surinkimo metu nebūtų prarastos mitozės etapo ląstelės, kuriose gali būti mikrobranduolių.

Kultūrų skaičius

47. Su kiekviena bandomosios medžiagos koncentracija turi būti naudojamos pakartotinės kultūros; tokios turi būti ir nešiklio/tirpiklio bei NC kultūros. Jeigu remiantis anksčiau sukauptais laboratorijos duomenimis galima įrodyti, kad skirtumai tarp kartotinio pasėjimo kultūrų yra minimalūs, galima naudoti pavienes kultūras. Jei naudojamos pavienės kultūros, rekomenduojama analizuoti didesnį koncentracijų skaičių.

Ląstelių surinkimas ir preparatų ant objektinio stiklelio paruošimas

48. Kiekviena kultūra surenkama ir apdorojama atskirai. Ruošiamos ląstelės gali būti paveikiamos hipotoniniu šoku, tačiau šis veiksmas nebūtinas, jei pakankamas ląstelių paskleidimas pasiekiamas kitais būdais. Preparatą ant objektinio stiklelio galima paruošti įvairiais būdais, jei įvertinimui gaunami aukštos kokybės ląstelių preparatai. Turi būti išsaugota ląstelių citoplazma, kad būtų galima aptikti mikrobranduolius ir (taikant citokinezės blokavimo metodą) patikimai identifikuoti dvibranduolines ląsteles.

49. Preparatai ant objektinio stiklelio gali būti nudažyti įvairiais metodais, pvz., Giemsa arba fluorescenciniais specialiai DNR skirtais dažikliais (59). Jei naudojami specialiai DNR skirti dažai (pvz., akridino oranžas (61) arba Hoechst 33258 dažas, turintis pironino-Y (62)), galima pašalinti kai kuriuos artefaktus, kurie atsiranda naudojant specialiai DNR neskirtus dažus. Mikrobranduolių turiniui (chromosomai ar jos fragmentui) identifikuoti gali būti naudojami antikinetochoro antikūnai, FISH su pancentrometriniais DNR zondais arba užpildinis *in situ* ženklinimas su pancentromeroms skirtais užpildais, kartu su atitinkamu DNR priešpriešiniu dažymu, jei domina mechanistinė informacija apie jų formavimąsi (15) (16). Gali būti naudojami kiti klastogenų ir aneugenų diferencijavimo metodai, jei įrodyta, kad jie veiksmingi.

Analizė

50. Prieš analizuojant mikroskopu visi preparatai ant objektinio stiklelio, įskaitant preparatus su tirpikliu / nešikliu ir kontrolinėmis medžiagomis, turi būti nepriklausomai užkoduoti. Kitas būdas – analizuoti koduotus mėginius naudojantis patvirtinto tinkamumo, automatizuotą srauto citometrijos ar vaizdo analizavimo sistemą.

▼M3

51. CitoB apdorotose kultūrose mikrobranduolių dažnis turi būti išanalizuotas bent 2 000 dvibranduolinių ląstelių kiekvienai koncentracijai (ne mažiau kaip 1 000 dvibranduolinių ląstelių iš vienos kultūros; po dvi kultūras vienai koncentracijai). Jei naudojamos pavienės kultūros, iš jų turi būti įvertinta ne mažiau kaip 2 000 dvibranduolinių ląstelių. Jei įvertinimui pagal kiekvieną koncentraciją yra gerokai mažiau kaip po 1 000 dvibranduolinių ląstelių iš vienos kultūros arba 2 000, jei naudojama pavienė kultūra, ir reikšmingo mikrobranduolių skaičiaus padidėjimo neaptikta, bandymas turi būti pakartotas naudojant daugiau ląstelių arba mažiau toksiškas koncentracijai (kas tinka). Reikia atsargumo nevertinti netaisyklingos formos dvibranduolinių ląstelių arba tų, kurių du branduoliai yra labai skirtingo dydžio; be to, dvibranduolinių ląstelių nereikia painioti su prastai pasklidusiomis daugiabranduolinėmis ląstelėmis. Ląstelės, kuriose yra daugiau kaip du pagrindiniai branduoliai, neturi būti analizuojamos vertinant mikrobranduolius, kadangi jose pradinis mikrobranduolių dažnis gali būti didesnis (63) (64). Vienbranduolinių ląstelių įvertinimas yra priimtinas, jei bandomoji medžiaga įrodytai veikia citoB aktyvumą.

52. Ląstelių linijose, tiriamose neapdorojus CitoB, mikrobranduoliai turi būti išanalizuoti bent 2 000 ląstelių kiekvienai koncentracijai (ne mažiau kaip 1 000 ląstelių iš vienos kultūros; po dvi kultūras vienai koncentracijai). Jei naudojama tik po vieną kultūrą koncentracijai, iš tos kultūros turi būti įvertinta ne mažiau kaip 2 000 ląstelių.

53. Kai naudojamas citoB, ląstelių proliferacijai įvertinti (žr. 2 priedėlį) CBPI arba RI turi būti nustatyti pagal ne mažiau kaip 500 kultūros ląstelių. Jei medžiaga veikiama nesant citoB, svarbu pateikti įrodymą, kad vertinamos ląstelės proliferavo, kaip aptarta 24–27 skirsniuose.

Priimtinumo kriterijai

54. Laboratorija, siūlanti naudoti šiame BM aprašytą MNvit tyrimą, turi įrodyti savo gebėjimą patikimai ir tiksliai aptikti žinomo aneugeninio ir klastogeninio aktyvumo chemines medžiagas su metaboliniu suaktyvinimu ir be jo, taip pat ir žinomas neigiamo poveikio medžiagas, naudodama 3 priedėlyje nurodytas chemines medžiagas. Kaip savo gebėjimo teisingai taikyti į BM įrodymą laboratorija turi pateikti įrodymą, kad ląstelėse, kuriose vertinamas mikrobranduolio formavimasis, įvyko vienas branduolio pasidalijimas, jei bandymas atliekamas nenaudojant citoB.

55. 3 priedėlyje nurodytas chemines medžiagas rekomenduojama naudoti kaip etalonines. Galima naudoti pakaitines ar papildomas chemines medžiagas, jeigu jų aktyvumas žinomas ir jos indukuoja mikrobranduolius tokiu pačiu veikimo mechanizmu ir jei įrodyta, kad jos susijusios su cheminėmis medžiagomis, kurios bus bandomos taikant MNvit procedūrą. Pateisinimas gali būti tinkamumo patvirtinimo tyrimas, kuriame naudota plati medžiagų įvairovė arba kuris sutelktas į siauresnį spektrą, remiantis bandomosios medžiagos chemine klase ar tyrinėjamu pažaidos mechanizmu.

56. Tirpiklio / nešiklio kontrolinės medžiagos ir nepaveiktų kultūrų mikrobranduolių dažnumas turi būti atkuriamai mažas ir pastovus (paprastai 5–25 mikrobranduoliai/1 000 ląstelių, kai ląstelės yra 11 skirsnyje nurodyto tipo). Kitų tipų ląstelių atsakų intervalai gali būti kitokie ir jie turi būti nustatyti tvirtinant jų tinkamumą naudoti MNvit tyrime. Kontroliniams intervalams pagal anksčiau sukauptus duomenis sudaryti turi būti naudojami neigiamų medžiagų, tirpiklių ir PC duomenys. Šios vertės turi būti naudojamos nusprendžiant dėl lygiagrečios NC/PC tinkamumo eksperimentui.

▼M3

57. Jei tyrimui siūlomi nedideli protokolo pakeitimai (pvz., naudoti automatizuotą, o ne rankinę įvertinimo metodiką; naudoti naują ląstelių tipą), pakeitimo veiksmingumas turi būti įrodytas prieš pakeistą protokolą imant laikyti tinkamu naudoti. Veiksmingumo įrodymas apima įrodymą, kad galima aptikti pagrindinius chromosomos pertraukimo ir padidėjimo ar sumažėjimo mechanizmus ir kad atskiros bandomosios medžiagos klasei ar plačiai medžiagų grupei galima gauti atitinkamus teigiamus ir neigiamus rezultatus.

DUOMENYS IR ATASKAITŲ TEIKIMAS

Rezultatų vertinimas

58. Jei naudojama citokinezės blokavimo metodika, vertinant mikrobranduolių indukciją naudojamas tik dvibranduolinių ląstelių su mikrobranduoliais (nepriklausomai nuo mikrobranduolių skaičiaus ląstelėje) dažnis. Naudingos informacijos gali suteikti ląstelių su vienu, dviem ar keliais mikrobranduoliais įvertinimas, bet tai neprivaloma.

59. Lygiagrečiai turi būti nustatyti visų medžiaga paveiktų ir tirpiklio/nešiklio kontrolinių kultūrų citotoksiškumo ir (arba) citostazės rodikliai (58). Visų medžiaga paveiktų ir kontrolinių kultūrų CBPI arba RI turi būti apskaičiuoti kaip ląstelių ciklo delsos rodikliai, kai taikomas citokinezės blokavimo metodas. Jei nėra citoB, turi būti taikomas RPD arba RICC ar PI (žr. 2 priedėlį).

60. Turi būti pateikti duomenys apie atskirą kultūrą. Be to, visi duomenys turi būti suvesti į lenteles.

61. Cheminės medžiagos, kurios MNvit tyrime indukuoja mikrobranduolius, tai gali daryti todėl, kad indukuoja chromosomų nutraukimą, netekimą arba abiejų veiksmų derinį. Siekiant nustatyti, ar mikrobranduolių indukcijos mechanizmą suaktyvina klastogeninė ir (arba) aneugeninė veikla, gali būti atliekama papildoma analizė naudojant antikinetochoro antikūnus, centromeroms skirtus *in situ* zondus ar kitus metodus.

Rezultatų vertinimas ir aiškinimas

62. Nėra reikalaujama papildomais bandymais tikrinti aiškiai teigiamą arba neigiamą reakciją. Dviprasmiai rezultatai gali būti patikslinti išanalizavus papildomas 1 000 ląstelių iš visų kultūrų, kad nebūtų prarastas kodavimas. Jei toks metodas neišaiškina rezultato, reikia atlikti papildomus bandymus. Tolesniuose eksperimentuose reikia atsižvelgti į tyrimo parametrų pasikeitimą iš atitinkamai platesnio arba siauresnio sąlygų intervalo. Gali pasikeisti tokie tyrimo parametrai kaip tiriamosios koncentracijos intervalas, veikimo medžiaga ir ląstelių surinkimo laikas ir (arba) metabolinio suaktyvinimo sąlygos.

63. Yra keletas teigiamo rezultato nustatymo kriterijų, pvz., su koncentracija susijęs arba statistiškai reikšmingas mikrobranduolį turinčių ląstelių skaičiaus padidėjimas. Pirmiausia turi būti apsvarstytas rezultatų biologinis tinkamumas. Įvertinimas, ar gautos vertės patenka ar nepatenka į anksčiau sukauptų duomenų kontrolinį intervalą, gali būti pravartus vertinant atsako biologinį reikšmingumą. Bandymo rezultatams įvertinti galima taikyti atitinkamus statistinius metodus (65). Tačiau statistinio bandymo rezultatai turi būti įvertinti dozės ir atsako sąryšio atžvilgiu. Taip pat reikia atsižvelgti į atkuriamumą ir anksčiau sukauptus duomenis.

▼M3

64. Nors daugumos eksperimentų rezultatai bus aiškiai teigiami ar neigiami, kai kuriais atvejais, remiantis duomenų rinkiniu, nebus įmanoma priimti galutinio sprendimo apie bandomosios medžiagos aktyvumą. Tokie dviprasmiai arba abejotini atsakai gali būti gaunami neatsižvelgiant į eksperimento pakartojimų skaičių.

65. Teigiami MNvit tyrimo duomenys rodo, kad bandomoji medžiaga sukelia chromosomos trūkimą ar netekimą kultivuotose žinduolių ląstelėse. Neigiami rezultatai rodo, kad bandymo sąlygomis bandomoji medžiaga nesukelia chromosomos trūkimų ir (arba) padidėjimo ar sumažėjimo kultivuotose žinduolių ląstelėse.

Bandymo ataskaita

66. Bandymų ataskaitoje turi būti bent ši informacija, jeigu ji susijusi su tyrimu:

Bandomoji cheminė medžiaga

— identifikavimo duomenys ir Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos numeris bei EC numeris,

— fizinis būvis ir grynumas,

— fizikinės ir cheminės savybės, svarbios su tyrimo vykdymu,

— bandomosios cheminės medžiagos reaktyvumas su tirpikliu/nešikliu arba ląstelių kultūros terpe.

Tirpiklis/nešiklis

— tirpiklio/nešiklio pasirinkimo pagrindimas,

— bandomosios medžiagos tirpumas ir stabilumas tirpiklyje/nešiklyje.

Ląstelės

— naudojamų ląstelių tipas ir šaltinis,

— naudojamo ląstelių tipo tinkamumas,

— mikoplazmos nebuvimas, jei taikoma,

— informacija apie ląstelių ciklo trukmę, padvigubėjimo laiką arba proliferacijos indeksas,

— jei naudojami limfocitai, kraujo donorų lytis, amžius ir skaičius, jei taikoma,

— jei naudojami limfocitai, ar medžiaga veikiamas visas kraujas ar atskirti limfocitai,

— eigų skaičius, jei taikoma,

— ląstelių kultūros išlaikymo metodai, jei taikoma,

— chromosomų modalinis skaičius,

— normali (neigiamo poveikio kontrolinės medžiagos) ląstelių ciklo trukmė.

Bandymo sąlygos

— citokinezės blokavimo medžiagos (pvz., citoB) tapatumas, jeigu ji naudojama, ir jos koncentracija ir ląstelės poveikio trukmė,

— koncentracijų ir kultūrų skaičiaus parinkimo loginis pagrindas, įskaitant citotoksiškumo duomenis ir tirpumo apribojimus, jei turima duomenų,

— terpės sudėtis, CO_2 koncentracija, jei taikoma,

— bandomosios medžiagos koncentracija,

▼M3

— nešiklio ir pridėtos bandomosios medžiagos koncentracija (ir (arba) tūris),

— inkubacijos temperatūra ir trukmė,

— veikimo medžiaga trukmė,

— surinkimo laikas po paveikimo,

— ląstelių tankis pasėjimo metu, jei taikoma,

— metabolinio suaktyvinimo sistemos tipas ir sudėtis, įskaitant priimtinumo kriterijus,

— teigiamo poveikio kontrolinės cheminės medžiagos ir neigiamo poveikio kontrolinės medžiagos,

— preparatų ant objektinio stiklelio paruošimo metodai ir taikoma dažymo metodika,

— mikrobranduolių identifikavimo kriterijai,

— tirtų ląstelių skaičius,

— citotoksiškumo matavimo metodai,

— bet kokia su citotoksiškumu susijusi papildoma informacija,

— tyrimo vertinimo kaip teigiami, neigiami arba dviprasmiai kriterijai,

— taikomas (-i) statistinės analizės metodas (-ai),

— metodai, pvz., kinetochorų antikūnų naudojimas, skirti apibūdinti, ar mikrobranduolyje yra visos ar fragmentuotos chromosomos, jei taikoma.

Rezultatai

— naudojas citotoksiškumo matas, pvz., CBPI arba RI, jei taikomas citokinezės blokavimo metodas; RICC, RPD arba PO, kai minėtas metodas netaikomas; kitos pastabos, jei taikoma, pvz., ląstelių susiliejimas, apoptozė, nekrozė, metafazių skaičius, dvibranduolinių ląstelių dažnis,

— nuosėdų iškritimo požymiai,

— veikimo medžiaga terpės pH ir osmoliškumo duomenys, jei nustatyti,

— analizei priimtų ląstelių apibrėžimas,

— vienbranduolinių, dvibranduolinių ir daugiabranduolinių ląstelių paplitimas, jei taikomas citokinezės blokavimo metodas,

— ląstelių su mikrobranduoliais skaičius, atskirai kiekvienos medžiaga paveiktos ir kontrolinės kultūros, kai tinka, nurodant, ar tai dvibranduolinės ar vienbranduolinės ląstelės,

— koncentracijos ir atsako sąryšis, kai įmanoma,

— lygiagrečiai naudojamos neigiamo poveikio medžiagos (tirpiklio/nešiklio) ir teigiamo poveikio kontrolinės cheminės medžiagos (koncentracija ir tirpikliai) duomenys,

— anksčiau sukaupti neigiamo poveikio medžiagos (tirpiklio/nešiklio) ir teigiamo poveikio kontrolinės cheminės medžiagos duomenys, nurodant intervalus, vidurkius ir standartinį nuokrypį bei pasikliaujamąjį intervalą (pvz., 95 %),

— statistinė analizė, p vertės, jeigu yra.

Rezultatų aptarimas

Išvados

▼M3

NUORODOS

(1) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.,* 392, 1–4.

(2) Parry, J.M. and Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Res.*, 287, 3–15.

(3) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.,* 43, 233–246.

(4) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen*., 35, 167–172.

(5) Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols, 2* (5), 1084–1104.

(6) Fenech, M. and Morley, A.A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.,* 161, 193–198.

(7) Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.,* 13, 34–43.

(8) Eastmond, D.A. and Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Res.,* 234, 9–20.

(9) Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. and Adler, I.D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis,* 6, 297–302.

(10) Farooqi, Z., Darroudi, F. and Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis,* 8, 329–334.

(11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. and Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, *Mutation Res.,* 319, 205–213.

(12) Norppa, H., Renzi, L. and Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesis,* 8, 519–525.

(13) Eastmond, D.A, Rupa, D.S. and Hasegawa, L.S. (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 Res.,* 322, 9–20.

(14) Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J. and Bentley, K.S. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Res.,* 372, 233–245.

(15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. and Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.,* 372, 211–219.

(16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.,* 540, 153–163.

▼M3

(17) OECD (1997), *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test,* Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [www.oecd.org/env/testguidelines]

(18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. and Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Res.,* 607, 13–36.

(19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Res.,* 607, 37–60.

(20) Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelter, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Res.,* 607, 61–87.

(21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Res.,* 607, 88–124.

(22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Res.,* 607, 125–152.

(23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A. and Locher, F. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Res.,* 392, 187–208.

(24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. and Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Res.,* 392, 45–59.

(25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and Madle, S. (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 Res.,* 410, 81–116.

(26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. and Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, *Mutation Res.* 439, 183–190.

(27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P. and Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Res.* 445, 55–71.

(28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. and Madle, S. (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*., 468, 137–163.

(29) Garriott, M.L., Phelps, J.B. and Hoffman, W.P. (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 Res.,* 517, 123–134.

(30) Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. and Sofuni, T. (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis,* 14, 569–580.

▼M3

(31) Elhajouji, A., and Lorge, E. (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.,* 607, 1–152.

(32) 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]

(33) 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]

(34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S, van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis,* 23, 271–283.

(35) Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. and Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.,* 347, 105–115.

(36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. and Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis,* 17, 257–260.

(37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. and Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, *Toxicol.,* 198, 315–328.

(38) Gibson, D.P., Brauninger, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. and Aardema, M.J. (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 Res.,* 392, 61–70.

(39) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.,* 257, 147–205.

(40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.,* 268, 297–305.

(41) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environ. Mutagen*., 8, 789–886.

(42) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.,* 147, 29–36.

(43) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Res.,* 392, 11–18.

(44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (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, *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 31–45.

▼M3

(45) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.,* 113, 173–215.

(46) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R. and Zeiger, E. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.,* 4, 55–65.

(47) 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, 175–177.

(48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, *In:* de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85–88.

(49) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. and Galloway, S.M. (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.,* 28, 51–59.

(50) UNEP (2001), Stokholmo konvencija dėl patvariųjų organinių teršalų, Jungtinių Tautų aplinkos programa (UNEP). Prieinama: [http://www.pops.int/]

(51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. and Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesis,* 11, 247–274.

(52) 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. and Schaich, K.M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91–103.

(53) 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, *Environ. Mutagenesis* 5, 795–801.

(54) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Res.,* 285, 35–44.

(55) Phelps, J.B., Garriott, M.L., and Hoffman, W.P. (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 Res.,* 521, 103–112.

(56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2004), Corrigendum to „Report from the *in vitro* micronucleus assay working group", *Mutation Res.,* 564, 97–100.

(57) Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.,* 139, 61–65.

(58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. and Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Res.,* 655, 1–3.

(59) Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.,* 341, 169–184.

(60) 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, Environ. Molec. *Mutagenesis* 35, 191–201.

▼**M3**

(61) Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.,* 120, 241–247.

(62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.,* 120, 269–275.

(63) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.,* 120, 241–247.

(64) Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.,* 534, 65–75.

(65) Hoffman, W.P., Garriott, M.L. and Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, *In:* Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 463–467.

(66) 2004 m. balandžio 29 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 850/2004 dėl patvariųjų organinių teršalų ir iš dalies keičiantis Direktyvą 79/117/EEB, OL L 229, 2004 4 30, p. 5.

▼M3

1 priedėlis

Apibrėžtys

Aneugenas – bet kokia medžiaga ar procesas, kurie, sąveikaudami su mitoziniu ir mejoziniu ląstelių dalijimosi ciklu, ląstelėse ar organizmuose sukelia aneuploidiją.

Aneuploidija – bet koks nukrypimas nuo normalaus diploidinio (arba haploidinio) chromosomų skaičiaus viena ar daugiau kaip viena chromosoma, tačiau ne visu chromosomų rinkiniu ar keliais (poliploidija).

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 ląstelių dalijimosi.

Centromera – chromosomos DNR sritis, kurioje susikabina abi chromatidės ir kurioje greta vienas kito prisitvirtinę abu kinetochorai.

Klastogenas – bet kokia medžiaga ar procesas, sukeliantys struktūrinius chromosomų nukrypimus ląstelių populiacijose ar organizmuose.

Citokinezė – ląstelių dalijimosi procesas iškart po mitozės, kuomet susidaro dvi dukterinės ląstelės, turinčios po vieną branduolį.

Citokinezės blokavimo proliferacijos indeksas (CBPI) – antrojo pasidalijimo ląstelių dalis medžiaga paveiktoje populiacijoje nepaveiktos kontrolinės kultūros atžvilgiu (formulė pateikta 2 priedėlyje).

Citostazė – ląstelių augimo slopinimas (formulė pateikta 2 priedėlyje).

Citotoksiškumas – žalingas poveikis ląstelių struktūrai ar funkcijai, kuris galiausiai sukelia ląstelės žūtį.

Genotoksiškas – bendrasis terminas, kuriuo išreiškiamas visų tipų DNR arba chromosomų pažeidimas, įskaitant nutraukimus, aduktų pergrupavimą, mutacijas, chromosomų aberacijas ir aneuploidiją. Ne visų tipų genotoksiškumo poveikiai sukelia mutacijas ar pastovų chromosomų pažeidimą.

Interfazinės ląstelės – ląstelės, nesančios mitozės fazės.

Kinetochoras – baltyminė struktūra, susidaranti chromosomos centromere, prie kurios dalijantis ląstelėms jungiasi verpstės siūlai ir dėl to dukterinės chromosomos tvarkingai išsidėsto dukterinių ląstelių poliuose.

Mikrobranduolys – atskiras mažas branduolys, esantis šalia pagrindinio ląstelių branduolio, atsiradęs mitozės ar mejozės telofazės metu, kai chromosomų fragmentai ar ištisos chromosomos įgauna pirminę struktūrą („išnyksta“).

Mitozės – ląstelės branduolio dalijimasis, paprastai skirstomas į profazę, prometafazę, metafazę, anafazę ir telofazę.

Mitozinis indeksas – metafazėje esančių ląstelių sąryšis, padalytas iš viso ląstelių populiacijos skaičiaus, rodantis tos ląstelių populiacijos proliferacijos laipsnį.

Mutageniškas – sukeliantis paveldimą DNR bazinės poros sekos (-ų) pokytį genuose arba chromosomų struktūroje (chromosomų aberacijas).

▼**M3**

Neatsijungimas – porinių chromatidžių nesugebėjimas atsijungti ir tinkamai atsiskirti į besivystančias dukterines ląsteles, dėl ko pastarosiose susidaro nenormalus chromosomų skaičius.

Poliploidija – chromosomų skaičiaus aberacijos ląstelėse arba organizmuose, apimančios visą chromosomų rinkinį ar rinkinius, skirtingai nuo atskiros chromosomos ar chromosomų (aneuploidija).

Proliferacijos indeksas (PI) – citotoksiškumo matavimo metodas, kai nenaudojamas citoB (formulė pateikta 2 priedėlyje).

Santykinis ląstelių skaičiaus padidėjimas (angl. RICC) – citotoksiškumo matavimo metodas, kai nenaudojamas citoB (formulė pateikta 2 priedėlyje).

Santykinis populiacijos padvigubėjimas (angl. RPD) – citotoksiškumo matavimo metodas, kai nenaudojamas citoB (formulė pateikta 2 priedėlyje).

Replikacijos indeksas (RI) – medžiaga paveiktos kultūros ląstelių pasidalijimo ciklų skaičiaus sąryšis su nepaveiktos kontrolinės kultūros rodikliu poveikio ir atsigavimo laikotarpiu (formulė pateikta 2 priedėlyje).

Bandomoji cheminė medžiaga (dar vadinama bandomąja medžiaga) – bet kuri medžiaga ar mišinys, bandomi taikant šį bandymų metodą.

▼M3

2 priedėlis

Citotoksiškumo įvertinimo formulės

1. *Kai naudojamas citoB*, citotoksiškumo vertinimas turi būti grindžiamas citokinezės blokavimo proliferacijos indeksu (CBPI) arba replikacijos indeksu (RI) (16) (58). CBPI nurodo vidutinį ląstelės ciklų skaičių citoB poveikio laikotarpiu ir gali būti naudojamas ląstelių proliferacijai skaičiuoti. RI rodo santykinį branduolių skaičių medžiaga paveiktose kultūrose, palyginti su kontrolinėmis kultūromis ir gali būti naudojamas citostazės procentinei daliai skaičiuoti:

$$\% \text{ citostazės} = 100 - 100\{(CBPI_T - 1) \div (CBPI_C - 1)\}$$

Ir:

T = bandomąja chemine medžiaga paveikta kultūra

C = nešiklio kontrolinė kultūra

Čia:

$$CBPI = \frac{((\text{vienbranduolinių ląstelių skaičius}) + (2 \times \text{dvibranduolinių ląstelių skaičius}) + (3 \times \text{daugiabranduolinių ląstelių skaičius}))}{(\text{bendras ląstelių skaičius})}$$

Taigi, CBPI lygus 1 (visos ląstelės yra vienbranduolinės) atitinka 100 % citostazę.

Citostazė = 100 – RI

$$RI = \frac{((\text{dvibranduolinių ląstelių skaičius}) + (2 \times \text{daugiabranduolinių ląstelių skaičius})) \div (\text{bendras ląstelių skaičius})_T}{((\text{dvibranduolinių ląstelių skaičius}) + (2 \times \text{daugiabranduolinių ląstelių skaičius})) \div (\text{bendras ląstelių skaičius})_C} \times 100$$

T = medžiaga paveiktos kultūros

C = nešiklio kontrolinės kultūros

2. Taigi, RI = 53 % reiškia, kad, palyginti su skaičiumi kontrolinės kultūros ląstelių, kurios nepasidalijo sudarydamos dvibranduolines ir daugiabranduolines ląsteles, 53 % šio skaičiaus pasidalijo medžiaga paveiktoje kultūroje, t. y. 47 % citostazė.

3. *Kai nenaudojamas citoB*, citotoksiškumą rekomenduojama vertinti pagal santykinį ląstelių skaičiaus padidėjimą (RICC) arba santykinį populiacijos padvigubėjimą (RPD)(58), kadangi jais abiem atsižvelgiama į pasidalijusią ląstelių populiacijos dalį.

$$RICC = \frac{(\text{Ląstelių skaičiaus padidėjimas medžiaga paveiktose kultūrose (galutinis – pradinis)})}{(\text{Ląstelių skaičiaus padidėjimas kontrolinėse kultūrose (galutinis – pradinis)})} \times 100$$

$$RPD = \frac{(\text{Populiacijų padvigubėjimų skaičius medžiaga paveiktose kultūrose})}{(\text{Populiacijų padvigubėjimų skaičius kontrolinėse kultūrose})} \times 100$$

▼**M3**

čia:

Populiacijos padvigubėjimas = [log (ląstelių skaičius po paveikimo ÷ pradinis ląstelių skaičius)] ÷ log 2

4. Taigi, RICC arba RPD, lygus 53 %, rodo 47 % citotoksiškumą/citostazę.

5. Vartojant proliferacijos indeksą (PI), citotoksiškumas gali būti įvertintas skaičiuojant skaičių klonų, sudarytų iš 1 ląstelės (cl1), 2 ląstelių (cl2), 3–4 ląstelių (cl4) ir 5–8 ląstelių (cl8)

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

6. PI vartojamas kaip vertingas ir patikimas citotoksiškumo parametras ir *in situ* be citoB kultivuojamoms ląstelių linijoms (25) (26) (27) (28).

▼**M3**

3 priedėlis

Naudojimo charakteristikoms įvertinti rekomenduojamos etaloninės cheminės medžiagos ([1])

Kategorija	Cheminės medžiaga	CAS Nr.	EC Nr.
1. Klastogenai, aktyvūs be metabolinio suaktyvinimo			
	Citozino arabinozidas	147–94–4	205–705–9
	Mitomicinas C	50–07–7	200–008–6
2. Klastogenai, kuriems reikia metabolinio suaktyvinimo			
	Benzo(a)pirenas	50–32–8	200–028–5
	Ciklofosfamidas	50–18–0	200–015–4
3. Aneugenai			
	Kolchicinas	64–86–8	200–598–5
	Vinblastinas	143–67–9	205–606–0
4. Neigiamos medžiagos			
	Di(2-etilheksil)ftalatas	117–81–7	204–211–0
	Nalidiksinė rūgštis	389–08–2	206–864–7
	Pirenas	129–00–0	204–927–3
	Natrio chloridas	7647–14–5	231–598–3

([1]) Rekomenduojama naudoti etalonines chemines medžiagas. Galima naudoti pakaitines ar papildomas chemines medžiagas, jeigu jų aktyvumas žinomas ir jos indukuoja mikrobranduolius tokiu pačiu veikimo mechanizmu ir jei įrodyta, kad jos susijusios su cheminėmis medžiagomis, kurios bus bandomos taikant MNvit procedūrą. Atsižvelgiant į paskirtį, pateisinimas gali būti ir tinkamumo patvirtinimo tyrimas, kuriame naudota plati medžiagų įvairovė arba kuris sutelktas į siauresnį spektrą, remiantis bandomosios medžiagos chemine klase ar tyrinėjamu pažaidos mechanizmu.

▼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

▼M3

cheminę 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.

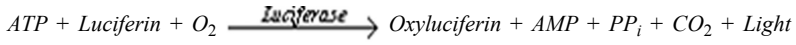
5. LLNA: DA yra *in vivo* metodas, todėl jautrinančiam poveikiui dėl alerginio sąlyčio įvertinti naudojami gyvūnai. Tačiau jis turi galimybę sumažinti gyvūnų naudojimą šiam tikslui, palyginti su bandymais su jūros kiaulytėmis (B.6; OECD bandymų metodika 406) (14). Be to, LLNA: DA iš esmės pagerina būdą, 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

▼M3

aprašytos procedūros pagrįstos ATP kiekio matavimu bioliuminescencijos būdu (žinoma, kad ji 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 ≥ 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. ≤ 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 bandomaja 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 tapatumą ir cheminę struktūrą, jos fizikines ir chemines

▼M3

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: 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 kaip galinti odą dirginanti medžiaga. Čia aprašytos procedūros yra pagrįstos BrdU kiekio matavimu padidėjusiam proliferuojančių ląstelių

▼M3

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 raginami pasikonsultuoti su atitinkamomis institucijomis prieš vykdydami LLNA: BrdU-ELISA. Taigi, skatinama įprastai naudoti

▼M3

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 ≥ 3 edemos įvertis ir (arba) ≥ 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/LLNAPR-PRept2009.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/LLNA-PerfStds.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 bandomaja 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.

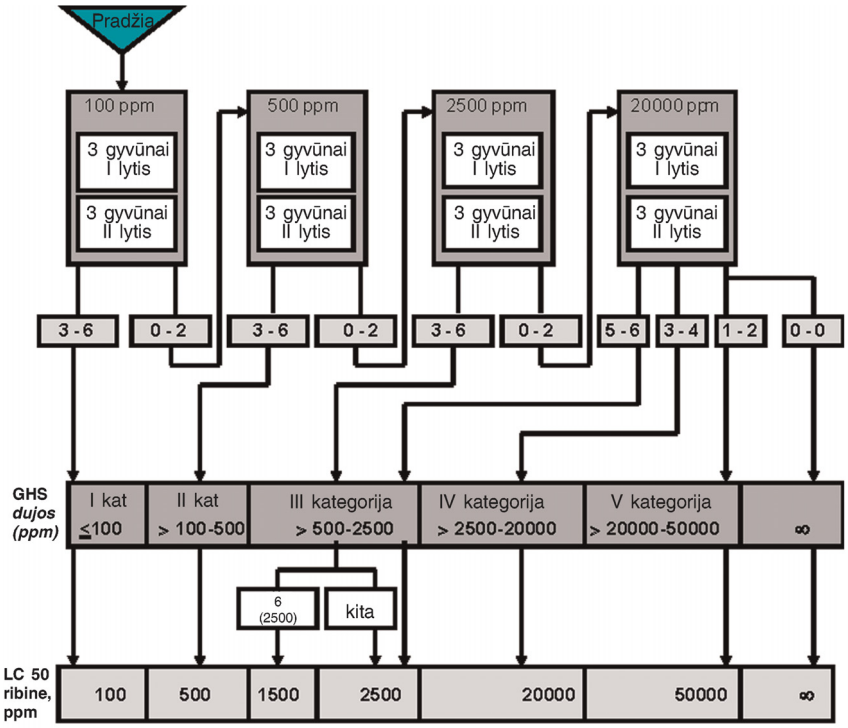
([1]) Toliau pateiktose lentelėse pateiktos nuorodos į visuotinai suderintą cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemą (angl. GHS). ES atitikmuo – Reglamentas (EB) Nr. 1272/2008. Reglamentu (EB) Nr. 1272/2008 (9) nereglamentuojamas 5 kategorijos cheminių medžiagų ūmus toksiškumas įkvėpus.

▼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.

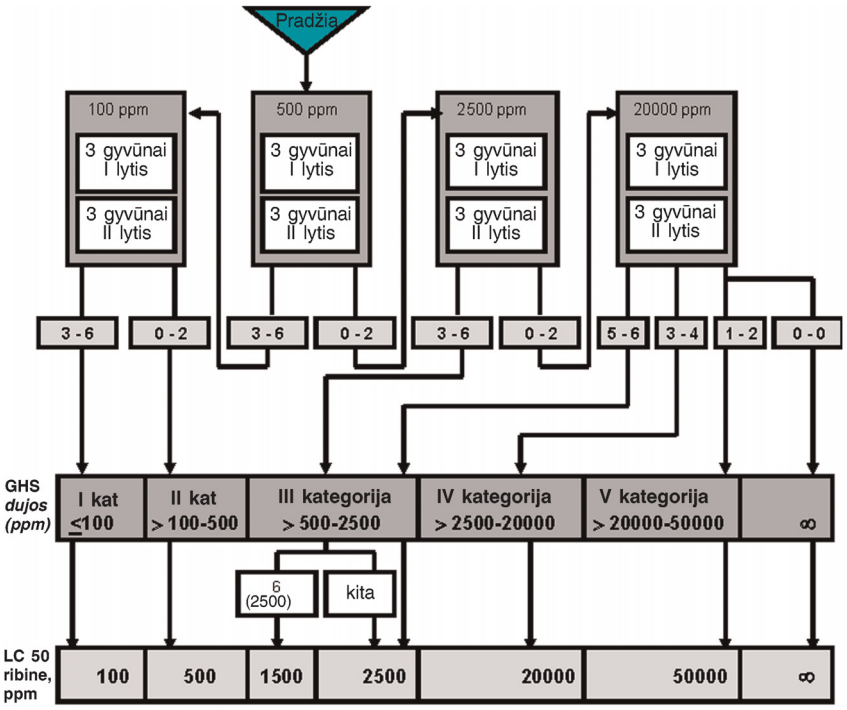
— Bandymai taikant didesnę kaip 20 000 ppm/4 h koncentraciją: žr. Rekomendacinį dokumentą Nr. 39 (8).

▼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.

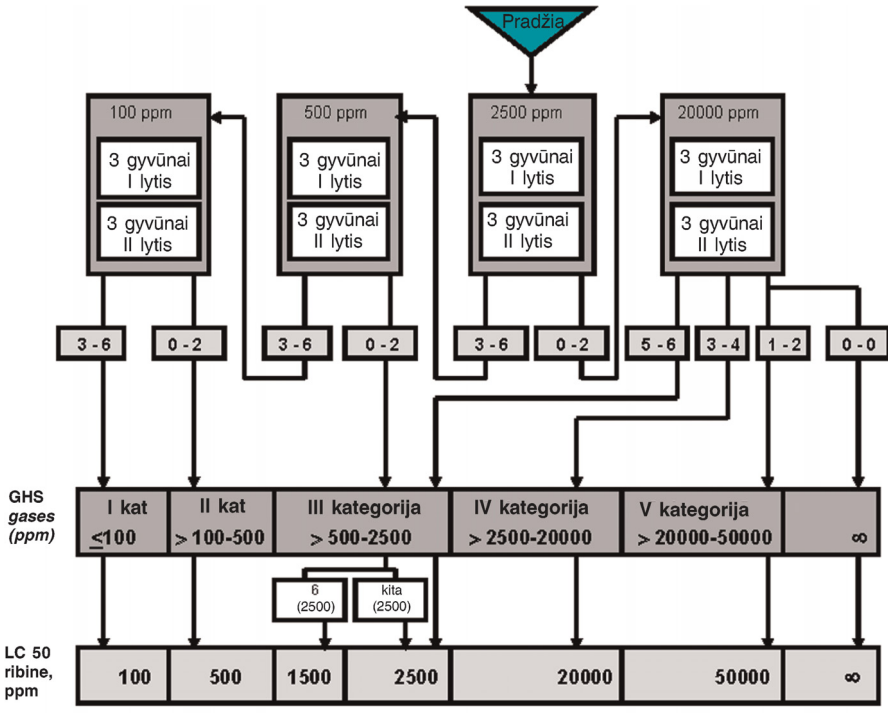
— Bandymai taikant didesnę kaip 20 000 ppm/4 h koncentraciją: žr. Rekomendacinį dokumentą Nr. 39 (8).

▼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.

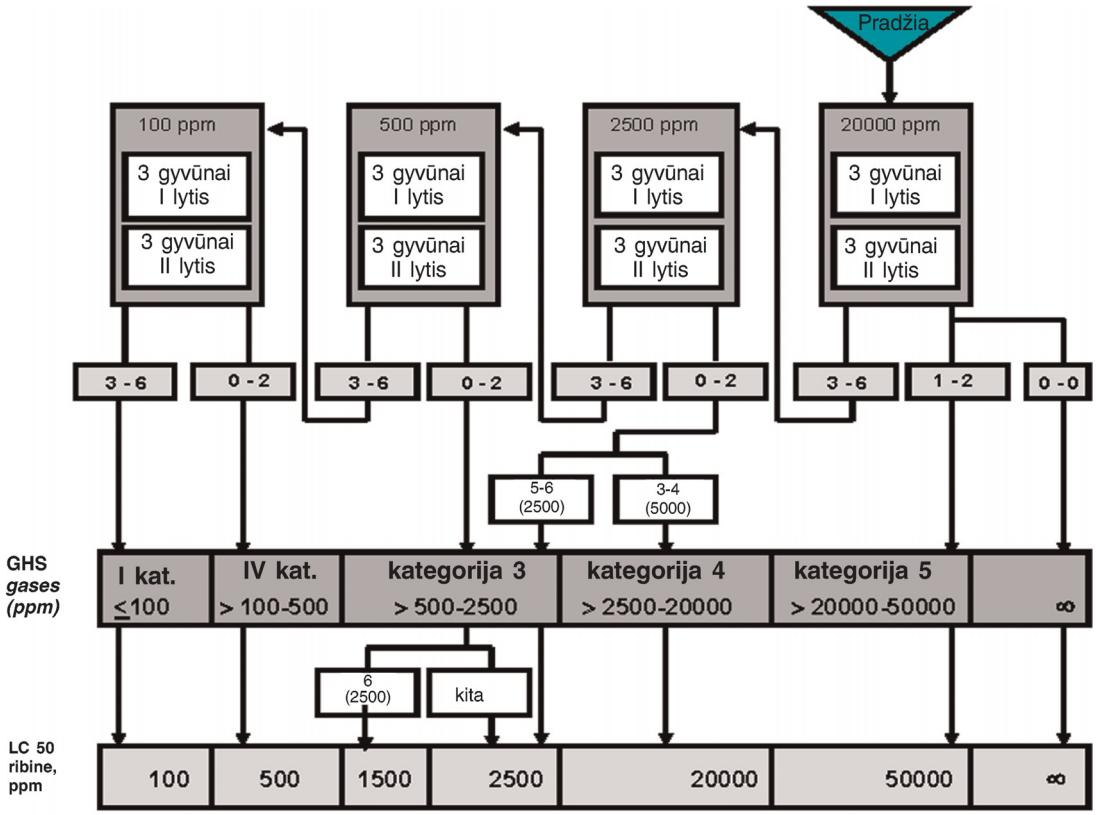
— Bandymai taikant didesnę kaip 20 000 ppm/4 h koncentraciją: žr. Rekomendacinį dokumentą Nr. 39 (8).

▼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.

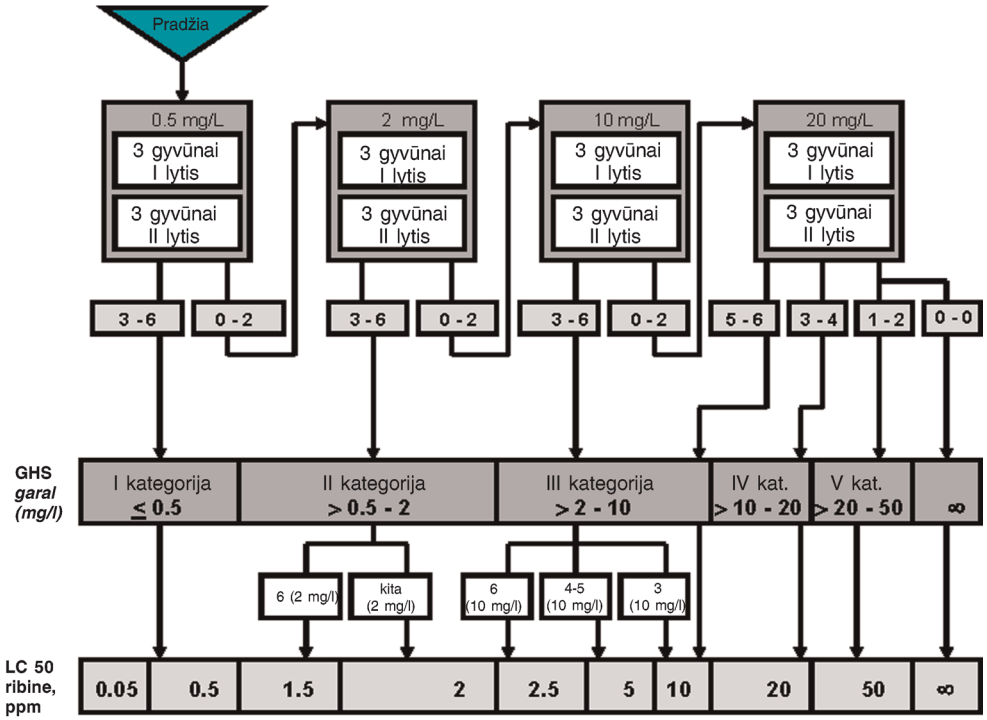
([1]) Toliau pateiktose lentelėse pateiktos nuorodos į visuotinai suderintą cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemą (angl. GHS). ES atitikmuo – Reglamentas (EB) Nr. 1272/2008. Reglamentu (EB) Nr. 1272/2008 (9) nereglamentuojamas 5 kategorijos cheminių medžiagų ūmus toksiškumas įkvėpus.

▼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.

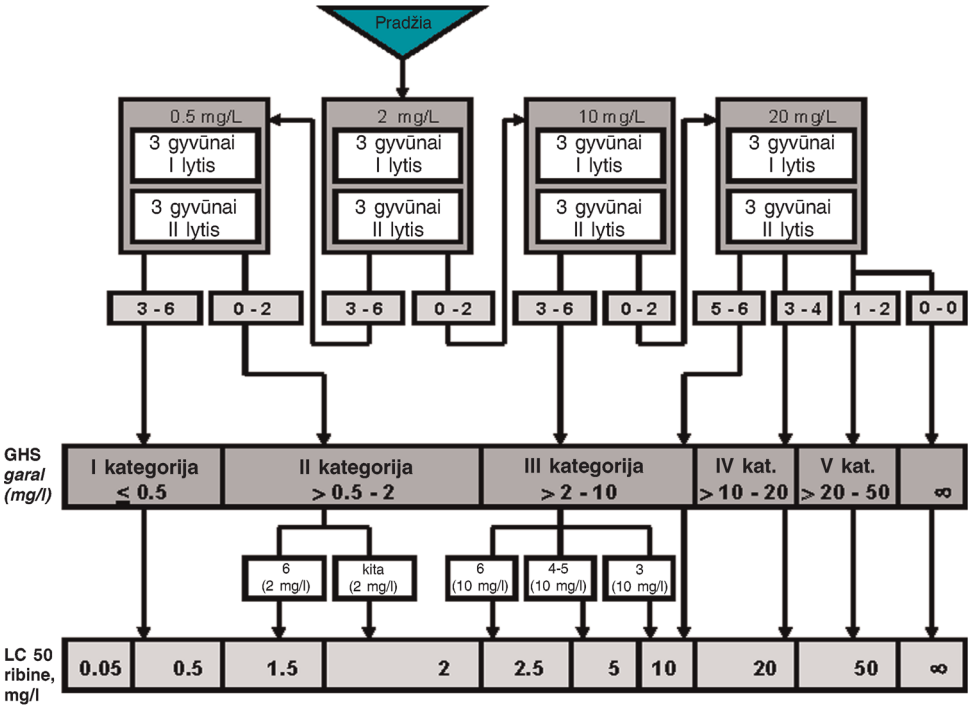
— Bandymai taikant didesnę kaip 20 000 ppm/4 h koncentraciją: žr. Rekomendacinį dokumentą Nr. 39 (8).

▼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.

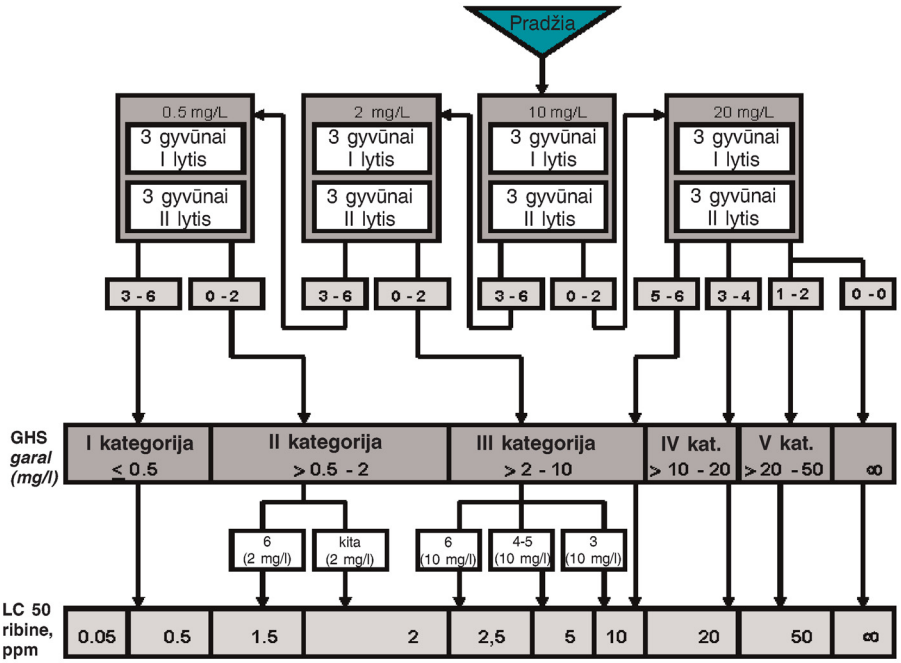
— Bandymai taikant didesnę kaip 20 000 ppm/4 h koncentraciją: žr. Rekomendacinį dokumentą Nr. 39 (8).

▼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.

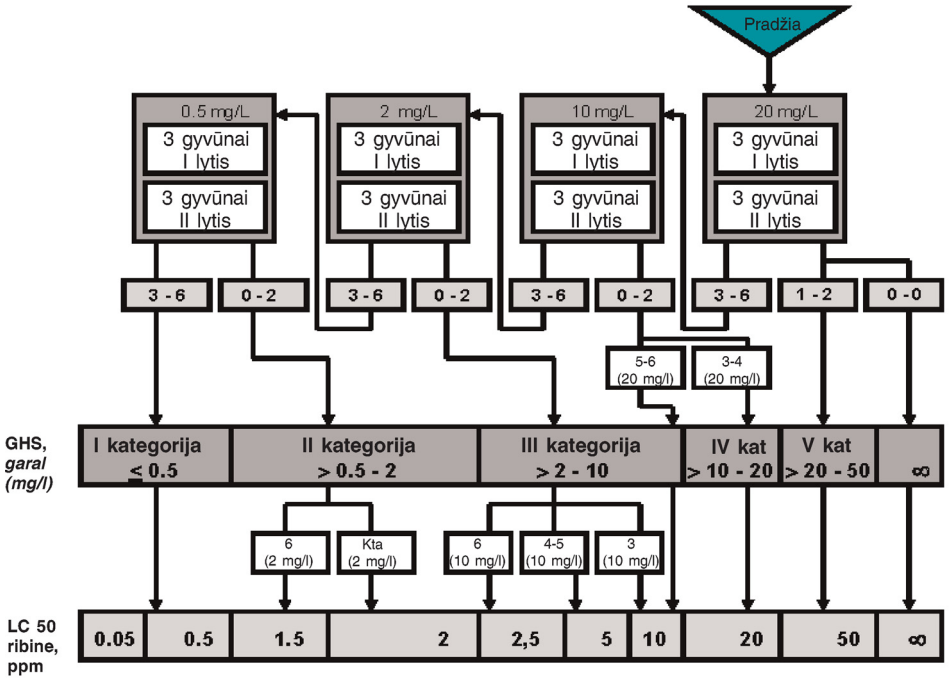
— Bandymai taikant didesnę kaip 20 000 ppm/4 h koncentraciją: žr. Rekomendacinį dokumentą Nr. 39 (8).

▼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.

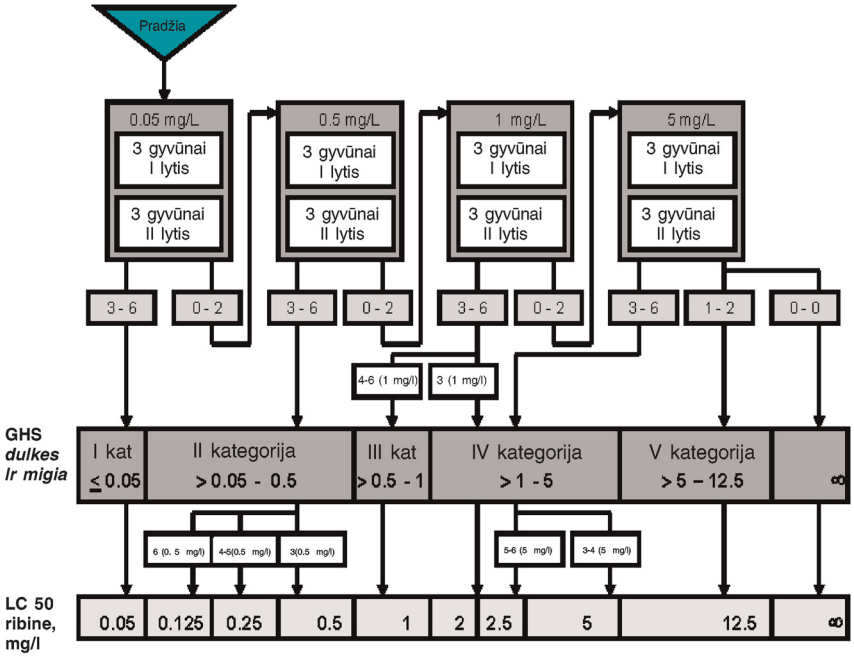
([1]) Toliau pateiktose lentelėse pateiktos nuorodos į visuotinai suderintą cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemą (angl. GHS). ES atitikmuo – Reglamentas (EB) Nr. 1272/2008. Reglamentu (EB) Nr. 1272/2008 (9) nereglamentuojamas 5 kategorijos cheminių medžiagų ūmus toksiškumas įkvėpus.

▼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.

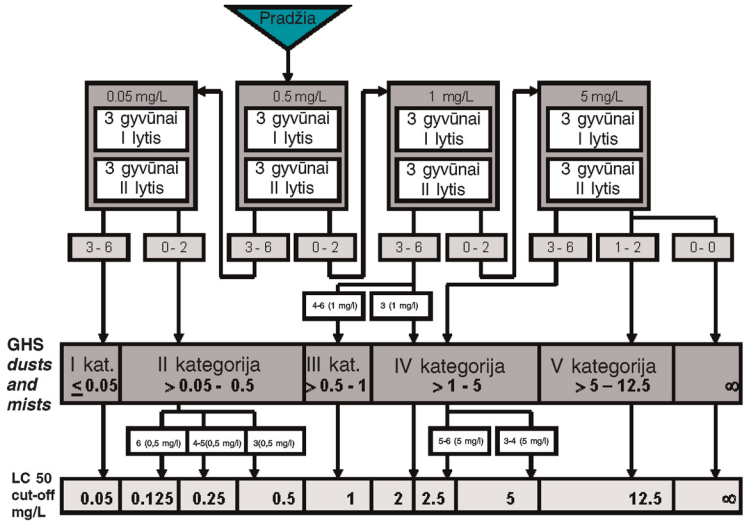
— Bandymai taikant 12,5 mg/l/4 h koncentraciją: žr. rekomendacinį dokumentą Nr. 39 (8).

▼M4

4b priedėlis

Ūmus inhaliacinis toksiškumas.

Bandymų procedūra taikant pradinę 0,5 mg/l/4 h aerozolių koncentraciją



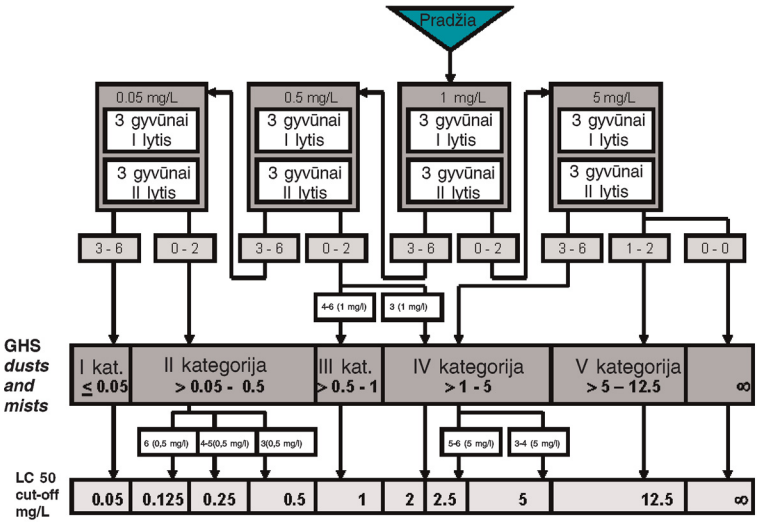
— Kiekvienam lygiui naudojami 3 patinai ir 3 patelės arba 6 jautresniosios lyties gyvūnai.
— 0-6: taikant bandomąją koncentraciją nustatytas gaišusių gyvūnų skaičius.
— GHS: visuotinai suderinta klasifikavimo sistema.
— ∞: neklasifikuojama.
— Bandymai taikant didesnę kaip 20 000 ppm/4 h koncentraciją: žr. Rekomendacinį dokumentą Nr. 39 (8).

▼M4

4c priedėlis

Ūmus inhaliacinis toksiškumas.

Bandymų procedūra taikant pradinę 1 mg/l/4 h aerozolių koncentraciją



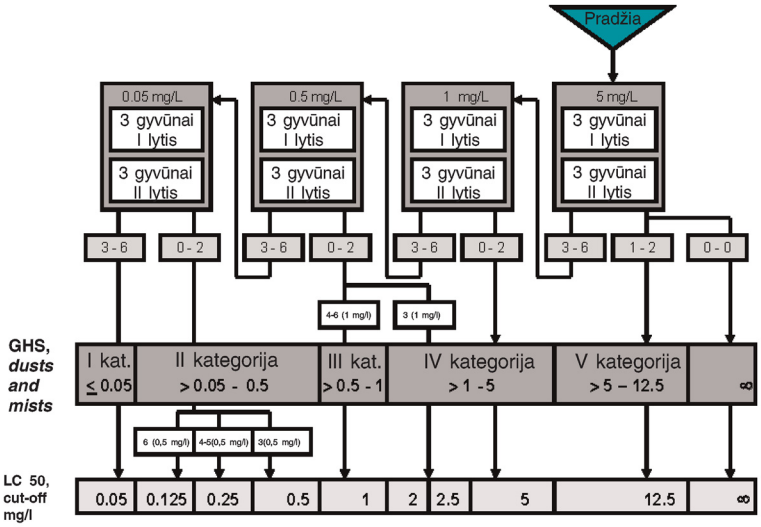
— Kiekvienam lygiui naudojami 3 patinai ir 3 patelės arba 6 įautresnius lytis gyvūnai.
— 0-6: taikant bandomąją koncentraciją nustatytas gaišusių gyvūnų skaičius.
— GHS: visuotinai suderinta klasifikavimo sistema.
— ∞: neklasifikuojama.
— Bandymai taikant didesnę kaip 20 000 ppm/4 h koncentraciją: žr. 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).“

▼C1

C DALIS. EKOTOKSIŠKUMO NUSTATYMO METODAI

TURINYS

C.1.	ŪMUS TOKSIŠKUMAS ŽUVIMS
C.2.	*DAPHNIA* SP. ŪMAUS JUDRUMO SLOPINIMO (IMOBILIZAVIMO) BANDYMAS
C.3.	GĖLO VANDENS DUMBLIAI IR CIANOBAKTERIJOS. AUGIMO INHIBAVIMO 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.	BIOLOGINIS SKAIDYMAS. AKTYVIOJO DUMBLO KVĖPAVIMO INHIBAVIMO BANDYMAS
C.12.	BIOLOGINIS SKAIDYMAS. MODIFIKUOTAS SCAS BANDYMAS
C.13.	BIOLOGINIS KONCENTRAVIMAS. DINAMINIS BANDYMAS SU ŽUVIMIS
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* SPP. AUGIMO INHIBAVIMO BANDYMAS

▼M4

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

▼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 waste-water, 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, Grund-lagen fur die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemi-kalien 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

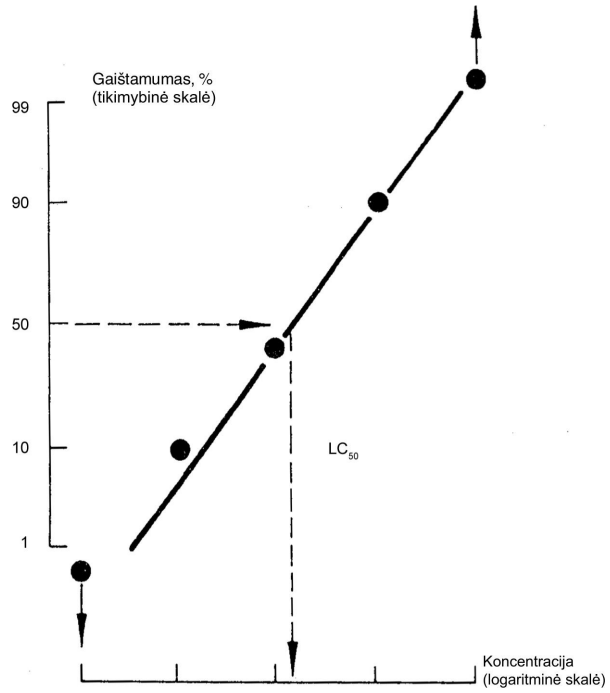
Lentelėje nurodytas žuvis lengva auginti ir (arba) jų galima gauti ištisus metus. Žuvis galima auginti ir veisti žuvų fermose arba laboratorijoje, ligų ir parazitų kontrolės sąlygomis, kad bandomieji gyvūnai būtų sveiki ir būtų žinoma jų kilmė. Šių žuvų yra daugelyje pasaulio kraštų.

▼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/l)	
			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.

▼M1

C.3. GĖLO VANDENS DUMBLIAI IR CIANOBAKTERIJOS. AUGIMO INHIBAVIMO BANDYMAS

1. METODAS

Šis metodas atitinka OECD TG 201 (2006) (1).

1.1. ĮVADAS

Bandymo metodai yra periodiškai peržiūrimi ir atnaujinami, atsižvelgiant į mokslo pažangą. C.2 bandymo metodą reikėjo pataisyti, siekiant įtraukti papildomas rūšis ir atitikti cheminių medžiagų pavojaus įvertinimo reikalavimus bei klasifikavimą. Pataisymas atliktas atsižvelgiant į didelį praktinį patyrimą, mokslo pažangą toksiškumo dumbliams tyrimo srityje ir platų naudojimą norminiuose teisės aktuose, kurie atsirado po pradinio priėmimo.

1.2. APIBRĖŽTYS

Šiame bandymo metode vartojamos šios apibrėžtys ir santrumpos:

Biomasė: populiaciją sudarančios gyvos medžiagos masė, išreikšta tam tikrame tūrio vienete esančios sausos medžiagos mase; pvz., mg dumblių/litre bandymo tirpalo. Paprastai „biomasė“ yra apibrėžiama kaip masė, bet šiame bandyme šis žodis yra vartojamas masei tūrio vienete apibrėžti. Be to, šiame bandyme vietoj biomasės paprastai matuojami pakaitiniai parametrai, pvz., ląstelių skaičius, fluorescencija ir t. t., todėl terminas „biomasė“ taikomas ir šiems pakaitiniams matams.

Variacijos koeficientas: dimensijos neturintis parametro kintamumo matas, apibrėžiamas kaip standartinio nuokrypio ir vidurkio santykis. Jį galima išreikšti procentais. Kartotinių kontrolinių ėminių kultūrų vidutinio savitojo augimo greičio vidutinis variacijos koeficientas turėtų būti apskaičiuojamas taip:

1. Apskaičiuojamas atitinkamo kartotinio ėminio vidutinio savitojo augimo greičio % CV pagal kasdienius (atskirų laikotarpių) augimo greičius.

2. Apskaičiuojama visų pagal 1 punktą apskaičiuotų verčių vidutinė vertė kasdienių (atskirų laikotarpių) kartotinių kontrolinių ėminių kultūrų vidutinio savitojo augimo greičio vidutiniam variacijos koeficientui gauti.

EC_x: bandymo terpėje ištirpusios bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant bandymo organizmo augimo greitis per nustatytą veikimo laikotarpį (tiksliai nurodomą, jei nukrypsta nuo visos arba normalios bandymo trukmės) sumažėja x % (pvz., 50 %). EC vertei, gautai pagal augimo greitį arba pagal išeigą, vienareikšmiškai žymėti vartojami simboliai „E_rC“ ir „E_yC“.

Auginimo terpė: visiškai paruošta sintetinė kultūros terpė, kurioje auga bandomosios medžiagos veikiami bandymo dumbliai. Bandomoji medžiaga paprastai tirpinama bandymo terpėje.

Augimo greitis (**vidutinis specifinis augimo greitis**): logaritminis biomasės didėjimas veikimo laikotarpiu.

▼M1

Mažiausia stebimo poveikio koncentracija (LOEC): mažiausia bandymo terpėje ištirpusios 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 kaip LOEC bandymo koncentracijos vertėms, kenksmingas poveikis turi būti lygus arba didesnis nei poveikis, kuris būtų esant LOEC. Kai negalima įvykdyti šių dviejų sąlygų, turi būti pateiktas išsamus paaiškinimas, kaip buvo pasirinkta LOEC (taigi ir NOEC) vertė.

Nestebimo poveikio koncentracija (NOEC): vos mažesnė nei LOEC bandymo koncentracija.

Atsako kintamasis: toksiškumui įvertinti naudojamas kintamasis, gautas pagal bet kurį nors iš matuojamų parametrų, skirtingais apskaičiavimo metodais aprašančių biomasę. Šiame metode atsako kintamieji yra augimo greičiai ir išeiga, gauti tiesiogiai matuojant biomasę arba kurį nors iš išvardytų pakaitinių parametrų.

Savitasis augimo greitis: atsako kintamasis, apibrėžiamas kaip stebimo parametro (šiame bandymo metode – biomasės) natūraliųjų logaritmų skirtumo ir atitinkamo laikotarpio dalmuo.

Išeiga: matuojamo kintamojo verčių veikimo laikotarpio pabaigoje ir pradžioje skirtumas biomasės padidėjimui bandymo metu išreikšti.

1.3. BANDYMO TAIKOMUMAS

Šį bandymo metodą lengviausia taikyti vandenyje tirpioms medžiagoms, kurios bandymo sąlygomis tikriausiai lieka vandenyje. Norint bandyti lakias, stipriai absorbuojamas, spalvotas, mažai tirpias medžiagas arba medžiagas, galinčias veikti bandymo terpės mitybinių arba mineralinių medžiagų įsisavinimą, gali tekti atlikti tam tikrus procedūros pakeitimus (pvz., naudoti uždarą sistemą, kondicionuoti bandymo indus). Rekomendacijos dėl tam tikrų tinkamų pakeitimų pateiktos (2), (3) ir (4) nuorodose.

1.4. BANDYMO ESMĖ

Šio bandymo tikslas – nustatyti medžiagos poveikį gėlo vandens mikrodumblių ir (arba) cianobakterijų augimui. Pagal eksponentės dėsnį augantys bandymo organizmai paprastai 72 h laikotarpiu veikiami bandomąja medžiaga periodinio kultūrų auginimo sąlygomis. Nežiūrint į palyginti trumpą bandymo trukmę, galima įvertinti poveikį kelioms kartoms.

Sistemos atsakas yra dumblių kultūrų, veikiamų įvairios koncentracijos bandomąja medžiaga, serijos (bandymo vienetų) augimo mažėjimas. Atsakas įvertinamas kaip bandomosios medžiagos koncentracijos funkcija palyginti su kartotinių kontrolinių ėminių kultūrų, neveikiamų bandomąja medžiaga, augimu. Siekiant visiškai išreikšti sistemos atsaką į toksinius poveikius (optimalųjį jautrį), kultūroms leidžiama pakankamai ilgą laiką neribotai augti pagal eksponentę pakankamos mitybos ir nuolatinio apšvietimo sąlygomis, kad būtų galima išmatuoti savitojo augimo greičio mažėjimą.

▼M1

Augimas ir augimo inhibavimas yra kiekybiškai įvertinami matuojant dumblių biomasę kaip laiko funkciją. Dumblių biomasė yra išreiškiama sausos medžiagos mase tūrio vienetui, pvz., mg dumblių/litre bandymo tirpalo. Tačiau sausos medžiagos masę yra sunku išmatuoti, todėl taikomi pakaitiniai parametrai. Iš šių pakaitinių parametrų dažniausiai taikomas ląstelių skaičius. Kitus pakaitinius parametrus sudaro ląstelių tūris, fluorescencija, optinis tankis ir t. t. Turėtų būti žinomas išmatuoto pakaitinio parametro perskaičiavimo į biomasę faktorius.

Bandymo rezultatas – augimo inhibavimas, išreiškiamas kaip biomasės didėjimo veikimo laikotarpiu logaritmas (vidutinis savitasis augimo greitis). Pagal bandymo tirpalų serijai gautus vidutinius savituosius augimo greičius apskaičiuojama apibrėžtą augimo greičio mažėjimą x % (pvz., 50 %) sukelianti koncentracija, kuri išreiškiama E_rC_x (pvz., E_rC_{50}).

Taikant šį metodą pagal ES teisės aktus, rezultatai turėtų būti skaičiuojami remiantis vidutiniu savituoju augimo greičiu dėl 2.2 skirsnyje nurodytų priežasčių. Šiame metode taikomas papildomas atsako kintamasis – išeiga, kuris gali būti reikalingas kai kurių valstybių nustatytiems specifiniams norminiams reikalavimams įvykdyti. Jis yra apibrėžiamas kaip biomasės veikimo laikotarpio pabaigoje ir pradžioje skirtumas. Pagal bandymo tirpalų serijai gautą išeigą nustatoma apibrėžtą išeigos mažėjimą x % (pvz., 50 %) sukelianti koncentracija, kuri išreiškiama E_yC_x (pvz., E_yC_{50}).

Be to, galima statistiškai nustatyti mažiausią stebimo poveikio koncentraciją (LOEC) ir nestebimo poveikio koncentraciją (NOEC).

1.5. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

Informaciją apie bandomąją medžiagą, kuri gali būti naudinga bandymo sąlygoms nustatyti, sudaro struktūrinė formulė, grynumas, patvarumas veikiant šviesai, patvarumas bandymo sąlygomis, šviesos absorbcijos savybės, pKa ir virsmo tyrimų rezultatai, įskaitant biologinio skaidumo vandenyje rezultatus.

Reikėtų žinoti bandomosios medžiagos tirpumą vandenyje, pasiskirstymo oktanolio ir vandens mišinyje koeficientą (P_{ow}) ir garų slėgį, be to, reikėtų turėti patvirtinto tinkamumo kiekybinio nustatymo bandymo tirpaluose metodą, kurio atgavimo efektyvumas ir aptikimo riba būtų paskelbti.

1.6. ETALONINĖ MEDŽIAGA

Kaip priemonė bandymo procedūrai patikrinti gali būti bandoma (-os) etaloninė (-ės) medžiaga (-os), pvz., 3,5-dichlorfenolis, naudotas tarptautiniame tarplaboratoriniame bandyme (4). Dar kaip etaloninę medžiagą žaliesiems dumbliams galima naudoti kalio dichromatą. Pageidautina etaloninę medžiagą bandyti bent du kartus per metus.

1.7. BANDYMO TINKAMUMAS

Turėtų būti vykdomi šie bandymo charakteristikų kriterijai jo tinkamumui patvirtinti:

▼M1

— Per 72 h bandymo laikotarpį kontrolinių ėminių kultūrų biomasė turėtų eksponentiškai padidėti bent 16 kartų. Šis skaičius atitinka savitąjį augimo greitį 0,92 para^{-1}. Dažniausiai naudojamų rūšių augimo greitis paprastai yra gerokai didesnis (žr. 1 priedėlį). Šis kriterijus gali būti neįvykdytas, jei naudojamos rūšys, kurios auga lėčiau nei išvardytos 1 priedėlyje. Toki atveju bandymas turėtų būti pratęstas kontrolinės kultūros kiekiui padidinti bent 16 kartų, ir augimas visą bandymo laiką turi vykti pagal eksponentės dėsnį. Jei tik pasiekiamas mažiausias nustatytas dauginimosi faktorius 16, bandymo laikotarpis gali būti sutrumpintas ne mažiau kaip iki 48 h neribotam eksponentiniam augimui bandymo laikotarpiu užtikrinti.

— Atskirų laikotarpių (0–1, 1–2 ir 2–3 parų, 72 h bandymų) kontrolinių kultūrų savitųjų augimo greičių vidutinis variacijos koeficientas (žr. 1.2 skirsnio punktą „variacijos koeficientas“) neturi viršyti 35 %. Atskirų laikotarpių savitojo augimo greičio skaičiavimas pateiktas 2.2.1 skirsnio antroje pastraipoje. Šis kriterijus taikomas vidutinei variacijos koeficiento vertei, apskaičiuotai kartotinių kontrolinių ėminių kultūroms.

— *Pseudokirchneriella subcapitata* ir *Desmodesmus subspicatus* kontrolinių kultūrų vidutinių savitųjų augimo greičių variacijos koeficientas visą bandymo laikotarpį neturi viršyti 7 %. Kitų rečiau naudojamų rūšių atveju ši vertė neturėtų viršyti 10 %.

1.8. METODO APRAŠYMAS

1.8.1. **Aparatūra**

Bandymo indai ir kita aparatūrą, kuri liečiasi su bandymo tirpalais, turėtų būti pagaminta vien tik iš stiklo arba kitos chemiškai inertinės medžiagos. Indai turėtų būti gerai išplauti, siekiant užtikrinti, kad jokie organiniai arba neorganiniai teršalai negalėtų veikti dumblių augimo arba bandymo tirpalų sudėties.

Paprastai kaip bandymo indai naudojamos stiklinės kolbos, kurių matmenų pakaktų talpinti kultūros kiekį, reikalingą bandymo metu atliekamiems matavimams, ir užtikrinti pakankamą CO_2 masės pernešimą iš atmosferos (žr. 1.8.9 skirsnio antrąją pastraipą). Atkreipiamas dėmesys į tai, kad skysčio tūrio turi pakakti analiziniams nustatymams (žr. 1.8.11 skirsnio penktąją pastraipą).

Be to, bus reikalinga visa arba tik kai kuri ši įranga:

— Kultūros auginimo aparatūra: rekomenduojama naudoti spintą arba kamerą, kurioje temperatūrą būtų galima išlaikyti ±2 °C tikslumu.

— Apšvietimo matavimo prietaisai: svarbu pažymėti, kad išmatuotą vertę veiks šviesos intensyvumo matavimo metodas ir ypač jutiklio (kolektoriaus) tipas. Pageidautina matavimus atlikti naudojant sferinį (4 π) jutiklį (kuris reaguoja į tiesioginę ir atspindėtą šviesą, krintančią visais kampais virš ir žemiau matavimo plokštumos) arba 2 π jutiklį (kuris reaguoja į šviesą, krintančia visais kampais virš matavimo plokštumos).

▼M1

— Aparatūra dumblių biomasei nustatyti. Ląstelių skaičius, kuris yra dažniausiai taikomas dumblių biomasės pakaitinis parametras, gali būti nustatytas naudojant elektroninį dalelių skaitiklį, mikroskopą su skaičiavimo kamera arba tekėjimo citometrą. Kiti biomasės pakaitiniai parametrai gali būti matuojami naudojant tekėjimo citometrą, fluorimetrą, spektrofotometrą arba kolorimetrą. Naudinga apskaičiuoti perskaičiavimo faktorių, kuris susietų sausos medžiagos masę ir dalelių skaičių. Siekiant užtikrinti tinkamus matavimus spektrofotometru, esant mažoms biomasės koncentracijos vertėms, gali tekti naudoti kiuvetes, kurių šviesos kelio ilgis būtų bent 4 cm.

1.8.2. **Bandymo organizmai**

Galima naudoti kelias nepritvirtintų mikrodumblių ir cianobakterijų rūšis. Buvo patikrinta, kad šiame bandymo metode nurodytai bandymo procedūrai tinka 1 priedėlyje išvardyti štamai.

Jei naudojamos kitos rūšys, ataskaitoje turėtų būti nurodytas štamas ir (arba) kilmė. Turi būti patvirtinta, kad pasirinktų bandymo dumblių eksponentinis augimas gali būti užtikrintas visą bandymo laikotarpį vyraujančiomis bandymo sąlygomis.

1.8.3. **Auginimo terpė**

Rekomenduojamos dvi alternatyvios auginimo terpės: OECD ir AAP terpės. Šių terpių sudėtis pateikta 2 priedėlyje. Atkreipiamas dėmesys, kad skiriasi abiejų terpių pradinė pH vertė ir buferinė talpa (pH didėjimui reguliuoti). Todėl bandymų rezultatai gali skirtis dėl naudojamos bandymo terpės, ypač kai bandomos joninės medžiagos.

Auginimo terpes gali tekti tam tikrais atvejais modifikuoti, pvz., kai bandomi metalai ir chelantai arba bandymai atliekami, esant skirtingoms pH vertėms. Modifikuotų terpių naudojimas turi būti detaliai aprašytas ir pagrįstas (3)(4).

1.8.4. **Pradinė biomasės koncentracija**

Visų bandymo kultūrų pradinė biomasė turi būti vienoda ir gana maža, kad būtų įmanomas eksponentinis augimas visą inkubavimo laikotarpį ir nebūtų mitybinių medžiagų išeikvojimo rizikos. Pradinė biomasė neturėtų viršyti 0,5 mg/l sausos medžiagos masės. Rekomenduojamos šios pradinės ląstelių koncentracijos vertės:

Pseudokirchneriella subcapitata:	$5 \times 10^3 – 10^4$	ląstelių/ml
Desmodesmus subspicatus	$2–5 \times 10^3$	ląstelių/ml
Navicula pelliculosa	10^4	ląstelių/ml
Anabaena flos-aquae	10^4	ląstelių/ml
Synechococcus leopoliensis	$5 \times 10^4 – 10^5$	ląstelių/ml

1.8.5. **Bandomosios medžiagos koncentracijos vertės**

Tikėtinus poveikius atitinkantis koncentracijos intervalas gali būti nustatytas atliekant intervalo nustatymo bandymus. Galutiniam nustatomajam bandymui turėtų būti pasirinktos bent penkios koncentracijos vertės, išdėstytos pagal geometrinę progresiją, kurios vardiklis būtų ne didesnis kaip 3,2. Jei bandomosios medžiagos koncentracijos atsako kreivė yra gulsčia, galima pagrįsti didesnį vardiklį. Koncentracijos verčių eilutė turi sudaryti intervalą, atitinkantį 5–75 % dumblių augimo greičio mažėjimą.

▼M1

1.8.6. **Kartotiniai ir kontroliniai ėminiai**

Pagal bandymo planą turėtų būti trys kartotiniai kiekvienos bandymo koncentracijos ėminiai. Jei nereikia nustatyti NOEC, bandymo schema gali būti pakeista padidinant koncentracijos verčių skaičių ir sumažinant kiekvienos bandymo koncentracijos kartotinių ėminių skaičių. Kartotinių kontrolinių ėminių skaičius turi būti ne mažesnis kaip trys ir geriausiu atveju turėtų būti du kartus didesnis nei kiekvienos bandymo koncentracijos kartotinių ėminių skaičius.

Galima paruošti atskirą bandymo tirpalų rinkinį bandomosios medžiagos koncentracijos vertėms nustatyti analizės metodais (žr. 1.8.11 skirsnio ketvirtąją ir šeštąją pastraipas).

Kai bandomajai medžiagai soliubilizuoti naudojamas tirpiklis, turi būti įtraukti papildomi kontroliniai ėminiai, turintys tirpiklio, kurio koncentracija atitiktų naudojamą bandymo kultūroms.

1.8.7. **Sėjimo kultūros ruošimas**

Norint bandymo dumblius pritaikyti prie bandymo sąlygų ir užtikrinti, kad į bandymo tirpalus sėjamų dumblių augimo tarpsnis būtų eksponentinis, 2–4 dienos prieš bandymo pradžią sėjimo kultūra ruošiama bandymo terpėje. Dumblių biomasė turėtų būti reguliuojama taip, kad iki pat bandymo pradžios sėjimo kultūros augimas būtų iš esmės eksponentinis. Sėjimo kultūra turėtų būti inkubuojama bandymo kultūrų sąlygomis. Matuojamas sėjimo kultūros biomasės didėjimas, kad būtų galima užtikrinti bandymo štamo normalų augimo intervalą auginimo sąlygomis. Dumblių auginimo procedūros pavyzdys aprašytas 3 priedėlyje. Siekiant išvengti vienalaikio ląstelių dalijimosi bandymo eigoje, gali būti reikalinga antra sėjimo kultūros dauginimosi pakopa.

1.8.8. **Bandymo tirpalų ruošimas**

Turi būti vienoda visų bandymo tirpalų auginimo terpės koncentracija ir pradinė bandymo dumblių biomasė. Pasirinktos koncentracijos bandymo tirpalai paprastai ruošiami maišant bandomosios medžiagos pradinį tirpalą ir auginimo terpę bei sėjimo kultūrą. Pradiniai tirpalai paprastai ruošiami tirpinant medžiagą bandymo terpėje.

Tirpikliai, pvz., acetonas, *tret*-butilo alkoholis ir dimetilformamidas, gali būti naudojami kaip nešikliai vandenyje mažai tirpioms medžiagoms įdėti į bandymo terpę (2)(3). Tirpiklio koncentracija neturėtų viršyti 100 µl/l ir visų bandymo serijos kultūrų (įskaitant kontrolines) tirpiklio koncentracija turėtų būti vienoda.

1.8.9. **Inkubavimas**

Bandymo indai užkemšami orui nelaidžiais kamščiais. Indai kratomi ir statomi į kultūros auginimo aparatą. Būtina, kad bandymo metu dumbliai būtų suspenduoti CO_2 pernešimui palengvinti. Šiuo tikslu reikėtų nuolat maišyti arba purtyti. Kultūrų temperatūra turėtų būti 21–24 °C intervale ir reguliuojama ±2 °C tikslumu. Jei naudojamos kitos nei 1 priedėlyje nurodytos rūšys, pvz., tropinės rūšys, galbūt labiau tiktų aukštesnė temperatūra, jei būtų įmanoma užtikrinti tinkamumo kriterijus. Rekomenduojama kolbas statyti atsitiktinai ir kasdien keisti jų vietą inkubatoriuje.

▼M1

Bandymo metu kontrolinių ėminių terpės pH neturėtų padidėti daugiau kaip 1,5 vieneto. Jei bandomi ir junginiai, kurie iš dalies jonizuojasi pH vertėms esant arti bandymo terpės pH, gali tekti riboti pH kitimą atkuriamiems ir tiksliai apibrėžtiems rezultatams gauti. Techniškai įmanoma pakeisti pH vertę < 0,5 pH vieneto, ir tai galima pasiekti esant atitinkamam CO_2 masės pernešimo iš aplinkos į bandymo tirpalą greičiui, pvz., didinant maišymo greitį. Kita galimybė – mažinti CO_2 suvartojimą, mažinant pradinę biomasę arba bandymo trukmę.

Paviršius, ant kurio yra inkubuotos kultūros, turėtų būti nuolat ir vienodai apšviestas liuminescencinių lempų šviesa, pvz., šaltai balta arba dienos šviesos tipo šviesa. Dumblių ir cianobakterijų štamų reikalavimai šviesai skiriasi. Šviesos intensyvumas turėtų būti pasirinktas taip, kad atitiktų naudojamą bandymo organizmą. Rekomenduotoms žaliųjų dumblių rūšims pasirinktas šviesos intensyvumas bandymo tirpalų lygyje turėtų atitikti 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ intervalą, kai jis matuojamas esant fotosintezei optimaliam bangų ilgių intervalui 400–700 nm ir naudojant atitinkamą jutiklį. Kai kurios rūšys, ypač *Anabaena flos-aquae*, gerai auga esant mažesniam šviesos intensyvumui ir gali būti pažeistos esant dideliam intensyvumui. Tokioms rūšims turėtų būti pasirinktas vidutinis šviesos intensyvumas 40–60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (Jei apšvietos matavimo prietaisai kalibruoti liuksais, šaltai baltos šviesos 4 440–8 880 liuksų apšvieta maždaug atitinka 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ šviesos intensyvumą). Šviesos intensyvumas virš inkubavimo vietos neturi kisti daugiau kaip ±15 % vidutinio šviesos intensyvumo.

1.8.10. **Bandymo trukmė**

Bandymo trukmė paprastai yra 72 h. Tačiau ji gali būti trumpesnė arba ilgesnė, jei vykdomi visi 1.7 skirsnio tinkamumo kriterijai.

1.8.11. **Matavimai ir analiziniai nustatymai**

Dumblių biomasė kiekvienoje kolboje nustatoma bent kasdien visą bandymo laikotarpį. Jei matavimai atliekami naudojant mažus tūrius, paimamus pipete iš bandymo tirpalo, papildyti šiuos tūrius nereikia.

Biomasės matavimai atliekami skaičiuojant ląsteles mikroskopu rankiniu būdu arba elektroniniu dalelių skaitikliu (ląstelių skaičių ir (arba) biologinį tūrį). Galima taikyti kitus metodus, pvz., pratekamąją citometriją, *in vitro* arba *in vivo* chlorofilo fluorescenciją (6)(7) arba optinio tankio matavimą, jei galima įrodyti patenkinamą koreliaciją su biomase, atitinkančia bandymo biomasės intervalą.

Tirpalų pH turi būti išmatuotas bandymo pradžioje ir pabaigoje.

Jei yra analizės procedūra naudojamo intervalo bandomosios medžiagos koncentracijai nustatyti, bandymo tirpalai turėtų būti analizuojami pradinei koncentracijai patikrinti ir veikimo koncentracijos vertėms bandymo eigoje užtikrinti.

▼M1

Gali pakakti nustatyti mažą ir didelę bandomosios medžiagos koncentraciją bandymo pradžioje ir pabaigoje ir koncentraciją, kuri maždaug atitiktų laukiamą EC_{50} vertę, jei tikėtina, kad bandymo laikotarpiu veikimo koncentracijos vertės keisis mažiau kaip 20 % vardinės vertės. Rekomenduojama nustatyti visas bandymo koncentracijos vertes bandymo pradžioje ir pabaigoje, jei manoma, kad koncentracija vargu ar išliks 80–120 % vardinės vertės. Rekomenduojama veikimo laikotarpiu kas 24 h papildomai imti analizei lakių, nepatvarių arba stipriai adsorbuojamų medžiagų mėginius, kad galima būtų geriau apibrėžti bandomosios medžiagos nuostolį. Bus reikalingi papildomi šių medžiagų kartotiniai ėminiai. Visais atvejais bandomosios medžiagos koncentraciją reikia nustatyti tik viename kiekvienos bandymo koncentracijos kartotinio ėminio inde (arba analizuoti sujungtų kartotinių ėminių turinį).

Bandymo terpės, kurios specialiai ruošiamos veikimo koncentracijai nustatyti bandymo eigoje, turėtų būti apdorojamos kaip ir bandymo terpės, t. y. į jas turėtų būti sėjami dumbliai ir indai inkubuojami vienodomis sąlygomis. Jei reikia nustatyti ištirpusios bandomosios medžiagos koncentraciją, gali tekti dumblius atskirti nuo terpės. Pageidautina atskirti centrifugavimu, esant mažai perkrovos jėgos vertei, kurios pakaktų dumbliams nusodinti.

Jei yra duomenų, kad visą bandymą bandomosios medžiagos koncentracijos kitimas buvo patenkinamas ir ne didesnis kaip ±20 % vardinės arba išmatuotos pradinės koncentracijos vertės, rezultatų analizę galima atlikti pagal vardinę arba išmatuotą pradinę vertę. Jei nuokrypis nuo vardinės arba išmatuotos pradinės koncentracijos yra didesnis kaip ±20 %, rezultatų analizė turėtų būti atliekama pagal veikimo laikotarpio geometrinio vidurkio koncentraciją arba taikant modelius, aprašančius bandomosios medžiagos koncentracijos mažėjimą (3)(8).

Dumblių augimo inhibavimo bandymas yra dinamiškesnė bandymo sistema palyginti su daugeliu kitų trumpalaikių toksiškumo vandens organizmams bandymų. Dėl tos priežasties gali būti sunku apibrėžti faktines veikimo koncentracijos vertes, ypač adsorbuojamų medžiagų, bandomų esant mažoms koncentracijos vertėms. Tokiais atvejais medžiagos išnykimas iš tirpalo dėl adsorbcijos ant dumblių, kurių biomasė didėja, nereiškia, kad ji pasišalino iš bandymo sistemos. Analizuojant bandymo rezultatą, reikėtų patikrinti, ar dėl bandomosios medžiagos koncentracijos mažėjimo bandymo eigoje mažėja augimo inhibavimas. Jei taip, galima nagrinėti, kaip taikyti tinkamą modelį, aprašantį bandomosios medžiagos koncentracijos mažėjimą (8). Jei ne, rezultatų analizę galbūt tiktų pagrįsti pradinėmis (vardinėmis arba išmatuotomis) koncentracijos vertėmis.

1.8.12. **Kiti stebėjimai**

Bandymo pabaigoje sėjimo kultūra turėtų būti apžiūrėta per mikroskopą jos normaliai ir sveikai išvaizdai patikrinti ir visiems dumblių išvaizdos nukrypimams (kuriuos gali sukelti veikimas bandomąja medžiaga) stebėti.

▼M1

1.8.13. **Ribinis bandymas**

Kai kuriomis aplinkybėmis, pvz., kai pradinis bandymas rodo, kad bandomosios medžiagos toksinis poveikis nepasireiškia esant mažesnei kai 100 $mg \cdot l^{-1}$ arba tirpumą bandymo terpėje atitinkančiai koncentracijai (kuri būtų mažesnė), galima atlikti ribinį bandymą, kuriame būtų lyginami kontrolinės grupės ir vienos apdorotų ėminių grupės (100 $mg \cdot l^{-1}$ arba tirpumo vertei lygi koncentracija) atsakai. Labai rekomenduojama, kad jis būtų patvirtintas analizuojant veikiančios medžiagos koncentraciją. Ribiniam bandymui taikomos visos anksčiau aprašytos bandymo sąlygos ir tinkamumo kriterijai, išskyrus tai, kad būtų ne mažiau kaip šeši kartotiniai apdoroti ėminiai. Vidurkiams palyginti kontrolinių ir apdorotų ėminių grupių atsako kintamieji gali būti analizuojami taikant statistinį kriterijų, pvz., Stjudento *t* kriterijų. Jei dviejų grupių dispersijos yra nelygios, analizė turėtų būti atliekama taikant *t* kriterijų, pritaikytą nelygioms dispersijoms.

1.8.14. **Metodo modifikacija, jei bandomos ryškių spalvų medžiagos**

Apšvietimas (šviesos intensyvumas) turėtų būti didžiausias, koks gali būti šiame bandymo metode nustatytame diapazone: 120µE m-2 s-1 arba didesnis.

Šviesos kelias turėtų būti sutrumpinamas sumažinant bandymo tirpalų tūrį (5–25 ml).

Dumblius reikėtų pakankamai suaktyvinti (pavyzdžiui, lengvai pakratant kolbą), kad jie būtų dažnai apšviečiami stipriu šviesos šaltiniu kultūros paviršiuje.

2. **DUOMENYS**

2.1. AUGIMO KREIVIŲ GAVIMAS

Biomasę bandymo induose galima išreikšti matuojamų pakaitinių parametrų vienetais (pvz., ląstelių skaičiumi, fluorescencija).

Augimo kreivių grafikams gauti į lenteles surašomos įvertintos bandymo ir kontrolinių kultūrų biomasės koncentracijos vertės, bandomosios medžiagos koncentracijos vertės ir matavimo laikas, skaičiuojamas bent sveikos valandos tikslumu. Šioje stadijoje gali būti naudingos logaritminių ir linijinių parametrų skalė, bet logaritminės skalės yra privalomos ir paprastai jos geriau rodo augimo vaizdo kitimus bandymo laikotarpiu. Atkreipiamas dėmesys į tai, kad logaritminėse koordinatėse gauta eksponentinio augimo kreivė yra tiesė, kurios palinkimas (krypties koeficientas) žymi savitąjį augimo greitį.

Pagal grafikus tiriama, ar visa bandymą kontrolinės kultūros auga laukiamu greičiu pagal eksponentės dėsnį. Kritiškai tiriami visi duomenų taškai ir grafiko išvaizda, neapdoroti duomenys ir procedūros tikrinamos, norint rasti galimas klaidas. Ypač tikrinami visi duomenų taškai, kurie atrodytų, kad nukrypo dėl sistemingosios paklaidos. Jei akivaizdų, kad galima identifikuoti ir (arba) laikyti labai tikėtinomis procedūros klaidas, konkretus duomenų taškas žymimas kaip riktas ir neįtraukiamas į vėliau atliekama statistinę analizę. (Nulinė dumblių koncentracija viename iš dviejų arba trijų kartotinių ėminių indų gali rodyti, kad į indą nebuvo tinkamai pasėta arba jis buvo blogai išplautas). Duomenų taškų atmetimo kaip riktų priežastys turi būti aiškiai nurodytos bandymų ataskaitoje. Priimamos priežastys yra tik (retos) procedūros klaidos ir ne vien tik blogas preciziškumas. Statistinės riktų identifikavimo procedūros šio tipo problemai taikomos ribotai ir negali pakeisti ekspertų įvertinimo. Riktus (pažymėtus, kad jie yra tokie) geriau būtų palikti tarp duomenų taškų, kurie vėliau kokiu nors būdu pateikiami kaip grafiniai arba lentelių duomenys.

▼M1

2.2. ATSAKO KINTAMIEJI

Bandymo tikslas – nustatyti bandomosios medžiagos poveikį dumblių augimui. Šiame bandymo metode aprašyti du atsako kintamieji, nes valstybės narės juos skirtingai vertina ir skiriasi norminiai reikalavimai. Siekiant užtikrinti rezultatų priimtinumą visose valstybėse narėse, poveikis turėtų būti įvertintas taikant abu toliau aprašytus atsako kintamuosius a ir b.

a) Vidutinis savitasis augimo greitis: šis atsako kintamasis yra apskaičiuojamas pagal biomasės logaritminį padidėjimą bandymo laikotarpiu, išreiškiamą parai.

b) Išeiga: šis atsako kintamasis yra biomasės bandymo pabaigoje ir pradžioje skirtumas.

Taikant šį metodą pagal ES teisės aktus, rezultatai turėtų būti skaičiuojami remiantis vidutiniu savituoju augimo greičiu dėl toliau nurodytų priežasčių. Reikėtų pažymėti, kad nėra lygintinos toksiškumo vertės, apskaičiuotos taikant šiuos du kintamuosius, ir šis skirtumas turi būti suvoktas naudojant bandymo rezultatus. Dėl atitinkamų metodų matematinio pagrindo, savitojo augimo greičio vidurkiu pagrįstos EC_x vertės (E_rC_x), paprastai bus didesnės nei išeiga pagrįsti rezultatai (E_yC_x), jei laikomasi šio bandymo metodo sąlygų. Tai neturėtų būti interpretuojama kaip dviejų atsako kintamųjų jautrio skirtumas, tiesiog vertės skiriasi matematiškai. Vidutinio savitojo augimo greičio sąvoka pagrįsta bendrąja dumblių eksponentinio augimo neribojamose kultūrose schema, kurią taikant toksiškumas įvertinamas pagal poveikį augimo greičiui, kuris nepriklauso nuo kontroliniams ėminiams gauto absoliutaus savitojo augimo greičio lygio, koncentracijos ir atsako kreivės krypties koeficiento arba nuo bandymo trukmės. Priešingai, rezultatai, pagrįsti išeiga kaip atsako kintamuoju, priklauso nuo visų šių kitų kintamųjų. E_yC_x priklauso nuo kiekviename bandyme naudojamų dumblių rūšių savitojo augimo greičio ir nuo didžiausio savitojo augimo greičio, kuris gali būti skirtingas dumblių rūšims ir netgi štamams. Šis atsako kintamasis neturėtų būti taikomas lyginant dumblių rūšių arba net skirtingų štamų jautrį toksinėms medžiagoms. Nors toksiškumui įvertinti moksliniu požiūriu būtų geriau taikyti vidutinį savitąjį augimo greitį, išeiga pagrįsti toksiškumo įverčiai irgi yra įtraukti į šį bandymo metodą, siekiant atitikti kai kurių šalių galiojančių norminių teisės aktų reikalavimus.

2.2.1. **Vidutinis augimo greitis**

Vidutinis savitasis augimo greitis per tam tikrą laikotarpį yra apskaičiuojamas kaip kiekvieno atskiro kontrolinių ir apdorotų ėminių indo biomasės logaritminis padidėjimas pagal lygtį:

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

čia:

μ_{i-j}: – vidutinis savitasis augimo greitis per laiką $i - j$;

X_i: – biomasė laiku i;

X_j: – biomasė laiku j.

▼M1

Kiekvienai apdorotų ir kontrolinių ėminių grupei apskaičiuojama augimo greičio vidutinė vertė ir dispersijos įverčiai.

Apskaičiuojamas visą bandymo trukmę atitinkantis vidutinis savitasis augimo greitis (paprastai 0–3 paros), kaip pradinę vertę naudojant pasėtos biomasės pradinę vardinę vertę, bet ne matuojamą pradinę vertę, nes šiuo būdu paprastai gaunamas didesnis preciziškumas. Jei biomasei matuoti naudojama įranga galima gana tiksliai nustatyti mažą sėjinio biomasę (pvz., tekėjimo citometras), galima naudoti išmatuotą pradinę biomasės koncentraciją. Be to, įvertinamas augimo greitis atskirais laikotarpiais, apskaičiuojamas kaip kiekvienos bandymo dienos savitieji augimo greičiai (0–1, 1–2 ir 2–3 paros) ir tiriama, ar kontrolinių ėminių augimo greitis lieka pastovus (žr. tinkamumo kriterijus, 1.7 skirsnis). Gerokai mažesnis savitasis augimo greitis pirmąją parą palyginti su bendruoju vidutiniu savituoju augimo greičiu gali rodyti vėlavimo tarpsnio buvimą. Tuo tarpu kai kontrolinių kultūrų vėlavimo tarpsnį galima labai sumažinti ir praktiškai pašalinti tinkamai paskleidžiant iš anksto paruoštą kultūrą, veikiamų kultūrų vėlavimo tarpsnis gali rodyti atsigavimą po pradinio toksinio streso arba sumažėjusį palyginti su pradiniu veikimą dėl bandomosios medžiagos nuostolių (įskaitant sorbciją ant dumblių biomasės). Taigi galima įvertinti atskirų laikotarpių augimo greitį, kad būtų galima įvertinti bandomosios medžiagos poveikius veikimo laikotarpiu. Dideli atskiriems laikotarpiams gautų augimo greičių ir vidutinio augimo greičio skirtumai rodo, kad yra nuokrypis nuo pastovaus eksponentinio augimo ir kad reikia atlikti nuodugnų augimo kreivių tyrimą.

Kiekvieno apdoroto kartotinio ėminio augimo greičio mažėjimas procentais apskaičiuojamas pagal lygtį:

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

čia:

$\%\ I_r$ vidutinio savitojo augimo greičio mažėjimas procentais;

μ_C kontrolinės grupės vidutinio savitojo augimo greičio (μ) vidutinė vertė;

μ_T apdoroto kartotinio ėminio vidutinis savitasis augimo greitis.

Kai bandymo tirpalams ruošti naudojami tirpikliai, inhibavimo procentinei daliai apskaičiuoti geriau būtų naudoti tirpiklio kontrolinius ėminius, o ne kontrolinius ėminius be tirpiklių.

2.2.2. **Išeiga**

Išeiga apskaičiuojama kaip biomasės bandymo pabaigoje ir pradinės biomasės skirtumas kiekvienam atskiram kontrolinių ir apdorotų ėminių indui. Kiekvienai bandymo koncentracijai ir kontroliniam ėminiui apskaičiuojama išeigos vidutinė vertė ir dispersijos įverčiai. Kiekvieno apdoroto kartotinio ėminio išeigos mažėjimą procentais ($\%\ I_y$) galima apskaičiuoti taip:

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

▼**M1**

čia:

% I_y: išeigos mažėjimas procentais;

Y_C: vidutinė kontrolinės grupės išeigos vertė;

Y_T: apdoroto kartotinio ėminio išeigos vertė.

2.3. KONCENTRACIJOS IR ATSAKO SANTYKIO KREIVĖS BRĖŽIMAS

Braižomas ir nuodugniai tiriamas inhibavimo procentinės vertės ir bandomosios medžiagos koncentracijos logaritmo grafikas, atmetant visus duomenų taškus, kurie buvo pažymėti kaip riktas per pirmąjį tarpsnį. Iš akies arba taikant kompiuterinį interpoliavimą per duomenų taškus brėžiama tolydi linija pradiniam koncentracijos ir atsako santykio vaizdui gauti, vėliau taikomas detalesnis metodas, pageidautina taikyti kompiuterinį statistinį metodą. Atsižvelgiant į numatytą duomenų paskirtį, kokybę (preciziškumą), duomenų kiekį ir jų analizės priemonių buvimą, gali būti nuspręsta (ir kartais tinkamai pagrįsta) stabdyti duomenų analizę šioje stadijoje ir tiesiog iš akies nubrėžtoje kreivėje rasti pagrindinius skaičius EC_{50} ir EC_{10} (ir (arba) EC_{20}) (dar žr. skirsnį apie skatinamuosius poveikius). Pagrįstomis priežastimis netaikyti statistinio metodo gali būti:

— Duomenys netinka kompiuteriniais metodais gauti rezultatus, kurie būtų patikimesni nei ekspertų įvertinimu gauti rezultatai; tokiomis aplinkybėmis kai kuriomis kompiuterinėmis programomis netgi nepasiseka gauti patikimo sprendinio (iteracijos gali nekonverguoti ir t. t.).

— Negalima tinkamai apdoroti skatinamo augimo atsakų, taikant turimas kompiuterines programas (žr. toliau).

2.4. STATISTINĖS PROCEDŪROS

Tikslas – gauti kiekybinį koncentracijos ir atsako santykį, taikant regresinę analizę. Galima taikyti svertinę tiesinę regresiją, atlikus atsako duomenų tiesinamąjį transformavimą, pvz., į probito, logito arba *Weibullo* vienetus (9), bet geresnės yra netiesinės regresijos metodų procedūros, kurias taikant geriau apdorojami neišvengiami duomenų netolygumai ir nukrypimai nuo glodžiųjų skirstinių. Artėjant į nulinį arba visišką inhibavimą, tokie netolygumai dėl transformavimo gali padidėti ir trukdyti analizei (9). Reikėtų pažymėti, kad tipiniai analizės metodai, taikant probito, logito arba *Weibullo* transformuotus dydžius, yra skirti dichotominiams (pvz., mirtingumas arba išlikimas) duomenims ir turi būti modifikuojami, norint juos pritaikyti augimo arba biomasės duomenims. Specifinės EC_x verčių nustatymo pagal tolydžiuosius duomenis procedūros yra pateiktos (10)(11) ir (12). Netiesinės regresijos taikymas detaliau aprašytas 4 priedėlyje.

▼M1

Kiekvienam analizuojamam atsako kintamajam naudojamas koncentracijos ir atsako santykis EC_x verčių taškiniams įverčiams apskaičiuoti. Kai įmanoma, turėtų būti nustatyti kiekvieno įverčio 95 % pasikliautinieji rėžiai. Atsako duomenų atitiktis regresijos modeliui turėtų būti įvertinta grafiškai arba statistiškai. Regresinė analizė turėtų būti atliekama naudojant atskirus kartotinių ėminių atsakus, bet ne apdorotų ėminių grupių vidurkius. Tačiau jei netiesinę kreivę yra sunku arba nepavyksta pritaikyti dėl per didelės duomenų sklaidos, problemą galima apeiti, atliekant grupės vidutinių verčių regresiją, kuri yra praktinis būdas sumažinti įtariamųjų riktų įtaką. Šio varianto taikymas turėtų būti nurodytas bandymų ataskaitoje kaip nukrypimas nuo normalios procedūros, nes pritaikant kreivę pagal atskirus kartotinius ėminius nebuvo gautas tinkamas rezultatas.

Be to, jei turimi regresijos modeliai (metodai) netinka duomenims, EC_{50} įverčiai ir pasikliautinieji rėžiai gali būti gauti taikant tiesinį interpoliavimą ir savaiminio gerinimo metodus (*anglų k*. bootstrapping) (13).

Norint įvertinti LOEC, taigi ir NOEC, ir bandomosios medžiagos poveikį augimo greičiui, yra būtina palyginti apdorotų ėminių vidutines vertes, taikant dispersinės analizės (ANOVA) metodus. Tuomet kiekvienai koncentracijai gautas vidurkis turi būti lyginamas su kontrolinio ėminio vidurkiu, taikant atitinkamą kartotinių palyginimų arba trendo kriterijaus metodą. Gali būti naudingas *Dunnetto* arba *Williamso* kriterijus (14)(15)(16)(17)(18). Yra būtina įvertinti, ar galioja ANOVA dispersijos vienalytiškumo prielaida. Šį įvertinimą galima atlikti grafiškai arba taikant formalųjį kriterijų (18). Tinkami kriterijai yra *Levene* arba *Bartletto* kriterijai. Neatitiktį prielaidai dėl dispersijų vienalytiškumo kartais galima pataisyti atliekant duomenų logaritminį transformavimą. Jei dispersijos nevienalytiškumas yra labai didelis ir jo neįmanoma pataisyti transformavimo keliu, reikėtų nagrinėti galimybę taikyti kitus analizės metodus, pvz., žingsnio mažinimo *Jonkheere* trendo kriterijus. Papildomus nurodymus dėl NOEC nustatymo galima rasti (12).

Atsižvelgiant į naujus mokslo pasiekimus rekomenduojama atsisakyti NOEC sąvokos ir ją pakeisti regresija pagrįstais EC_x taškiniais įverčiais. Atitinkama šio dumblių bandymo x vertė nėra nustatyta. Atrodo, kad tiktų į 10–20 % intervalą patenkanti vertė (pagal pasirinktą atsako kintamąjį), ir pageidautina ataskaitoje pateikti abi EC_{10} ir EC_{20} vertės.

2.5. AUGIMO SKATINIMAS

Mažoms koncentracijos vertėms kartais yra stebimas augimo skatinimas (neigiamas inhibavimas). Šio reiškinio priežastis gali būti hormezė („toksinis skatinimas“) arba augimą skatinančių priemonių pridėjimas su bandomąja medžiaga į mažiausią naudojamos terpės tūrį. Atkreipiamas dėmesys į tai, kad neorganinių mitybinių medžiagų pridėjimas neturėtų daryti kokį nors tiesioginį poveikį, kadangi bandymo terpėje visą bandymą turėtų būti užtikrintas mitybinių medžiagų perteklius. Į skatinimą mažomis dozėmis paprastai galima nekreipti dėmesio apskaičiuojant EC_{50}, jei jis nėra labai didelis. Tačiau jei jis yra labai didelis arba reikia apskaičiuoti mažą x atitinkančią EC_x vertę, gali tekti taikyti specialias procedūras. Jei įmanoma, reikėtų vengti skatinamųjų atsakų pašalinimo iš duomenų analizės, ir jei turima kreivių pritaikymo programinė įranga negali leisti mažo skatinimo, galima taikyti tiesinę interpoliaciją ir savaiminio gerinimo metodą. Jei skatinimas labai didelis, galima nagrinėti hormezės taikymo klausimą (19).

▼M1

2.6. NETOKSINIS AUGIMO INHIBAVIMAS

Šviesą sugeriančios bandomosios medžiagos gali būti augimo greičio mažėjimo priežastimi dėl to, kad tamsinimas mažina gaunamos šviesos kiekį. Tokie fizikinio tipo reiškiniai turėtų būti atskirti nuo toksinių poveikių, keičiant bandymo sąlygas, ir ataskaitoje apie juos reikėtų paskelbti atskirai. Rekomendacijas galima rasti (2) ir (3)..

3. **ATASKAITOS RENGIMAS**

3.1. BANDYMŲ ATASKAITA

Bandymų ataskaitą turi sudaryti ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

— fizikinė būsena ir atitinkamos fizikocheminės savybės, įskaitant ribinę tirpumo vandenyje koncentraciją,

— cheminio identifikavimo duomenys, įskaitant grynumą.

Bandymo rūšys:

— štamas, tiekėjas arba šaltinis ir naudotos auginimo sąlygos.

Bandymo sąlygos:

— bandymo pradžios data ir jo trukmė,

— bandymo schemos aprašymas: bandymo indai, kultūros tūriai, biomasės tankis bandymo pradžioje,

— terpės sudėtis,

— bandymo koncentracijos vertės ir kartotiniai ėminiai (pvz., kartotinių ėminių skaičius, bandymo koncentracijos verčių skaičius ir taikyta geometrinė progresija),

— bandymo tirpalų ruošimo aprašymas, įskaitant tirpiklių naudojimą ir t. t.,

— kultūros auginimo aparatūra,

— šviesos intensyvumas ir kokybė (šaltinis, vienalytiškumas),

— temperatūra,

— bandytos koncentracijos vertės: vardinės bandymo koncentracijos vertės ir visi bandomosios medžiagos nustatymo bandymo induose rezultatai. Ataskaitoje turėtų būti nurodytas metodo atgavimo laipsnis ir kiekybinio nustatymo riba esant bandymo matricai,

— visi nukrypimai nuo šio bandymo metodo,

— biomasės nustatymo metodas ir duomenys apie matuojamo parametro ir sausos medžiagos masės koreliaciją.

Rezultatai:

— visų apdorotų indų tirpalų pH vertės bandymo pradžioje ir pabaigoje,

— kiekvienos kolbos biomasė kiekviename matavimo taške ir biomasės matavimo metodas,

▼**M1**

— augimo kreivės (biomasės kaip laiko funkcijos grafikas),

— apskaičiuoti kiekvieno apdoroto kartotinio ėminio atsako kintamieji, jų vidutinės vertės ir kartotinių ėminių variacijos koeficientas,

— grafinis koncentracijos ir poveikio santykio pateikimas,

— toksiškumo įverčiai pagal atsako kintamuosius, pvz., EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} ir atitinkami pasikliautinieji 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 reikšminis skirtumas),

— bet koks augimo skatinimas, nustatytas kuriam nors apdorojimo atvejui,

— visi kiti stebėti reiškiniai, pvz., dumblių morfologiniai pokyčiai,

— rezultatų aptarimas, įskaitant nukrypimų nuo šio bandymo metodo įtaką bandymo rezultatams.

4. **LITERATŪRA**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼M1

1 Priedėlis

Patvirtinti bandymams tinkami štamai

Žalieji dumbliai

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

— *Desmodesmus subspicatus* (anksčiau vadinti *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Diatomėjos

— *Navicula pelliculosa,* UTEX 664

Cianobakterijos

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

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

Štamų šaltiniai

Rekomenduojamus štamus galima gauti kaip vienos rūšies dumblių kultūrą iš šių rinkinių (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

Nicholausberger Weg 18

D-3400 Göttingen

GERMANY

UTEX Culture Collection of Algae

Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology

School of Biological Sciences

the University of Texas at Austin

Austin, Texas 78712

USA

▼M1

Rekomenduojamų rūšių išvaizda ir charakteristikos

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Išvaizda	Lenktos, susuktos atskiros ląstelės	Ovalo formos, daugiausia atskiros ląstelės	Strypeliai	Ovalo formos ląstelių grandinės	Strypeliai
Dydis (L × W) 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)
Sausų 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 buvo stebimas augimo OECD terpėje greitis, esant šviesos intensyvumui maždaug 70 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ir 21 °C.

Konkrečios rekomendacijos dėl siūlomų naudoti bandymo rūšių auginimo ir tvarkymo

Pseudokirchneriella subcapitata ir Desmodesmus subspicatus

Šiuos žaliuosius dumblius paprastai lengva prižiūrėti įvairiose kultūros terpėse. Informaciją apie tinkamas terpes galima gauti iš kultūros rinkinių tiekėjų. Ląstelės paprastai yra pavienės ir jų tanki lengva matuoti elektroniniu dalelių skaitikliu arba mikroskopu.

Anabaena flos-aquae

Pradinei kultūrai laikyti tinka įvairios auginimo terpės. Ypač svarbu neleisti pasibaigti atnaujinamos atskiro ėminio kultūros eksponentinio augimo tarpsniui, nes atgaivinti pasibaigus šiam tarpsniui būtų sunku.

Anabaena flos-aquae sudaro lizdo formos ląstelių grandinių agregatus. Šių agregatų dydis gali keistis atsižvelgiant į auginimo sąlygas. Šiuos agregatus gali tekti suardyti, kai biomasei nustatyti skaičiuojama mikroskopu arba elektroniniu dalelių skaitikliu.

Grandinėms suardyti ir dumblių skaičiaus kintamumui sumažinti dalinius ėminius galima apdoroti ultragarsu. Ląstelės gali būti sunaikintos, jei jos apdorojamos ultragarsu ilgiau nei reikia grandinėms sutrumpinti. Kiekvieno apdorojimo ultragarsu intensyvumas ir trukmė turi būti vienodi.

Skaičiuojamas pakankamas skaičius hemocitometro laukų (bent 400 ląstelių) kintamumui sumažinti. Dėl to pagerėtų tankio mikroskopinio nustatymo patikimumas.

Suminiam *Anabaena* ląstelių tūriui nustatyti galima naudoti elektroninį dalelių skaitiklį, ląstelių grandines sutrumpinus atsargiai apdorojant ultragarsu. Ląstelių irimui išvengti apdorojimo ultragarsu energija turi būti reguliuojama.

Siekiant užtikrinti, kad bandymo indams apsėti naudojama dumblių suspensija būtų gerai sumaišyta ir vienalytė, naudojamas sūkurinis maišytuvas arba panašus tinkamas būdas.

▼M1

Bandymo indai statomi ant sukamojo arba slankiojamojo tipo purtyklės stalo ir maišomi 150 apsisukimų per minutę greičiu. Dar galima naudoti periodiškai nutraukiamą maišymą, kuris sumažintų *Anabaena* polinkį sudaryti gniužulus. Jei gniužulai susidaro, būtina imtis priemonių gauti tipinius biomasei matuoti skirtus ėminius. Gali tekti stipriai maišyti prieš ėminių ėmimą, norint suardyti dumblių gniužulus.

Synechococcus leopoliensis

Pradinei kultūrai laikyti tinka įvairios auginimo terpės. Informaciją apie tinkamas terpes galima gauti iš kultūros rinkinių tiekėjų.

Synechococcus leopoliensis auga kaip pavienės strypelio formos ląstelės. Ląstelės yra labai mažos, todėl biomasės matavimams yra sunkiau naudoti skaičiavimą mikroskopu. Tinka elektroniniai dalelių skaitikliai su įranga mažesnėms kaip maždaug 1 μm dydžio dalelėms skaičiuoti. Be to, tinka *in vitro* fluorimetriniai matavimai.

Navicula pelliculosa

Pradinei kultūrai laikyti tinka įvairios auginimo terpės. Informaciją apie tinkamas terpes galima gauti iš kultūros rinkinių tiekėjų. Atkreipiamas dėmesys į tai, kad terpėje turi būti silikato.

Tam tikromis auginimo sąlygomis *Navicula pelliculosa* gali sudaryti agregatus. Dėl lipidų susidarymo dumblių ląstelės kartais gali kauptis paviršiaus plėvelėje. Norint tokiomis aplinkybėmis gauti tipinius ėminius, būtina imtis specialių priemonių, kai daliniai ėminiai imami biomasei nustatyti. Gali būti reikalingas stiprus maišymas, pvz., sūkuriniu maišytuvu.

▼M1

2 priedėlis

Auginimo terpės

Galima naudoti vieną iš šių dviejų auginimo terpių:

OECD terpė: originali OECD TG 201 terpė, be to, naudojama pagal ISO 8692

JAV AAA AAP terpė, be to, naudojama pagal ASTM.

Šioms terpėms ruošti turi būti naudojamos analiziškai grynos cheminės medžiagos ir dejonizuotas vanduo.

AAP terpės (JAV AAA) ir OECD TG 201 terpė

Komponentas	EPA		OECD	
	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. Tai apsaugo nuo geležies jonų nusodinimo, bet tuo pačiu kiek įmanoma sumažinamas sunkiųjų metalų chelatinimas.

Atliekant bandymą su diatomėjomis *Navicula pelliculosa*, į abi terpes turi būti papildomai įdėta $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ 1,4 mg Si/l koncentracijai gauti.

Terpės pH vertė gaunama, nusistovėjus pusiausvyrai tarp karbonatinės sistemos ir atmosferos oro CO_2 dalinio slėgio. pH ir molinės hidrokarbonato koncentracijos santykį, esant 25 °C, apytikriai galima išreikšti taip:

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

▼M1

Esant 15 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 7,5 (JAV AAA terpė) ir esant 50 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 8,1 (OECD terpė).

Bandymo terpės elementinė sudėtis

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

OECD terpės ruošimas

Mitybinė medžiaga	Pradinio tirpalo koncentracija
1 pradinis tirpalas: mitybiniai makroelementai	
NH_4Cl	1,5 $g \cdot l^{-1}$
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 $g \cdot l^{-1}$
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 $g \cdot l^{-1}$
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 $g \cdot l^{-1}$
KH_2PO_4	0,16 $g \cdot l^{-1}$
2 pradinis tirpalas: geležies	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 $mg \cdot l^{-1}$
3 pradinis tirpalas: mikroelementai	
H_3BO_3	185 $mg \cdot l^{-1}$
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 $mg \cdot l^{-1}$
$ZnCl_2$	3 $mg \cdot l^{-1}$
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 $mg \cdot l^{-1}$
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 $mg \cdot l^{-1}$
4 pradinis tirpalas: hidrokarbonatas	
$NaHCO_3$	50 $g \cdot l^{-1}$
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	

Pradiniai tirpalai sterilizuojami filtravimu per membraną (vidutinis akučių skersmuo 0,2 μm) arba apdorojami autoklave (120 °C, 15 min). Tirpalai laikomi tamsoje, esant 4 °C.

Negalima apdoroti autoklave 2 ir 4 pradinių tirpalų, jie sterilizuojami filtravimu per membraną.

▼M1

Auginimo terpė ruošiama į vandenį įpilant atitinkamą 1–4 pradinių tirpalų tūrį:

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

Sterilizuotu vandeniu skiedžiama iki 1 000 ml.

Tirpalai paliekami pakankamą laiką stovėti, kad nusistovėtų terpės ir atmosferos CO_2 pusiausvyra, prireikus kelias valandas barbotuojant sterilų filtruotą orą.

AAP terpės ruošimas

A1.1. 1 ml kiekvieno A1.2.1–A1.2.7 pradinio tirpalo įpilama į maždaug 900 ml dejonizuoto arba distiliuoto vandens ir skiedžiama iki 1 litro.

A1.2. Mitybinių makroelementų pradiniai tirpalai ruošiami tirpinant šiuos medžiagų kiekius 500 ml dejonizuoto arba distiliuoto vandens. A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3 ir A1.2.4 reagentai gali būti sujungti į vieną pradinį tirpaląruošiami tirpinant šiuos medžiagų kiekius 500 ml dejonizuoto arba distiliuoto vandens. A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3 ir A1.2.4 reagentai gali būti sujungti į vieną pradinį tirpalą.

A1.2.1. $NaNO_3$ –12,750 g.

A1.2.2. $MgCL_2 \cdot 6H_2O$ –6,082 g.

A1.2.3. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ –2,205 g.

A1.2.4. *Mitybinių makroelementų pradiniai tirpalai* – (žr. A1.3).

A1.2.5. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ –7,350 g.

A1.2.6. K_2HPO_4 –0,522 g.

A1.2.7. $NaHCO_3$ –7,500 g.

A1.2.8. $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ – žr. A1.1 pastabą.

A1.1 pastaba – Naudojamas tik tokiu atveju, kai bandymo rūšis yra diatomėjos. Gali būti įdėtas tiesiogiai (202,4 mg) arba kaip pradinis tirpalas, kad galutinė terpės koncentracija būtų 20 mg/l Si.

A1.3. Mitybinių mikroelementų pradinis tirpalas ruošiamas 500 ml dejonizuoto arba distiliuoto vandens tirpinant:

A1.3.1. H_3BO_3 –92,760 mg.

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

A1.3.3. $ZnCl_2$ –1,635 mg.

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

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

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

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

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

[dinatrio(etilendinitrilo)tetraacetatas].

▼**M1**

A1.3.9. $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$ –0,005 mg žr A1.2. pastabą.

A1.2 pastaba – Naudojamas tik diatomėjų rūšių pradinių kultūrų terpei.

A1.4. pH vertė 7,5 ± 0,1 nustatoma 0,1 N arba 1,0 N NaOH arba HCl.

A1.5. Terpės filtruojamos į sterilų indą per 0,22 μm membraninį filtrą, jei būtų naudojamas dalelių skaitiklis, arba 0,45 μm filtrą, jei dalelių skaitiklis nebūtų naudojamas.

A1.6. Nenaudojama terpė laikoma tamsoje, maždaug 4 °C temperatūroje.

▼M1

3 priedėlis

Dumblių auginimo procedūros pavyzdys

Bendrosios pastabos

Kultūros auginimo pagal šią procedūrą tikslas – gauti dumblių kultūras toksiškumo bandymams.

Siekiant užtikrinti dumblių kultūrų apsaugą nuo užkrėtimo bakterijomis, turi būti taikomi tinkami metodai. Pageidautina naudoti akseniškas kultūras, tačiau turi būti gautos ir naudojamos vienaląsčių dumblių kultūros.

Visi veiksmai turi būti atliekami steriliomis sąlygomis, kad būtų išvengta užkrėtimo bakterijomis ir kitais dumbliais.

Įranga ir medžiagos

Žr. bandymo metodo skyriaus aparatūros aprašymą.

Dumblių kultūrų gavimo procedūros

Mitybinių medžiagų tirpalų (terpių) ruošimas:

Visos terpės mitybinių medžiagų druskos ruošiamos kaip koncentruoti pradiniai tirpalai, kurie laikomi tamsoje ir šaltai. Šie tirpalai sterilizuojami filtravimu arba apdorojant autoklave.

Terpė ruošiama į sterilų distiliuotą vandenį įpilant tikslų pradinio tirpalo kiekį, imantis priemonių apsaugoti ją nuo užkrėtimo. Ruošiant kietąją terpę įdedama 0,8 procento agaro.

Pradinė kultūra:

Pradinės kultūros yra mažos dumblių kultūros, kurios reguliariai pernešamos į šviežią terpę kaip pradinė bandymų medžiaga. Jei kultūros reguliariai nenaudojamos, jos sėjamos ant gulsčiojo agaro mėgintuvėliuose. Šios kultūros pernešamos į šviežią terpę bent kartą per du mėnesius.

Pradinės kultūros auginamos kūginėse kolbose su atitinkama terpe (tūris apie 100 ml). Kai dumbliai inkubuojami 20 °C temperatūroje nuolatinio apšvietimo sąlygomis, pernešti reikia kas savaitę.

Į kolba su šviežia terpe sterilia pipete pernešamas toks „senos“ kultūros kiekis, kad pradinė greitai augančių rūšių koncentracija būtų maždaug 100 kartų mažesnė nei senos kultūros.

Rūšies augimo greitis gali būti nustatytas iš augimo kreivės. Jei greitis žinomas, galima įvertinti, koks turi būti į naują terpę pernešamos kultūros tankis. Tai turi būti daroma anksčiau kaip kultūra pasiekia žūties tarpsnį.

Iš anksto paruošta kultūra

Iš anksto paruošta kultūra skirta gauti dumblių kiekį, reikalingą bandymo kultūroms sėti. Iš anksto paruošta kultūra inkubuojama bandymo sąlygomis ir naudojama tuomet, kai dar auga eksponentiškai, paprastai maždaug po 2–4 inkubavimo parų. Kai dumblių kultūroje yra deformuotų arba nenormalių ląstelių, jos turi būti pašalintos.

▼M1

4 Priedėlis

Duomenų analizė taikant netiesinę regresiją

Bendrieji klausimai

Dumblių ir kitų mikrobų augimo bandymų atsakas – biomasės augimas yra iš prigimties tolydusis arba metrinis kintamasis: proceso greitis, jei naudojamas augimo greitis, ir jo integralas pagal laiką, kintamuoju pasirinkus biomasę. Abu dydžiai lyginami su atitinkamu neveikiamų kartotinių kontrolinių ėminių vidutiniu atsaku, kuris yra didžiausias atsakas taikomomis sąlygomis, kai dumblių bandymo pagrindiniai lemiami veiksniai yra šviesa ir temperatūra. Sistema yra paskirstytoji arba vienalytė ir į biomasę galima žiūrėti kaip į ištisinį parametrą, neatsižvelgiant į atskiras ląsteles. Tokios sistemos šio tipo atsako dispersijos pasiskirstymas (paprastai aprašomas lognormaliuoju arba normaliuoju paklaidų skirstiniu) susijęs vien tik su bandymo veiksniais. Jis yra priešingas tipiniams dichotominių duomenų biologinio bandymo atsakams, kuriems dažnai daroma prielaida, kad vyraujantis dispersijos komponentas yra atskirų organizmų atsparumas (paprastai binominio skirstinio). Šiuo atveju kontrolinių ėminių atsakai yra nulis arba fono lygis.

Esant paprastai situacijai, normalizuotas arba santykinis atsakas r monotoniškai mažėja nuo 1 (nulinis inhibavimas) iki 0 (visiškas (100 %) inhibavimas). Atkreipiamas dėmesys į tai, kad visi atsakai turi asocijuotąją paklaidą ir kad gali būti apskaičiuotas tariamas neigiamas inhibavimas, kaip vien tik atsitiktinės paklaidos rezultatas.

Regresinė analizė

Modeliai

Regresinės analizės tikslas – koncentracijos ir atsako santykio kreivę kiekybiškai aprašyti kaip matematinę 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}, bei jų 95 % pasikliautinuosius rėžius. Pasirodė, kad kelios paprastos matematinių funkcijų formos tinka sėkmingai aprašyti koncentracijos ir atsako santykius, gaunamus atliekant dumblių augimo inhibavimo bandymus. Tokios funkcijos būtų, pvz., logistinė lygtis, nesimetrinė *Weibulo* lygtis ir lognormaliojo skirstinio funkcija, kurios visos yra sigmoidės, asimptotiškai artėjančios prie vieneto, kai C → 0, ir prie nulio, kai C → begalybę.

Neseniai buvo pasiūlyta vietoj asimptotinių modelių taikyti tolydžiosios ribinės funkcijos modelius (pvz., *Koymano*„populiacijos augimo inhibavimo“ modelį, Kooijman et al. 1996). Pagal šį modelį daroma prielaida, kad poveikio nėra, kai koncentracija yra mažesnė nei tam tikra ribinė vertė EC0+, kuri įvertinama ekstrapoliuojant atsako ir koncentracijos santykį iki susikirtimo su koncentracijos verčių ašimi, kai santykiui išreikšti naudojama paprasta tolydžioji funkcija, nediferencijuojama pradžios taške.

Atkreipiamas dėmesys į tai, kad jei kompensuojamas dispersijos nevienalytiškumas, analizė gali būti tiesiog liekamųjų kvadratų (darant prielaidą apie pastovią dispersiją) arba svertinių mažiausių kvadratų sumos minimizavimas.

▼M1

Procedūra

Procedūrą galima bendrais bruožais apibūdinti taip: pasirenkama atitinkama funkcinė lygtis Y = f (C) ir pritaikoma duomenims, taikant netiesinę regresiją. Pageidautina naudoti kiekvienos atskiros kolbos matavimų duomenis, bet ne vidutines kartotinių ėminių vertes, iš duomenų siekiant gauti kiek įmanoma daugiau informacijos. Tačiau, kita vertus, jei dispersija yra didelė, praktinis patyrimas rodo, kad kartotinių ėminių vidutinės vertės gali užtikrinti tvirtesnį matematinį įvertinimą, mažiau paveiktą duomenų sisteminguųjų paklaidų, palyginti su tuo atveju, kai imamas kiekvienas paliktas atskiras duomenų taškas.

Pažymimi duomenų taškai, brėžiama pritaikyta kreivė ir tiriama, ar parinkta kreivė tinka. Šiam tikslui gali būti ypač naudinga liekanų analizė. Jei pasirinktoji koncentracijos ir atsako pritaikymo funkcija tinka ne visai kreivei arba kuriai nors jos esminei daliai aprašyti, pvz., atsako duobei esant mažoms koncentracijos vertėms, vietoj simetrinės pasirenkama kita pritaikoma kreivė, pvz., nesimetrinė *Weibulo* funkcijos kreivė. Neigiamas inhibavimas gali kelti problemų, pvz., naudojant lognormaliąją pasiskirstymo funkciją, kai irgi reikės taikyti kitą regresijos funkciją. Tokių neigiamų verčių nerekomenduojama prilyginti nuliui arba priskirti joms kitą mažą teigiamą vertę, nes taip būtų iškreiptas paklaidų pasiskirstymas. Galbūt tiktų pritaikyti kreivę atskirai kreivių dalims, pvz., mažo inhibavimo daliai, norint įvertinti $EC_{low\ x}$ skaičius. Pagal pritaikytą lygtį apskaičiuojami (taikant „atvirkštinį įvertinimą“ $C = f^{-1}$ (Y) būdinguųjų taškų įverčiai EC_x, ir ataskaitoje pateikiamas bent EC_{50} įvertis ir vienas iš dviejų $EC_{low\ x}$ įverčių. Praktinių bandymų patyrimas parodė, kad dumblių bandymo preciziškumas paprastai leidžia gana tiksliai įvertinti 10 % atitinkantį inhibavimo lygį, jei yra pakankamas duomenų taškų skaičius, išskyrus kai esant mažoms koncentracijos vertėms trukdantis veiksnys yra augimo skatinimas. EC_{20} įverčio preciziškumas dažnai yra gerokai geresnis palyginti su EC_{10}, nes EC_{20} paprastai yra apytikriai tiesiojoje vidurinės koncentracijos atsako kreivės dalyje. Kartais EC_{10} yra sunku interpretuoti dėl augimo skatinimo. Taigi, nors EC_{10} paprastai galima gauti pakankamu tikslumu, ataskaitoje visuomet rekomenduojama pateikti EC_{20}.

Svertiniai koeficientai

Bandymų dispersija apskritai yra nepastovi ir jos dalį paprastai sudaro proporcingasis komponentas, taigi kaip įprasta sėkmingai atliekama svertinė regresija. Tokiai analizei naudojami svertiniai koeficientai paprastai laikomi atvirkščiai proporcingais dispersijai:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Daug regresijos programų leidžia pasirinkti svertinės regresijos analizę, svertinius koeficientus pateikiant lentelėje. Būtų patogu svertinius koeficientus normalizuoti, dauginant juos iš $n/\Sigma\ w_i$ (n yra duomenų taškų skaičius), taigi jų suma yra lygi vienetui.

Atsakų normalizavimas

Normalizavimas pagal vidutinį kontrolinio ėminio atsaką sukelia kai kurių metodinių problemų ir gaunama gana sudėtingos struktūros dispersiją. Dalinant atsakus iš vidutinio kontrolinio ėminio atsako inhibavimo procentinei vertei gauti, atsiranda papildoma vidutinio kontrolinio ėminio atsako paklaida. Išskyrus kai ši paklaida yra labai maža, turi būti daroma regresijos svertinių koeficientų ir pasikliautinųjų rėžių kontrolinio ėminio kovariacijos pataisa (17). Atkreipiamas dėmesys į tai, kad yra labai svarbus vidutinio kontrolinio ėminio atsako įverčio preciziškumas, kad būtų kiek įmanoma sumažinta santykinio atsako suminė dispersija. Ši dispersija atrodo taip:

▼M1

apatinis indeksas i rodo koncentraciją i, indeksas 0 atitinka kontrolinius ėminius

$$Y_i = \text{santykinis atsakas} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i),$$

kurio dispersija:

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

ir kadangi

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

esant normaliam duomenų skirstiniui ir m_i bei m_0 yra kartotiniai ėminiai:

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

taigi suminė santykinio atsako dispersija Y_i tampa:

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

Kontrolinio ėminio vidurkio paklaida yra atvirkščiai proporcinga suvidurkintai kvadratinei šakniai iš kontrolinių kartotinių ėminių skaičiaus, ir kartais pasiteisina įtraukti sukauptus duomenis ir šiuo būdu labai sumažinti paklaidą. Pagal kitą procedūrą nereikia normalizuoti duomenų ir pritaikyti absoliučius atsakus, įskaitant kontrolinių ėminių atsakų duomenis, bet imti kontrolinių ėminių atsako vertę kaip papildomą parametrą, kurį reikia pritaikyti netiesinės regresijos metodu. Jei paprastai taikoma 2 parametrų regresijos lygtis, taikant šį metodą reikia pritaikyti pagal 3 parametrus, todėl reikia daugiau duomenų taškų, nei taikant netiesinę regresiją duomenims, kurie yra normalizuojami naudojant iš anksto nustatytą kontrolinių ėminių atsaką.

Atvirkštiniai pasikliautinieji intervalai

Netiesinės regresijos pasikliautinųjų intervalų apskaičiavimas taikant atvirkštinį įvertinimą yra gana sudėtingas ir paprastuose statistinių kompiuterinių programų rinkiniuose jo nėra kaip tipinės pasirinkties. Apytikrius pasikliautinuosius intervalus galima gauti, taikant tipines netiesinės regresijos programas ir parametrų pakeitimą (Bruce ir Versteeg, 1992), kurį sudaro matematinės lygties perrašymas pagal reikiamus taškų įverčius, pvz., EC_{10} ir EC_{50} kaip parametrus, kuriuos reikia įvertinti. (Tegul bus funkciją 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 *Tayloro* eilutės skleidinį apie r_i ir r_0 vidurkius.

Neseniai populiariais tapo savaiminio gerinimo (*boot strap*) metodai. Empiriniam dispersijos skirstiniui įvertinti taikant tokius metodus, naudojami išmatuoti duomenys ir atsitiktinių skaičių generatoriaus valdomas dažnas kartotinis ėminių ėmimas.

Literatūra

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

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

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

▼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 langą 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 iš sėjimo kultūros = 1,1 × (50–48) = 2,2 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:

$$\text{\% of } ThCO_2 = \left(\frac{(\text{IC kolboje su bandomąja medžiaga (mg)} - \text{IC kolboje su tuščiuoju bandiniu (mg)})}{(\text{TOC, pridėtos kaip bandomoji medžiaga, masė (mg)})} \right) \times 100$$

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:

$$\text{biologinio skaidymo \%} = \text{\% ThOD} = \left(\frac{(\text{BOD(mg O}_2\text{/mg cheminės medžiagos))}}{(\text{ThOD(mg O}_2 \text{ cheminei medžiagai))} \right) \times 100$$

arba pagal:

$$\text{\% COD} = \left(\frac{(\text{BOD(mg O}_2\text{/mg cheminės medžiagos))}}{(\text{COD(mg O}_2 \text{ cheminės medžiagos))} \right) \times 100$$

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	$\frac{(a-b)}{(C_oV)}$	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,

$$ThOD_{NH4} = \left(\frac{(16\,[2\,c + 1/2\,(h - cl - 3\,n) + 3\,s + 5/2\,p + 1/2\,na - o])}{(MW)} \right) \text{ mg/mg}$$

kai nitrifikavimas vyksta

$$ThOD_{NO3} = \left(\frac{(16\,[2\,c + 1/2\,(h - cl) + 5/2\,n + 3\,s + 5/2\,p + 1/2\,na - o])}{(MW)} \right) \text{ mg/mg}$$

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 Sauerstoffbedarfs (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 % ($t_{0,5,\ 25\ °C}$ > 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.

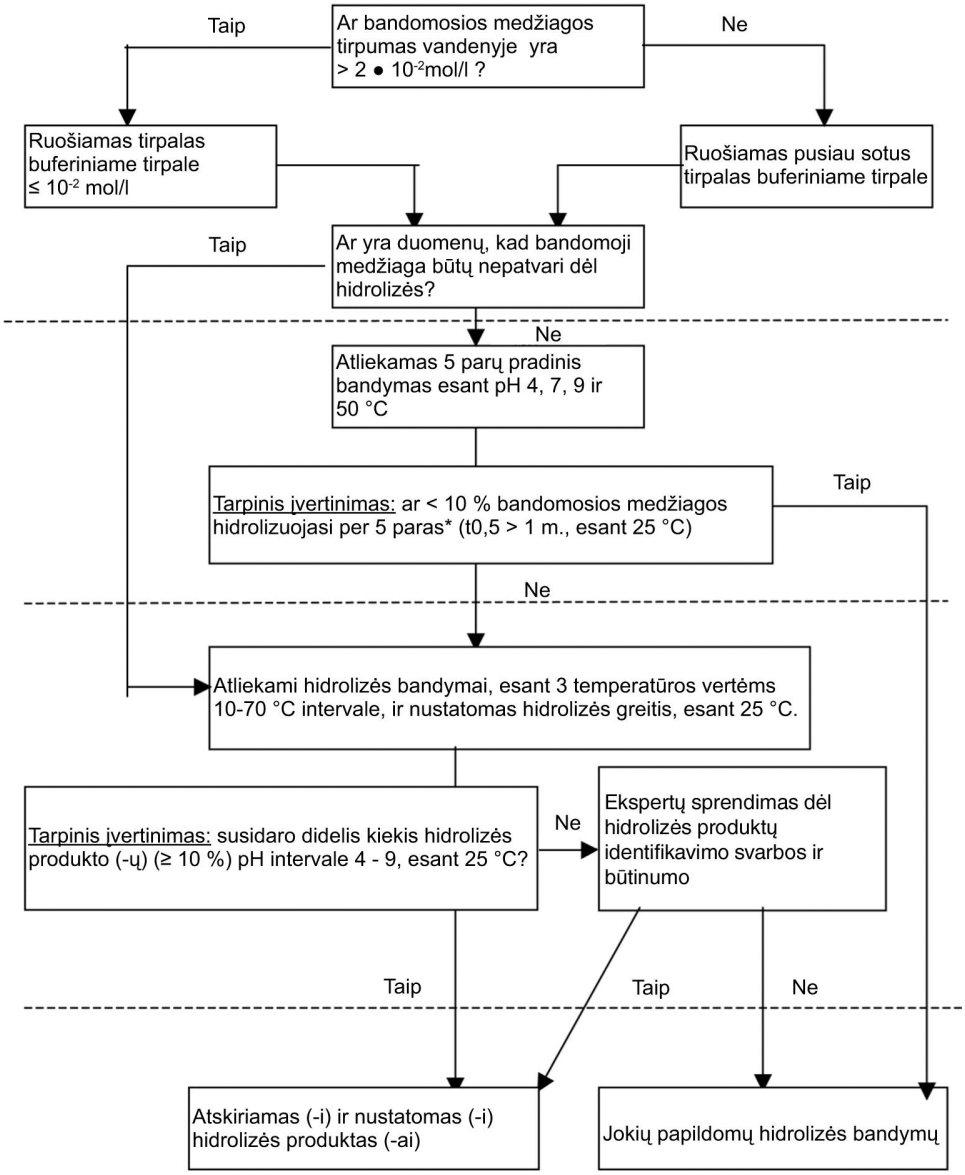
10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

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 lygtimis:

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

([1]) 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 l 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.

A k t y v i o j o d u m b l o v e i k i m o t i k r i n i m a s

Norint patikrinti funkcinę aktyviojo dumblo gebą, lygiagrečiai kiekvienai bandymų serijai turi būti atliekamas bandymas su žinoma medžiaga. Buvo nustatyta, kad šiam tikslui tinka dietilenglikolis.

A d a p t a v i m a s

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

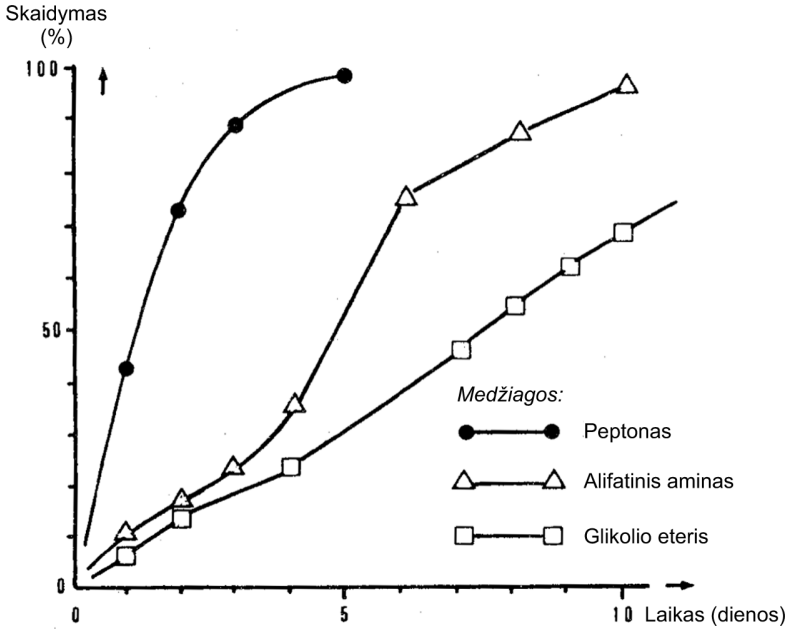
Bandymo trukmė	Kontrolinė medžiaga				Bandomoji medžiaga		
	Tuščiojo bandinio DOC ([1]) mg/l	DOC ([1]) mg/l	DOC grynasis kiekis mg/l	Skaidymas %	DOC ([1]) mg/l	DOC grynasis kiekis mg/l	Skaidymas %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 valandos	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 para	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	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

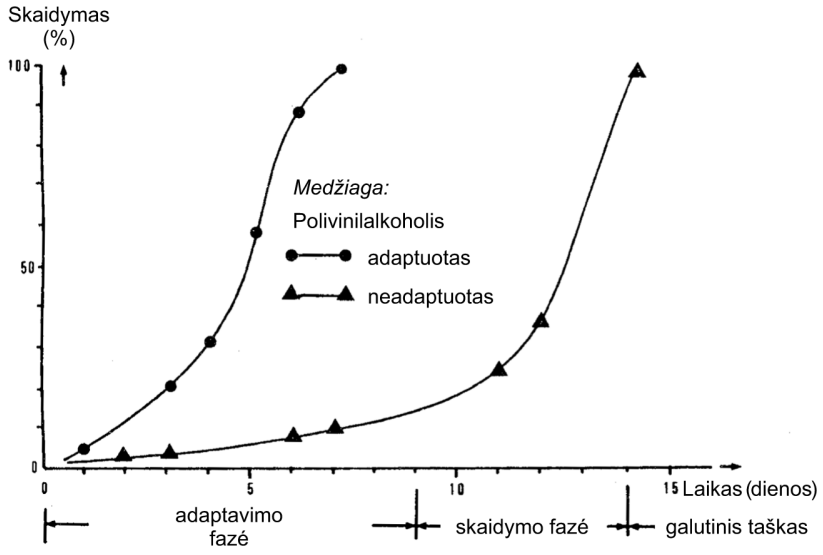
1 paveikslas

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 perkolia-cija 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 nepa-darant 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 skai-dumo bandymo reikalavimų neatitikusios cheminės medžiagos nebuvo suskaidytos atliekant modeliavimo bandymus (9) (10) (11).

4. Tam tikrais tikslais pakanka vienodomis darbo sąlygomis atliktų modelia-vimo 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 apara-tūra 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 sumontuoti

▼M4

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 eksploatuojamu 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.

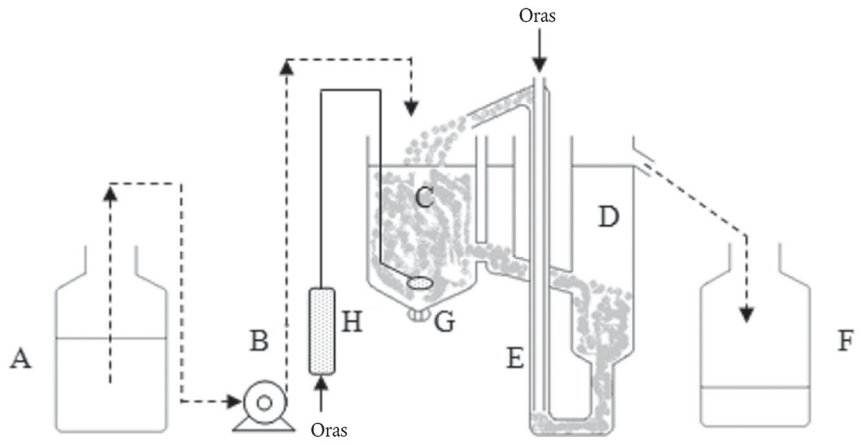
▼**M4**

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

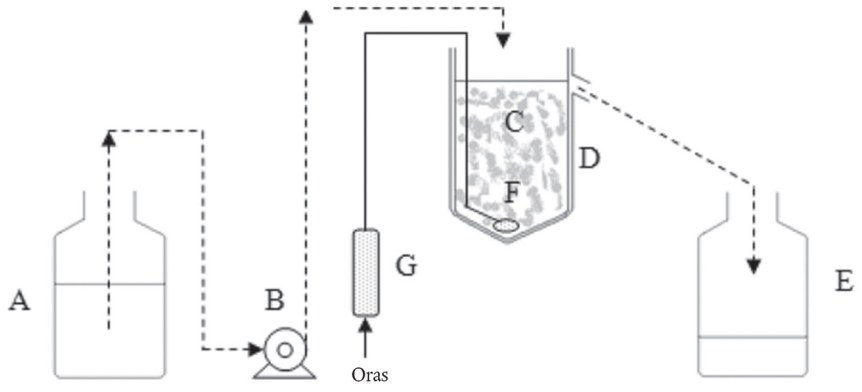
G. Aeratorius

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

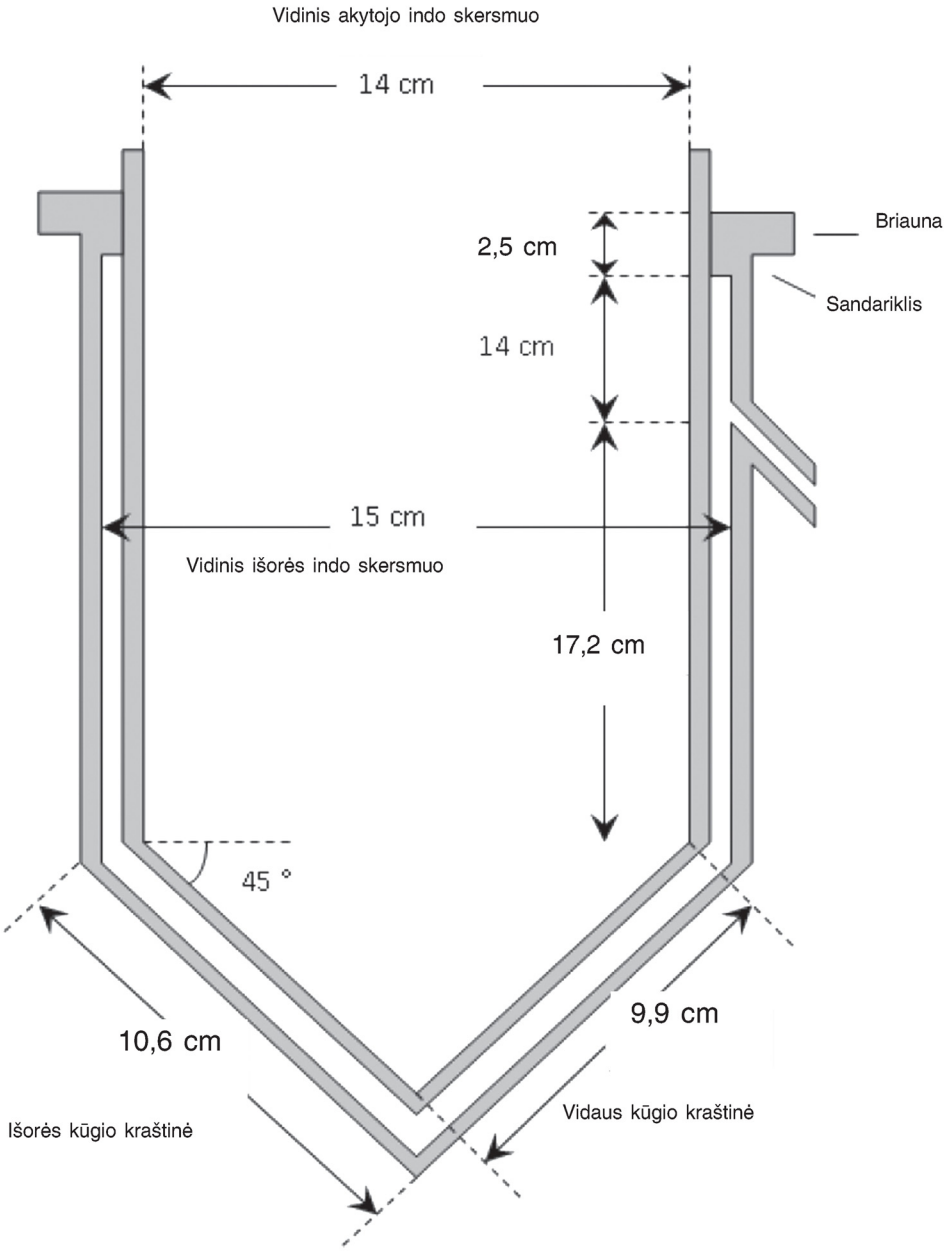
F. Oro sklaidytuvas

G. Oro srauto matuoklis

▼M4

3 paveikslas

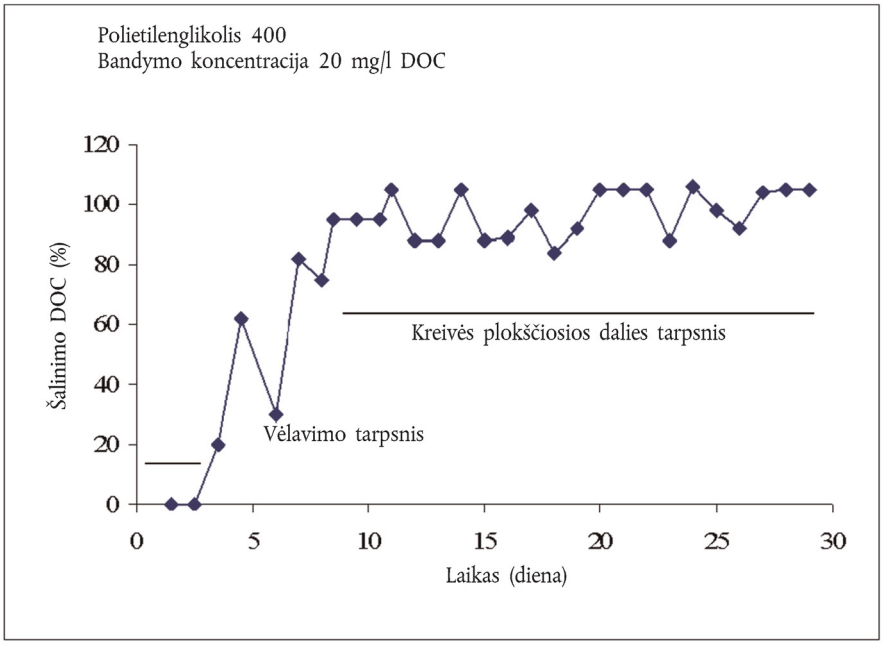
3 litrų talpos akytojo indo aeravimo rezervuaro dalys



▼**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

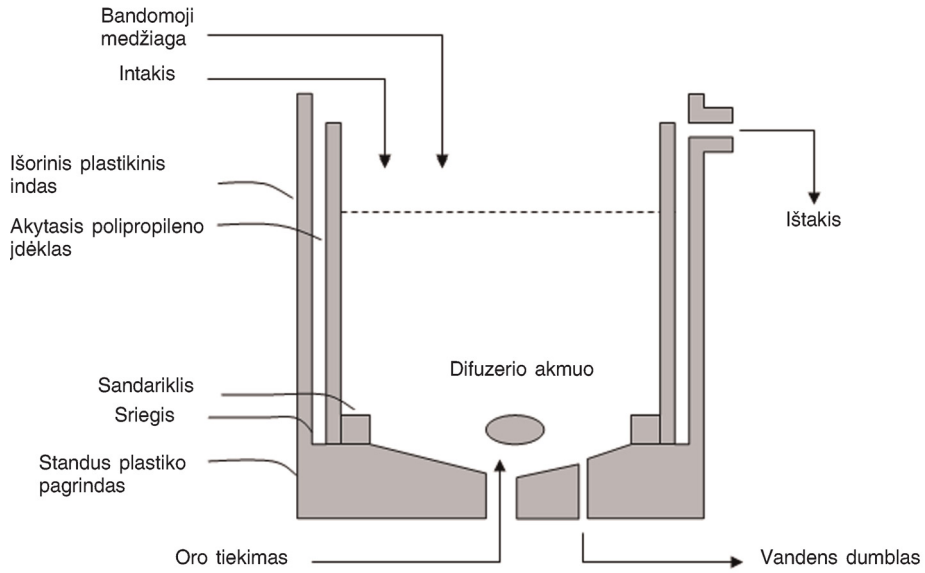
4. Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742–748.

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

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

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 μ_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:

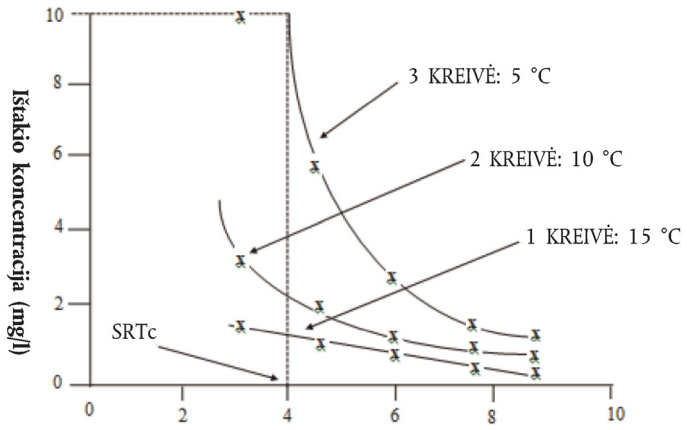
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

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

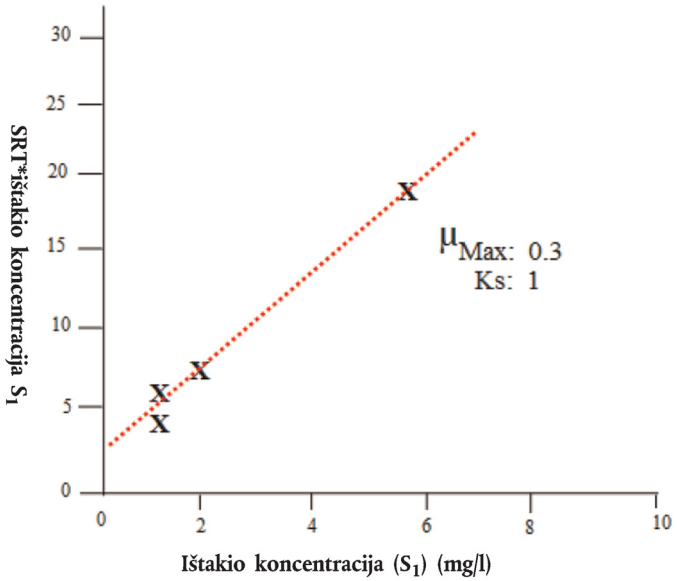
1 paveikslas

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.

▼M4

Įterpiami dviejų ar daugiau koncentracijų (koncentracijos intervalas 1–50 μg/l) dumblo ir bandomosios cheminės medžiagos mišiniai yra aeruojami 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 iškl otas 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.

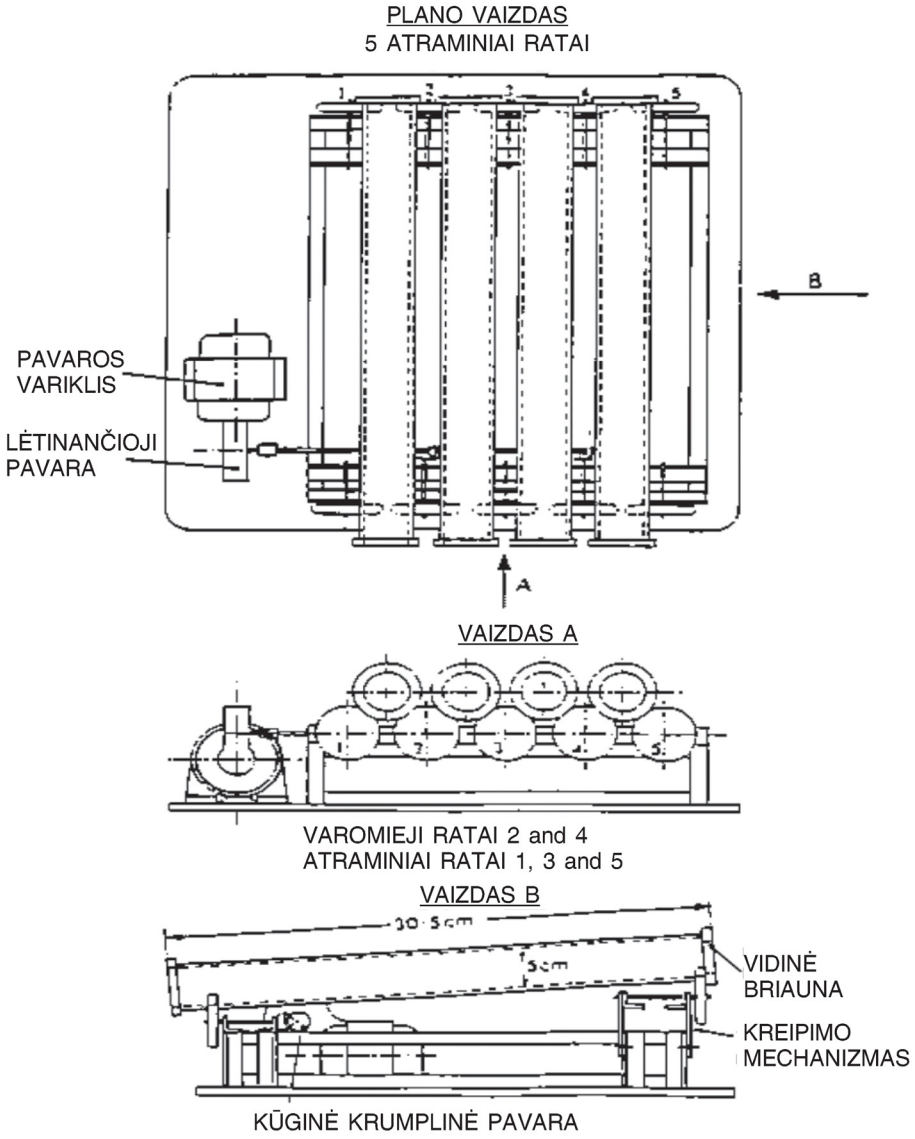
10. ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

▼**M4**

8 priedėlis

1 paveikslas

Sukamieji vamzdžiai



Žodynėlis

plano vaizdas

A-B vaizdas

varomieji ratai

atraminiai ratai

pavaros variklis

lėtinančioji pavara

vidinė briauna

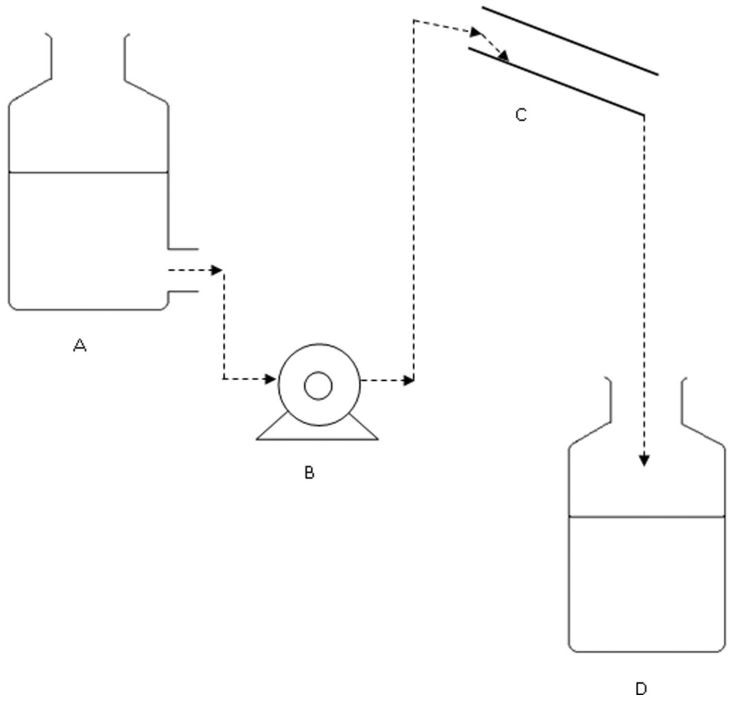
kreipimo mechanizmas

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“.

▼C1

C.11. **BIOLOGINIS SKAIDYMAS**

AKTYVIOJO DUMBLO KVĖPAVIMO INHIBAVIMO BANDYMAS

1. **METODAS**

1.1. ĮVADAS

Aprašytas metodas įvertina bandomosios medžiagos poveikį mikroorganizmams, kai apibrėžtomis sąlygomis ir naudojant skirtingas bandomosios medžiagos koncentracijas matuojamas kvėpavimo intensyvumas.

Šio metodo tikslas yra duoti greitą atrankos metodą, kuriuo galima būtų identifikuoti medžiagas, galinčias neigiamai veikti aerobinius mikrobinio valymo įrenginius, ir nustatyti bandomųjų medžiagų koncentracijas, kurias naudojant nebūtų inhibavimo ir kurios būtų tinkamos naudoti biologinio skaidumo bandymuose.

Prieš galutinį bandymą gali būti atliekamas intervalo nustatymo bandymas. Jis suteikia informacijos apie koncentracijų, kurias reikia naudoti pagrindiniame bandyme, intervalą.

Į bandymo schemą įtraukti du kontroliniai bandymai be bandomosios medžiagos, vienas atliekamas bandymų serijos pradžioje, o kitas – pabaigoje. Be to kiekviena aktyviojo dumblo partija turi būti patikrinta naudojant etaloninę medžiagą.

Šį metodą lengviausia taikyti medžiagoms, kurios dėl jų tirpumo vandenyje ir mažo lakumo greičiausiai lieka vandenyje.

Medžiagoms, kurių tirpumas bandomojoje terpėje yra ribotas, gali būti neįmanoma nustatyti EC_{50}.

Išvados, padarytos pagal rezultatus, kurie remiasi deguonies suvartojimu, gali būti klaidingos, kai bandomoji medžiaga turi polinkį atskirti oksidavimą ir fosforilinimą oksidacinio fosforilinimo procese.

Norint atlikti bandymą, naudinga turėti tokią informaciją:

— tirpumas vandenyje,

— garų slėgis,

— struktūrinė formulė,

— bandomosios medžiagos grynumas.

Patarimas

Aktyviajame dumble gali būti potencialiai patogeninių organizmų, todėl elgtis su juo reikia atsargiai.

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Kvėpavimo intensyvumas yra nuotekų aerobiniame dumble esančių mikroorganizmų suvartojamo deguonies kiekis, paprastai reiškiamas mg O_2 vienam mg dumblo per valandą.

▼C1

Norint skaičiuoti konkrečios koncentracijos bandomosios medžiagos inhibuojamąjį veikimą, kvėpavimo intensyvumas reiškiamas dviejų kontrolinių kvėpavimo intensyvumo verčių vidurkio procentine dalimi:

$$\left(1 - \left(\frac{(2R_s)}{(Rc_1 + Rc_2)}\right)\right) \times 100 = \text{inhibavimo procentinė vertė}$$

čia:

R_s = deguonies suvartojimo intensyvumas bandant konkrečią bandomosios medžiagos koncentraciją,

Rc_1 = deguonies suvartojimo intensyvumas 1 kontroliniame bandyme,

Rc_2 = deguonies suvartojimo intensyvumas 2 kontroliniame bandyme.

EC_{50} šiame metode yra bandomosios medžiagos koncentracija, kurią naudojant kvėpavimo intensyvumas sudaro 50 % kvėpavimo intensyvumo kontroliniame kvėpavimo bandyme šiame metode aprašytomis sąlygomis.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Rekomenduojama etalonine medžiaga naudoti 3,5-dichlorfenolį, kuris yra žinomas kvėpavimo inhibitorius, ir naudoti jį kaip priemonę patikrinti, ar dumblo jautrumas nėra nenormalus, nustatant medžiagos EC_{50} kiekvienai aktyviojo dumblo partijai.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Aktyvusis dumblas maitinamas standartiniame kiekyje mitybinės terpės, kurią sudaro sintetinės nuotekos, ir po 30 min ar 3 valandų sąlyčio, arba abiem atvejais, matuojamas dumblo kvėpavimo intensyvumas. Be to, dar matuojamas to paties aktyviojo dumblo kvėpavimo intensyvumas dedant įvairios koncentracijos bandomosios medžiagos, kai kitos sąlygos yra identiškos. Konkrečios koncentracijos bandomosios medžiagos inhibuojamasis veikimas išreiškiamas dviejuose kontroliniuose bandymuose gautų verčių vidurkio procentine dalimi. Pagal matavimus skirtingose koncentracijose apskaičiuojama EC_{50} vertė.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Bandymo rezultatai tinkami, jei:

— kvėpavimo intensyvumo vertės abiejuose kontroliniuose bandymuose skiriasi ne daugiau kaip 15 %,

— 3,5-dichlorfenolio EC_{50} (30 minučių ir (ar) trijų valandų) yra priimtiname intervale nuo 5 mg/litre iki 30 mg/litre.

1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.6.1. *Reagentai*

1.6.1.1. Bandomosios medžiagos tirpalai

Bandomosios medžiagos tirpalai ruošiami iš pradinio tirpalo prieš pat tyrimo pradžią. Jei daroma pagal toliau aprašytą rekomenduojamą metodiką, tinka 0,5 g/litre koncentracijos pradinis tirpalas.

▼C1

1.6.1.2. Kontroliniame bandyme naudojamos medžiagos tirpalas

3,5-dichlorfenolio tirpalą galima ruošti, pavyzdžiui, taip: tirpinkite 0,5 g 3,5-dichlorfenolio 10 ml 1 M NaOH, skieskite distiliuotu vandeniu maždaug iki 30 ml, pilkite maišydami 0,5 M H_2SO_4, kol pradeda kristi nuosėdos, tam maždaug reikia 8 ml 0,5 M H_2SO_4, ir galiausiai distiliuotu vandeniu skieskite mišinį iki vieno litro. pH vertė turi būti intervale nuo 7 iki 8.

1.6.1.3. Sintetinės nuotekos

Sintetinių nuotekų mitybinė terpė ruošiama tirpinant tokius šių medžiagų kiekius 1 litre vandens:

— 16 g peptono,

— 11 g mėsos ekstrakto,

— 3 g karbamido,

— 0,7 g NaCl,

— 0,4 g $CaCl_2x2H_20$,

— 0,2 g $MgS0_4x7H_20$,

— 2,8 g K_2HPO_4.

1 pastaba. Šios sintetinės nuotekos yra koncentratas, kurio koncentracija 100 kartų didesnė nei nuotekų, aprašytų OECD techninėje ataskaitoje „Proposed metod for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents“ (Siūlomas paviršinio aktyvumo medžiagų, naudojamų sintetiniuose plovikliuose, biologinio skaidumo nustatymo metodas) (1976 m. birželio 11 d.), į kurį pridėta dikalio hidrofosfato.

2 pastaba. Jei paruošta terpė naudojama ne iš karto, ji turi būti laikoma tamsoje nuo 0 iki 4 °C ir ne ilgiau, kaip vieną savaitę sąlygomis, kurios nekeistų nuotekų sudėties. Prieš dedant saugoti, terpę galima sterilizuoti, arba peptonas ir mėsos ekstraktas dedami prieš pat bandymo pradžią. Prieš naudojant, terpė turi būti gerai sumaišoma ir nustatoma jos pH vertė.

1.6.2. *Aparatūra*

Matavimo aparatas, kurio tiksli konstrukcija nėra svarbi. Tačiau kolboje turi likti neužimtos erdvės, o zondas turi sandariai uždaryti matavimo kolbą.

Be įprastos laboratorijos įrangos dar reikalinga tokia speciali įranga:

— matavimo aparatas,

— aeravimo įtaisas,

— pH-elektrodas ir pH matavimo įranga,

— O_2 elektrodas.

1.6.3. *Sėjimo kultūros ruošimas*

Bandymuose mikrobine sėjimo kultūra naudojamas aktyvusis dumblas iš valymo įrenginio, valančio daugiausia buitines nuotekas.

Jei būtina, grįžus į laboratoriją stambias daleles galima pašalinti, paliekant dumblą trumpą laiką, pvz., 15 minučių, nusistovėti, ir viršutinį smulkesnių dalelių sluoksnį dekantuoti ir toliau naudoti. Kitu būdu dumblą galima sumaišyti, kelioms sekundėms įjungus maišytuvą.

▼C1

Be to, jei manoma, kad gali būti inhibuojančių medžiagų, dumblas turi būti išplautas vandentiekio vandeniu ar izotoniniu tirpalu. Po centrifugavimo skystis nuo nuosėdų dekantuojamas (plaunama tris kartus).

Nedidelis dumblo kiekis sveriamas ir džiovinamas. Remiantis šiuo rezultatu galima apskaičiuoti, kiek šlapio dumblo reikia suspenduoti vandenyje, kad gautame aktyviojo dumblo ir vandens mišinyje suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija būtų nuo 2 g/litre iki 4 g/litre. Toks kiekis atitinka koncentraciją bandomojoje terpėje nuo 0,8 iki 1,6 g/litre, jei būtų taikoma toliau rekomenduota metodika.

Jei nėra galimybės dumblą panaudoti rinkimo dieną, vienam litrui aktyviojo dumblo, paruošto, kaip aprašyta aukščiau, įpilama 50 ml sintetinių nuotekų mitybinės terpės; ir mišinys per naktį aeruojamas 20 ± 2 °C temperatūroje. Dieną jis ir toliau aeruojamas, kol bus panaudotas. Prieš naudojant dumblą, tikrinama pH vertė ir prireikus nustatoma intervale nuo 6 iki 8. Suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija aktyviojo dumblo ir nuotekų mišinio bandinyje turi būti nustatyta, kaip tai aprašyta ankstesnėje pastraipoje.

Jei ta pati dumblo partija turi būti naudojama kitomis dienomis (ne ilgiau kaip keturios paros), kiekvienos darbo dienos pabaigoje vienam litrui dumblo įpilama dar 50 ml sintetinių nuotekų mitybinės terpės.

1.6.4. *Bandymo procedūra*

Trukmė/sąlyčio trukmė:	30 minučių ir (arba) trys valandos aeravimo sąlygomis
Vanduo	Geriamasis vanduo (prireikus dechloruotas)
Oro tiekimas	Švarus, be alyvos oras. Oro srautas nuo 0,5 iki 1 l/min.
Matavimo aparatūra	Plokščiadugnė kolba, pvz., BOD kolba
Deguonies matuoklis	Tinkamas deguonies elektrodas ir registravimo įrenginys
Mitybinis tirpalas	Sintetinės nuotekos (žr. aukščiau)
Bandomoji medžiaga	Bandomosios medžiagos tirpalas ruošiamas iš naujo bandymo pradžioje
Etaloninė medžiaga	pvz., 3,5-dichlorfenolis (bent trijų koncentracijų)
Kontroliniai bandymai	Sėjimo kultūros bandinys be bandomosios medžiagos
Temperatūra	20 ± 2 °C.

Toliau pateikiama siūloma eksperimento metodika, kurią galima taikyti ir bandomajai, ir etaloninei medžiagai trijų valandų sąlyčio trukmės atveju:

Naudojami keli indai (pvz., vieno–trijų litrų talpos laboratorinės stiklinės).

Turi būti naudojamos bent penkios koncentracijos, besiskiriančios pastoviu santykiu, geriausiai ne didesniu kaip 3,2.

Laiku „0“ 16 ml sintetinių nuotekų mitybinės terpės vandeniu skiedžiama iki 300 ml. Įpilama 200 ml mikrobinės sėjimo kultūros ir visas mišinys (500 ml) supilamas į pirmąjį indą (pirmasis kontrolinis bandinys C_1).

▼C1

Bandymo indai turi būti visą laiką aeruojami tiek, kad ištirpusio O_2 kiekis būtų ne mažesnis kaip 2,5 mg/litre ir kad prieš pat kvėpavimo intensyvumo matavimą O_2 koncentracija būtų apie 6,5 mg/litre.

Laiku „15 minučių“ (15 minučių trukmė yra laisvai pasirenkama, tačiau tai patogus laiko tarpas) kartojama, kas padaryta anksčiau, tik prieš tai, skiedžiant vandeniu iki 300 ml ir pilant mikrobinės sėjimo kultūros iki 500 ml, į 16 ml sintetinių nuotekų įpilama 100 ml pradinio bandomosios medžiagos tirpalo. Šis mišinys supilamas į antrą indą ir aeruojamas, kaip nurodyta aukščiau. Kas 15 minučių veiksmų seka kartojama imant skirtingus bandomosios medžiagos pradinio tirpalo tūrius, kad būtų gauta eilė indų su skirtingomis bandomosios medžiagos koncentracijomis. Galiausiai ruošiamas antrasis kontrolinis bandinys (C_2).

Po trijų valandų fiksuojama pH vertė, ir gerai sumaišytas pirmojo indo turinio bandinys supilamas į matavimo aparatą, kuriuo ne ilgiau kaip 10 minučių matuojamas kvėpavimo intensyvumas.

Šis nustatymas kas 15 minučių kartojamas su kiekvieno indo turiniu tokiu būdu, kad sąlyčio trukmė visuose induose būtų trys valandos.

Tokiu pat būdu su kiekviena mikrobinės sėjimo terpės partija bandoma etaloninė medžiaga.

Jei reikia matuoti po 30 minučių sąlyčio, būtina taikyti kitokį matavimo režimą (pvz., turėti daugiau nei vieną deguonies matuoklį).

Jei reikia nustatyti cheminį deguonies suvartojimą, ruošiami papildomi indai su bandomąja medžiaga, sintetinių nuotekų mitybine terpe ir vandeniu, bet be aktyviojo dumblo. Deguonies suvartojimas matuojamas ir užrašomas po 30 minučių ir (ar) trijų valandų aeravimo (sąlyčio trukmė).

2. **DUOMENYS IR VERTINIMAS**

Kvėpavimo intensyvumas skaičiuojamas pagal savirašio užrašą apytikriai tarp 6,5 mg/litre O_2 ir 2,5 mg/litre O_2, ar 10 minučių tuo laikotarpiu, kai kvėpavimo intensyvumas yra mažas. Kvėpavimo kreivės dalis, kurioje matuojamas kvėpavimo intensyvumas, turi būti tiesiška.

Jei kvėpavimo intensyvumas dvejuose kontroliniuose bandiniuose vienas nuo kito skiriasi daugiau kaip 15 %, ar etaloninės medžiagos EC_{50} (30 minučių ir (ar) trijų valandų) nėra priimtiname intervale (nuo 5 iki 30 mg/litre 3,5-dichlorfenoliui), bandymas yra netinkamas ir turi būti pakartotas.

Inhibavimo procentinė vertė skaičiuojama kiekvienai bandomajai koncentracijai (žr. 1.2). Procentinės inhibavimo vertės priklausomybė nuo koncentracijos brėžiama logaritminiame-normaliame (ar logaritminiame-tikimybiniame) popieriuje, ir gaunama EC_{50} vertė.

95 % pasikliovimo ribos EC_{50} vertėms gali būti nustatyti, taikant standartines metodikas.

▼C1

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje pateikiama, jei įmanoma, tokia informacija:

— bandomoji medžiaga: cheminio identifikavimo duomenys,

— bandymo sistema: aktyviojo dumblo šaltinis, koncentracija ir bet koks pradinis kondicionavimas,

— bandymo sąlygos:

  — reakcijos mišinio pH vertė prieš kvėpavimo intensyvumo matavimą,

  — bandymo temperatūra,

  — bandymo trukmė,

  — etaloninė medžiaga ir jos išmatuota EC_{50} vertė,

  — abiotinis deguonies suvartojimas (jei tai vyko).

— rezultatai:

  — visi matavimuose gauti duomenys,

  — inhibavimo kreivė ir metodas EC_{50} skaičiuoti,

  — EC_{50} ir, jei įmanoma, 95 % pasikliovimo ribos, EC_{20} ir EC_{80},

  — visi pastebėjimai ir bet kokie nukrypimai nuo šio bandymo metodo, kurie galėtų turėti įtakos rezultatui.

3.2. DUOMENŲ AIŠKINIMAS

Į EC_{50} vertę turi būti žiūrima tiktai kaip į orientacinį bandomosios medžiagos toksiškumą nuotekų valymo aktyviuoju dumblu procesui ar nuotekų mikroorganizmams, kadangi aplinkos sudėtingų sąveikų laboratoriniame bandyme negalima tiksliai modeliuoti. Be to, bandomosios medžiagos, kurios gali inhibuoti amoniako oksidavimą, taip pat gali duoti netipiškas inhibavimo kreives. Taigi šios kreivės turi būti aiškinamos atsargiai.

4. **NUORODOS**

1) International Standard ISO 8192–1986.

2) Broecker, B., Zahn, R., Water Research 11, 1977, p. 165.

3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., Chemosphere 10, 1981, p. 245.

4) ETAD (Ecological and Tox.icological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), Recommended Method No 103, also described by:

5) Robra, B., Wasserl Abwasser 117, 1976, p. 80.

6) Schefer, W., Textilveredlung 6, 1977, p. 247.

7) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 209, Decision of the Council C(84) 30 final.

▼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

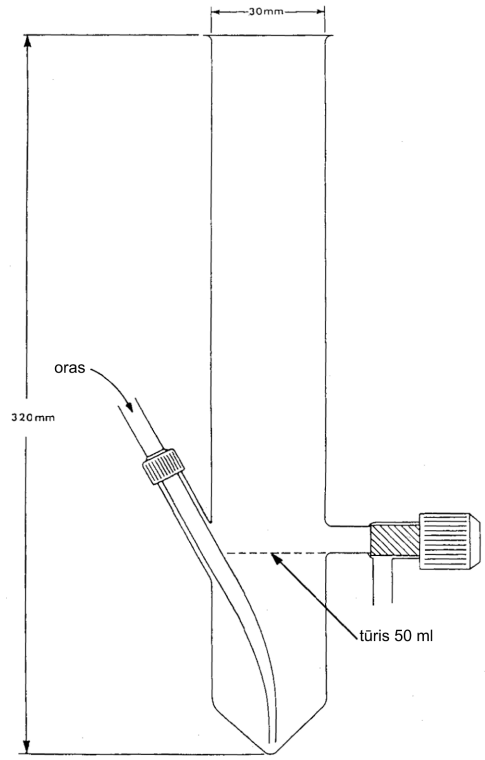
SCAS bandymas. Rezultatų pavyzdys

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



▼C1

C.13. **BIOLOGINIS KONCENTRAVIMAS. DINAMINIS BANDYMAS SU ŽUVIMIS**

1. **METODAS**

Šis biologinio koncentravimo metodas yra OECD TG 305 (1996) kopija.

1.1. ĮVADAS

Šis metodas aprašo pratekėjimo sąlygomis vykstančio medžiagų biologinio kaupimosi žuvyse gebos apibūdinimo metodiką. Nors kur kas geriau taikyti dinaminį bandymo metodą, leidžiama naudoti pusiau stacionarius režimus, jei jie atitinka tinkamumo kriterijus.

Metode pateikiamas pakankamas kiekis bandymui atlikti reikalingų detalių, tačiau paliekama atitinkama laisvė eksperimento schemai pritaikyti konkrečių laboratorijų sąlygoms ir keisti bandomųjų medžiagų charakteristikas. Jis labiausiai tinka patvarioms organinėms medžiagoms, kurių log P_{ow} vertės yra nuo 1,5 iki 6,0 (1), tačiau gali būti taikomas ir ypatingai lipofilinėms medžiagoms (kurių log P_{ow} > 6,0). Tokių ypatingai lipofilinių medžiagų biologinio koncentravimo faktoriaus (BKF), kartais žymimo K_B, išankstinis įvertis greičiausiai būtų didesnis, nei pastoviosios būsenos biologinio koncentravimo faktoriaus (BKF_{NB}) vertė, kurios reikėtų laukti laboratoriniuose bandymuose. Medžiagų, kurių log P_{ow} vertės yra iki 9,0, išankstiniai biologinio koncentravimo faktoriaus įverčiai gali būti gauti naudojant Bintein *et al*. lygtį (2). Parametrams, kurie apibūdina biologinio koncentravimo gebą, priklauso sugerties greičio konstanta (k_1), apsivalymo greičio konstanta (k_2) ir BKF_{NB}.

Žymėtuosius atomus turinčios bandomosios medžiagos gali palengvinti vandens ir žuvų bandinių analizę ir gali būti naudojamos norint nustatyti, ar reikia atlikti irimo produktų identifikavimą ir kiekybinį nustatymą. Jei matuojamas bendras radioaktyviųjų likučių kiekis (pvz., deginant arba tirpinant audinius), BKF remiasi pradinio junginio, visų sulaikytų metabolitų, o taip pat įsisavintos anglies kiekiu. Taigi, BKF vertės, besiremiančios bendruoju radioaktyviųjų likučių kiekiu, negali būti tiesiogiai lyginamos su BKF vertėmis, gautomis atliekant tik pradinio junginio specifinę cheminę analizę.

Norint nustatyti BKF, kuris remiasi tik pradinio junginio kiekiu, tyrimuose su žymėtaisiais atomais gali būti naudojamos gryninimo metodikos, o pagrindiniai metabolitai gali būti apibūdinti, jei manoma, kad tai yra būtina. Analizuojant ir identifikuojant likučius audiniuose, galima sujungti medžiagų apykaitos žuvyse tyrimus su biologinio koncentravimo tyrimais.

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Biologinis koncentravimas/biologinis kaupimas yra bandomosios medžiagos koncentracijos didėjimas organizme (nustatytuose jo audiniuose) arba organizmo paviršiuje lyginant su bandomosios medžiagos koncentracija aplinkinėje terpėje.

Biologinio koncentravimo faktorius (BKF arba K_B) bet kuriuo šio koncentravimo bandymo sugerties tarpsnio metu yra bandomosios medžiagos koncentracijos žuvies viduje (paviršiuje) arba nustatytuose jos audiniuose (C_f, µg/g (ppm)) ir cheminės medžiagos koncentracijos aplinkinėje terpėje (C_w kaip µg/ml (ppm)) santykis.

▼C1

Pastoviosios būsenos biologinio koncentravimo faktorius (BKF_{NB} arba K_B) žymiai nekinta ilgesnį laiko tarpą, bandomosios medžiagos koncentracijai aplinkinėje terpėje šį laiko tarpą esant pastoviai.

Horizontalioji dalis arba pastovioji būsena pasiekiama tuomet, kai bandomosios medžiagos koncentracijos žuvyje (C_f) priklausomybės nuo laiko kreivė tampa lygiagreti laiko ašiai, o trys C_f vertės, gautos paeiliui analizuojant bent kas dvi paras paimtus bandinius, viena nuo kitos nesiskiria daugiau kaip ± 20 %, ir nėra žymių skirtumų tarp trijų bandinių ėmimo periodų. Kai analizuojami sujungti bandiniai, reikia ne mažiau kaip keturių paeiliui padarytų analizių. Lėtai sugeriamoms bandomosioms medžiagoms labiau tiktų septynių parų tarpai.

Biologinio koncentravimo faktorius, apskaičiuotas tiesiog iš kinetinių greičio konstantų (k_1/k_2), yra vadinamas kinetiniu koncentravimo faktoriumi, BKF_K.

Pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolis/vanduo) (P_{ow}) yra cheminės medžiagos pusiausvyrojo tirpumo n–oktanolyje ir vandenyje santykis (A.8 metodas), taip pat išreiškiamas K_{ow}. P_{ow} logaritmas naudojamas kaip cheminės medžiagos biologinio koncentravimo vandens organizmuose gebos rodiklis.

Veikimo arba sugerties tarpsnis yra laikas, kurį žuvis yra veikiama bandomąja medžiaga.

Sugerties greičio konstanta (k_1) yra skaitinė vertė, apibūdinanti bandomosios medžiagos koncentracijos žuvyje arba jos paviršiuje (arba nustatytuose jos audiniuose) didėjimo greitį, kai žuvis veikiama chemine medžiaga (k_1 išreiškiama $para^{-1}$).

Tarpsnis po veikimo arba apsivalymo (netekimo) tarpsnis yra laikas po to, kai bandomoji žuvis buvo pernešta iš terpės su bandomąja medžiaga į terpę, kurioje šios medžiagos nėra, per kurį tiriamas apsivalymas (arba bendras mažėjimas) nuo šios medžiagos žuvyje (arba nustatytuose jos audiniuose).

Apsivalymo (netekimo) greičio konstanta (k_2) yra skaitinė vertė, apibūdinanti bandomosios medžiagos koncentracijos žuvyje arba jos paviršiuje (arba nustatytuose jos audiniuose) mažėjimo greitį po to, kai bandomoji žuvis buvo pernešta iš terpės su bandomąja medžiaga į terpę, kurioje šios medžiagos nėra (k_2 išreiškiama $para^{-1}$).

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandymas susideda iš dviejų tarpsnių: veikimo (sugerties) ir tarpsnio po veikimo (apsivalymo). Sugerties tarpsnio metu atskiros vienos rūšies žuvų grupės veikiamos bent dviejų koncentracijų bandomąja medžiaga. Vėliau apsivalymo tarpsniui jos pernešamos į terpę be bandomosios medžiagos. Apsivalymo tarpsnis būtinas visuomet, išskyrus atvejus, kai medžiagos sugertis sugerties tarpsnio metu buvo nežymi (pvz., BKF yra mažesnis kaip 10). Bandomosios medžiagos koncentracija žuvyje (jos paviršiuje) (arba nustatytuose jos audiniuose) matuojama abiejuose bandymo tarpsniuose. Be dviejų bandomųjų koncentracijų, kontrolinė žuvų grupė laikoma tokiomis pačiomis sąlygomis, bet be bandomosios medžiagos, norint biologinio koncentravimo bandyme pastebėtą galimą neigiamą poveikį palyginti su palyginamąja kontroline grupe ir gauti bandomosios medžiagos fono koncentracijas.

▼C1

Sugerties tarpsnis vykdomas 28 paras, jei neįrodoma, kad pusiausvyra yra pasiekta anksčiau. Sugerties tarpsnio trukmės ir pastoviosios būsenos laiko prognozė gali būti padaryta pagal 3 papildymo lygtį. Pernešus žuvis į kitą švarų indą su ta pačia terpe, bet be bandomosios medžiagos, pradedamas apsivalymo periodas. Pageidautina, jei įmanoma, biologinio koncentravimo faktorių apskaičiuoti ir kaip santykį koncentracijos žuvyje (C_f) su koncentracija vandenyje (C_w) tariamosios pastoviosios būsenos sąlygomis (BKF_{NB}) ir kaip kinetinį biologinio koncentravimo faktorių (BKF_K), išreiškiamą sugerties (k_1) ir apsivalymo (k_2) greičio konstantų santykiu, darant prielaidą apie pirmojo laipsnio kinetiką. Jei pirmojo laipsnio kinetikos akivaizdžiai nepaisoma, turi būti naudojami sudėtingesni modeliai (5 priedėlis).

Jei pastovioji būsena per 28 paras nepasiekiama, sugerties tarpsnis turi būti pratęstas, kol ji bus pasiekta, bet ne ilgiau kaip iki 60 parų; tuomet pradedamas apsivalymo tarpsnis.

Sugerties greičio konstanta, apsivalymo (netekimo) greičio konstanta (ar konstantos, jei naudojami sudėtingesni modeliai), biologinio koncentravimo faktorius ir, jei įmanoma, kiekvieno šių parametrų pasikliovimo ribos apskaičiuojami pagal modelį, kuris geriausiai aprašo žuvyse ir vandenyje išmatuotas bandomosios medžiagos koncentracijas.

BKF yra išreiškiamas kaip žuvies bendrosios šlapios masės funkcija. Tačiau specialiems tikslams, jei žuvis yra pakankamai didelė, gali būti naudojami nustatyti audiniai arba organai (pvz., raumuo, kepenys) arba žuvis gali būti padalinta į valgomąją (filė) ir nevalgomą (viduriai) dalis. Kadangi daugelio organinių medžiagų biologinio koncentravimo geba aiškiai priklauso nuo lipofiliškumo, taip pat yra atitinkama priklausomybė tarp riebalų kiekio bandomosiose žuvyse ir stebimo tokių medžiagų biologinio koncentravimo. Tokiu būdu, norint sumažinti šį bandymo rezultatų kintamumo šaltinį, lipofiliškų (t. y. kurių log P_{ow} > 3) medžiagų biologinis koncentravimas turi būti apskaičiuojamas ne tik viso kūno masei, bet ir riebalų kiekiui.

Kai tai galima įgyvendinti, riebalų kiekis turi būti nustatomas toje pačioje biologinėje medžiagoje, kurioje nustatoma bandomosios medžiagos koncentracija.

1.4. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

Prieš atliekant biologinio koncentravimo bandymą apie bandomąją medžiagą turi būti žinoma tokia informacija:

— tirpumas vandenyje,

— pasiskirstymo koeficientas (n-oktanolis/vanduo) P_{ow} (taip pat žymimas K_{ow}, nustatomas HPLC metodu pagal A. 8),

— hidrolizė,

— fotocheminis virsmas vandenyje, nustatytas apšvietimo saulės arba modeliuota saulės spinduliuote sąlygomis ir biologinio koncentravimo bandyme naudoto apšvietimo sąlygomis (3),

▼C1

— paviršiaus įtempis (t. y. medžiagoms, kurioms log P_{ow} negali būti nustatytas),

— garų slėgis,

— biologinio skaidumo lengvumas (jei reikia).

Kita reikalinga informacija yra toksiškumas bandyme naudojamoms žuvų rūšims, geriausiai asimptotiška (t. y. nuo laiko nepriklausanti) LC_{50} vertė. Reikia turėti tinkamą žinomo tikslumo, preciziškumo ir jautrumo analizinį metodą bandomajai medžiagai bandomuosiuose tirpaluose ir biologinėje medžiagoje kiekybiškai nustatyti, taip pat bandinių ruošimo ir laikymo detales. Tai pat turi būti žinoma bandomosios medžiagos analizinio nustatymo vandenyje ir žuvies audiniuose riba. Kai naudojama ^{14}C žymėta bandomoji medžiaga, turi būti žinoma radioaktyvumo dėl priemaišų buvimo procentinė dalis.

1.5. BANDYMO TINKAMUMAS

Turi būti taikomos tokios sąlygos, kad bandymas būtų tinkamas:

— temperatūros kitimas mažesnis kaip ± 2 °C;

— ištirpusio deguonies koncentracija neturi sumažėti daugiau kaip iki 60 % soties koncentracijos;

— sugerties tarpsnio metu bandomosios medžiagos koncentracija kameroje palaikoma vidutinių išmatuotų verčių ribose su ± 20 % nuokrypiu;

— bandymo pabaigoje kontrolinių ir veikiamų žuvų gaištamumas arba kiti neigiami veiksniai (liga) yra mažesnis kaip 10 %; jei bandymas vyksta kelias savaites arba mėnesius, gaištamumas arba kiti neigiami veiksniai abiejose žuvų grupėse turi būti mažesni kaip 5 % per mėnesį, o bendras gaištamumas ne didesnis kaip 30 %.

1.6. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Tikrinant eksperimento metodiką, prireikus būtų naudinga naudoti etalonines medžiagas su žinoma biologinio koncentravimo geba. Tačiau specialios medžiagos vis dar negali būti rekomenduotos.

1.7. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.7.1. *Aparatūra*

Reikia žiūrėti, kad visoms įrangos dalims gaminti būtų vengiama naudoti medžiagas, kurios gali tirpti, sugerti arba išsiplauti ir turėti neigiamą poveikį žuvims. Gali būti naudojami stačiakampio arba ritinio formos standartiniai rezervuarai, kurie būtų pagaminti iš chemiškai inertiškų medžiagų ir kurių tūris atitiktų įkrovos dydį. Minkšti plastikiniai vamzdžiai turi būti kuo mažiau naudojami. Geriausiai naudoti vamzdžius iš teflono®, nerūdijančio plieno ir (arba) stiklo. Patirtis rodo, kad medžiagoms su dideliu sugerties koeficientu, pvz., sintetiniams piretroidams, gali būti reikalingas silanizuotas stiklas. Tokiais atvejais įranga po naudojimo turėtų būti išmesta.

▼C1

1.7.2. *Vanduo*

Bandymuose dažniausiai naudojamas gamtinis vanduo, jis turi būti imamas iš neužteršto ir vienodos kokybės šaltinio. Skiedimo vandens kokybė turi būti tokia, kad pasirinktų rūšių žuvys nežūtų per aklimatizavimo ir bandymo laiką ir jų išvaizdoje arba elgesyje neatsirastų kažko neįprasto. Geriausiu atveju reikėtų pademonstruoti, kad bandomosios rūšys skiedimo vandenyje gali išlikti, augti ir daugintis (pvz., laboratorinėje kultūroje arba atliekant toksiškumo ilgaamžiškumo ciklui bandymą). Apibūdinant vandenį turi būti nurodyta bent pH vertė, kietumas, bendras kietųjų dalelių kiekis, bendroji organinė anglis, taip pat pageidautina nurodyti amonio ir nitrito jonų kiekį bei šarmingumą, ir, jūros žuvų rūšių atveju, sūrumą. Parametrai, kurie būtų svarbūs žuvų optimaliai gerovei, yra visiškai žinomi, tačiau 1 priedėlyje pateiktos rekomenduojamos bandymuose naudojamo gėlo ir jūros vandens įvairių komponentų didžiausios koncentracijos.

Vandens kokybė turi būti pastovi visą bandymo laiką. pH vertė turi būti 6,0– 8,5 intervale, tačiau konkrečiame bandyme pH reikšmė turi būti ± 0,5 pH vieneto ribose. Norint užtikrinti, kad skiedimo vanduo per daug neturėtų įtakos bandymo rezultatui (pavyzdžiui, sudarydamas kompleksus su bandomąja medžiaga) arba neigiamai veiktų žuvų būrio elgesį, bandiniai per tam tikrus laiko tarpus turi būti imami analizei. Sunkiųjų metalų jonų (pvz., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), pagrindinių anijonų ir katijonų (pvz., Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), pesticidų (pvz., bendrojo 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 įrodyta, kad vandens kokybė yra pastovi bent metus, analizė gali būti atliekama ne taip dažnai, o tarpai tarp jų padidinti (pvz., kas šešis mėnesius).

Natūralus kietųjų dalelių kiekis, o taip pat bendrosios organinės anglies (TOC) kiekis skiedimo vandenyje turi būti kuo mažesnis, kad būtų išvengta bandomosios medžiagos sugerties organine medžiaga, dėl ko gali sumažėti bandomosios medžiagos biologinis prieinamumas (4). Didžiausias kietųjų dalelių leistinas kiekis yra 5 mg/l (sausos medžiagos, sulaikomos 0,45 μm filtru), o bendrosios organinės anglies – 2 mg/l (žr. 1 priedėlį). Jei reikia, vanduo prieš naudojimą turi būti filtruojamas. Dėl bandomųjų žuvų (ekskrementų) ir maisto likučių susidaręs organinės anglies kiekis turi būti kiek įmanoma mažesnis. Organinės anglies koncentracija bandymo rezervuare visą bandymo laiką neturi viršyti bandomojoje medžiagoje ir, jei naudojama, tirpinimo medžiagoje esančios organinės anglies koncentracijos daugiau kaip 10 mg/l (± 20 %)

1.7.3. *Bandomieji tirpalai*

Ruošiamas reikiamos koncentracijos bandomosios medžiagos pradinis tirpalas. Pradinį tirpalą geriausiai būtų ruošti bandomąją medžiagą tiesiog maišant arba plakant skiedimo vandenyje. Naudoti tirpiklius arba disperguojančias medžiagas (tirpinimo medžiagas) nerekomenduojama; tačiau jų gali prireikti kai kuriais atvejais, norint pagaminti pakankamai koncentruotą pradinį tirpalą. Tirpikliai, kuriuos būtų galima naudoti, yra etanolis, metanolis, etilenglikolio monometilo eteris, etilenglikolio dimetilo eteris, dimetilformamidas ir trietilenglikolis. Disperguojančios medžiagos, kurias galima naudoti, yra Cremophor RH40, Tween 80, metilceliuliozės 0,01 % tirpalas ir HCO-40. Naudojant biologiškai lengvai skaidomas medžiagas reikia žiūrėti, kad neatsirastų problemų dėl bakterijų augimo bandymuose pratekančiame vandenyje. Bandomoji medžiaga gali turėti žymėtuosius atomus ir turi būti aukščiausio grynumo (pvz., geriausiai > 98 %).

▼C1

Bandymuose su pratekančiu vandeniu bandomajai koncentracijai bandymo kameroje užtikrinti reikalinga sistema, kuri nuolat dozuotų ir skiestų bandomosios medžiagos pradinį tirpalą (pvz., dozuojantis siurblys, proporcingas skiestuvas, saturatoriaus sistema). Geriausiai būtų daryti bent penkis vandens tūrio keitimus per dieną kiekvienoje bandymo kameroje. Geriau naudoti dinaminį režimą, tačiau kai tai neįmanoma (pvz., kai tai kenkia bandomiesiems organizmams), galima taikyti pusiau stacionariąją metodiką, jei ji atitinka tinkamumo kriterijus. Pradinio tirpalo ir skiedimo vandens srautas turi būti tikrinamas 48 valandas prieš bandymą ir vėliau bent kasdien visą bandymo laiką. Šio tikrinimo metu nustatomas srautas per kiekvieną kamerą ir užtikrinama, kad jis kameroje arba tarp kamerų nesikeistų daugiau kaip 20 %.

1.7.4. *Žuvų rūšies parinkimas*

Pasirenkant rūšis svarbu yra tai, ar jas lengva gauti, ar galima gauti tinkamų dydžių žuvis ir ar galima žuvis tinkamai prižiūrėti laboratorijoje. Kiti žuvų rūšies pasirinkimo kriterijai apima rekreacinę, komercinę, ekologinę svarbą, taip pat palyginamą jautrumą, sėkmingą naudojimą praeityje ir t. t.

Rekomenduojamos bandomosios rūšys pateiktos 2 priedėlyje. Galima naudoti kitas rūšis, tačiau tinkamoms bandymo sąlygoms užtikrinti gali tekti keisti bandymo metodiką. Šiuo atveju ataskaitoje turi būti pateikta rūšies pasirinkimo priežastis ir bandymo metodas.

1.7.5. *Žuvų laikymas*

Laikomų žuvų populiacija bent dvi savaites aklimatizuojama vandenyje bandymo temperatūroje ir pakankamai maitinama tos pačios rūšies maistu, kuris bus naudojamas bandyme.

Po 48 valandų stabilizacijos periodo, registruojamas gaištamumas ir taikomi tokie kriterijai:

— populiacijos gaištamumas per septynias paras didesnis kaip 10 %: visa partija atmetama,

— populiacijos gaištamumas per septynias paras 5–10 %: aklimatizuojama dar septynias papildomas paras,

— populiacijos gaištamumas per septynias paras mažesnis kaip 5 %: partija priimama, jei gaištamumas per kitas septynias dienas didesnis kaip 5 %, visa partija atmetama.

Reikia žiūrėti, kad bandymuose naudojamos žuvys neturėtų pastebimų ligų ir nenormalumų. Pašalinamos visos ligotos žuvys. Žuvys dvi savaites prieš pradedant bandymą arba bandymo metu neturi būti gydomos nuo ligų.

▼C1

1.8. BANDYMO ATLIKIMAS

1.8.1. *Išankstinis bandymas*

Gali būti naudinga atlikti išankstinį bandymą, norint optimizuoti galutinio bandymo sąlygas, pvz., bandomosios medžiagos koncentraciją (-as), sugerties ir apsivalymo tarpsnių trukmę.

1.8.2. *Veikimo sąlygos*

1.8.2.1. Sugerties tarpsnio trukmė

Sugerties tarpsnio trukmės prognozavimas gali būti daromas remiantis praktine patirtimi (pvz., iš ankstesnio panašios cheminės medžiagos sugerties tyrimo) arba pagal tam tikras empirines priklausomybes, naudojant tirpumo vandenyje duomenis arba bandomosios medžiagos pasiskirstymo koeficientą (n-oktanolis/vanduo) (žr. 3 priedėlį).

Sugerties tarpsnis turi trukti 28 paras, jei negalima įrodyti, kad pusiausvyra pasiekta anksčiau. Jei pastovioji būsena nepasiekiama per 28 paras, sugerties tarpsnis turi būti pratęstas, atliekant tolesnius matavimus, kol pasiekiama pastovioji būsena, bet ne ilgiau kaip iki 60 parų.

1.8.2.2. Apsivalymo tarpsnio trukmė

Pusės sugerties tarpsnio laiko paprastai pakanka, kad sugertos medžiagos kiekis sumažėtų iki atitinkamos vertės (pvz., 95 %) (žr. 3 priedėlį dėl šio įverčio aiškinimo). Jei laikas, reikalingas 95 % netekimo vertei pasiekti yra neįvykdomai ilgas, pavyzdžiui, du kartus ilgesnis nei normali sugerties tarpsnio trukmė (t. y. daugiau kaip 56 paros), galima naudoti trumpesnį periodą (pvz., kol bandomosios medžiagos koncentracija pasiekia mažiau nei 10 % pastoviosios būsenos koncentracijos). Tačiau medžiagų, kurių sugerties ir apsivalymo modelis yra sudėtingesnis nei tas, kurį vaizduoja žuvų vienoje kameroje modelis, turintis pirmojo laipsnio kinetiką, netekimo greičio konstantoms nustatyti naudojami ilgesni apsivalymo tarpsniai. Tačiau šio periodo trukmę gali apspręsti laikas, kurį bandomosios medžiagos koncentracija žuvyje yra vis dar didesnė nei analizinio aptikimo riba.

1.8.2.3. Bandomųjų žuvų skaičius

Bandomajai koncentracijai parenkamas toks žuvų skaičius, kad kiekvieną bandinio ėmimą bandiniui tektų ne mažiau kaip keturios žuvys. Jei reikia didesnio statistinio reikšmingumo, vienam bandiniui žuvų reikės daugiau.

Jei naudojamos suaugusios žuvys, nurodykite, kokios – vienos lyties žuvys ar abiejų lyčių žuvys – buvo naudojamos bandyme. Jei naudojamos abiejų lyčių žuvys, prieš veikimo pradžią turi būti dokumentuota, kad riebalų kiekio skirtumas tarp lyčių yra nereikšmingas; gali būti būtina sujungti visas vyriškos ir moteriškos lyties žuvis į vieną grupę.

▼C1

Kiekvienam atskiram bandymui parenkamos panašios masės žuvys, kad mažiausių žuvų masė nebūtų mažesnė kaip du trečdaliai didžiausios žuvies masės. Visos žuvys turi būti tų pačių metų ir iš to paties šaltinio. Kadangi kartais paaiškėja, kad žuvų masė ir amžius turi didelę įtaką BKF vertėms (1), šios detalės turi būti tiksliai registruojamos. Norint įvertinti vidutinę masę, rekomenduojama prieš bandymą pasverti atskirą bandinį, paimtą iš turimų žuvų atsargų.

1.8.2.4. Įkrova

Norint mažinti C_w sumažėjimą dėl žuvų pridėjimo bandymo pradžioje ir išvengti ištirpusio deguonies koncentracijos mažėjimo, naudojami dideli vandens ir žuvų kiekio santykiai. Svarbu, kad įkrovos dydis atitiktų naudojamą bandomąją rūšį. Bet kuriuo atveju paprastai rekomenduojamas įkrovos dydis yra 0,1–1,0 g žuvies (šlapios masės) litrui vandens parai. Dideles įkrovas galima taikyti, jei įrodoma, kad reikiamą bandomosios medžiagos koncentraciją įmanoma palaikyti ± 20 % ribose ir kad ištirpusio deguonies koncentracija netampa mažesnė už 60 % soties koncentracijos.

Pasirenkant tinkamus įkrovos režimus, atsižvelgiama į žuvų rūšies įprastosios gyvenimo aplinkos sąlygas. Pavyzdžiui, dugne gyvenančioms žuvims tam pačiam vandens tūriui gali būti reikalingas didesnis akvariumo dugno plotas nei jūros žuvų rūšims.

1.8.2.5. Maitinimas

Aklimatizavimo ir bandymo laikotarpiu žuvys maitinamos tinkamu maistu, kurio žinomas riebalų ir bendrasis baltymų kiekis ir kurio pakanka, kad žuvys būtų sveikos ir būtų palaikoma jų kūno masė. Žuvys aklimatizavimo ir bandymo laikotarpiu maitinamos kasdien, pašaro kiekis sudaro maždaug 1–2 % kūno masės per parą; taip bandymo metu riebalų koncentracija daugumoje žuvų rūšių palaikoma santykinai pastovi. Norint išlaikyti kūno masės ir riebalų kiekio atitikimą, maisto kiekis turi būti perskaičiuotas, pvz., kartą per savaitę. Šiam apskaičiavimui atlikti žuvų masė kiekvienoje kameroje gali būti įvertinta pagal neseniai iš šios kameros bandiniui paimtų žuvų masę. Nesverkite žuvų, kurios lieka kameroje.

Nesuvalgytas maistas ir išmatos kasdien iš kameros išsiurbiami netrukus po maitinimo (nuo 30 minučių iki vienos valandos). Kameros visą bandymo laiką turi būti kuo švaresnės, kad būtų palaikoma kiek įmanoma mažesnė organinių medžiagų koncentracija, nes organinės anglies buvimas gali riboti bandomosios medžiagos biologinį prieinamumą (1).

Kadangi daugelis pašarų gaminama iš žuvies miltų, pašaras turi būti analizuojamas, ieškant bandomosios medžiagos. Taip pat pageidautina analizuoti pašarą pesticidams ir sunkiesiems metalams nustatyti.

▼C1

1.8.2.6. Šviesa ir temperatūra

Apšvietimo periodo trukmė paprastai lygi 12–16 valandų, o temperatūra (± 2 °C) turi būti tinkama žuvų rūšims (žr. 2 priedėlį). Turi būti žinomas apšvietimo tipas ir jo charakteristikos. Reikia atkreipti dėmesį į galimą bandomosios medžiagos fotocheminį virsmą tyrimo metu naudoto apšvietimo sąlygomis. Turi būti naudojamas tinkamas apšvietimas, vengiant žuvis veikti gamtoje nesančiais fotocheminio irimo produktais. Kai kuriais atvejais gali būti reikalingas filtras, kuris nepraleistų trumpesnio nei 290 nm bangos ilgio UV spinduliuotės.

1.8.2.7. Bandomoji koncentracija

Žuvys pratekėjimo sąlygomis veikiamos vandenyje bent dvejų koncentracijų bandomąja medžiaga. Paprastai didesnė (arba didžiausia) bandomosios medžiagos koncentracija parenkama taip, kad ji būtų lygi maždaug 1 % jos ūmios asimptotinės LC_{50} ir būtų bent dešimt kartų didesnė nei jos aptikimo riba vandenyje taikomu analizės metodu.

Didžiausią bandomosios medžiagos koncentraciją taip pat galima nustatyti padalinant ūmios 96 h LC_{50} vertę iš atitinkamo ūmios ir lėtinės koncentracijų santykio (kai kurių cheminių medžiagų atitinkamas santykis gali keistis maždaug nuo 3 iki 100). Jei galima, pasirinkite kitokią koncentraciją (-as), kuri būtų didesnė už nurodytąją 10 kartų. Jei tai neįmanoma dėl 1 % LC_{50} sąlygos ir analizinio nustatymo ribos, galima taikyti mažesnį nei 10 daugiklį arba turi būti atsižvelgta į galimybę naudoti ^{14}C žymėtą bandomąją medžiagą. Neturi būti naudojama koncentracija, kuri būtų didesnė nei bandomosios medžiagos tirpumas.

Jei naudojama tirpinimo medžiaga, jos koncentracija turi būti ne didesnė kaip 0,1 ml/l ir ji turi būti vienoda visuose bandymo induose. Turi būti žinoma, kokią bendrosios organinės anglies kiekio bandymo vandenyje dalį kartu sudaro ši medžiaga ir bandomoji medžiaga. Tačiau reikia dėti visas pastangas, kad tokių medžiagų naudoti nereikėtų.

1.8.2.8. Kontroliniai bandymai

Papildomai bandymo bandinių serijai turi būti atliekamas skiedimo vandens tikrinimas arba, jei tinka, vandens su tirpinimo medžiaga tikrinimas, jei buvo nustatyta, kad tirpinimo medžiaga neveikia žuvų. Jei taip nėra, turi būti atliekami abu kontroliniai bandymai.

1.8.3. *Vandens kokybės matavimų dažnis*

Bandymo metu visuose induose būtina matuoti ištirpusį deguonį, TOC, pH ir temperatūrą. Bendrasis kietumas ir sūrumas, jei tinka, turi būti nustatyti kontroliniuose bandiniuose ir viename inde su didesne (arba didžiausia) koncentracija. Turi būti nustatomas bent jau ištirpęs deguonis ir sūrumas, jei tinka, ir tai daroma tris kartus – sugerties tarpsnio pradžioje, maždaug per vidurį ir pabaigoje, o apsivalymo laikotarpiu – kartą per savaitę. TOC turi būti nustatyta bandymo pradžioje (24 valandos ir 48 valandos prieš pradedant sugerties tarpsnį) prieš žuvų pridėjimą ir bent kartą per savaitę sugerties iš apsivalymo tarpsnių metu. Temperatūra turi būti matuojama kasdien, pH kiekvieno laikotarpio pradžioje ir pabaigoje, o kietumas kartą kiekviename bandyme. Temperatūrą bent viename inde būtų geriausiai kontroliuoti nuolat.

▼C1

1.8.4. *Bandinių ėmimas ir žuvų bei vandens analizė*

1.8.4.1. Žuvies ir vandens bandinio ėmimo grafikas

Vanduo iš bandymo kamerų bandomosios medžiagos koncentracijai nustatyti imamas prieš žuvų pridėjimą ir sugerties bei apsivalymo tarpsnių metu. Mažiausiai vandens bandinys imamas tuo pačiu metu kaip ir žuvies bandinys ir dar prieš maitinimą. Sugerties tarpsnio metu bandomosios medžiagos koncentracija nustatoma tikrinant atitiktį patikimumo kriterijams.

Žuvų bandinys imamas bent penkis kartus sugerties tarpsnio metu ir bent keturis kartus apsivalymo tarpsnio metu. Kadangi, remiantis tokiu bandinių skaičiumi, kai kuriais atvejais bus sunku gauti pakankamai tikslų BKF vertės įvertį, ypač kai pasirodo, kad apsivalymo kinetika nėra pirmojo laipsnio, galima būtų patarti abiem tarpsniais bandinius imti dažniau (žr. 4 priedėlį). Papildomi bandiniai dedami saugoti ir analizuojami tik tuo atveju, jei pasirodo, kad pirmosios eilės analizės duomenų nepakanka BKF apskaičiuoti norimu tikslumu.

Tinkamo bandinių ėmimo grafiko pavyzdys pateiktas 4 priedėlyje. Naudojant kitas P_{ow} numanomas vertes veikimo laikui, per kurį būtų pasiekta 95 % sugerties, apskaičiuoti, gali būti lengvai sudaryti kiti grafikai.

Bandinių ėmimas sugerties tarpsnio metu tęsiamas tol, kol pasiekiama pastovioji būsena, bet ne ilgiau kaip 28 paras. Jei pastovioji būsena nebuvo pasiekta per 28 paras, bandinių ėmimas tęsiamas toliau, kol pasiekiama pastovioji būsena, bet ne ilgiau kaip iki 60 parų. Prieš pradedant apsivalymo tarpsnį, žuvys pernešamos į švarius rezervuarus.

1.8.4.2. Bandinių ėmimas ir bandinio ruošimas

Vandens bandiniai analizei gaunami, pvz., siurbiant juos vamzdžiais iš inertiškos medžiagos, įstatytais į bandymo kameros vidurį. Kadangi įrodyta, kad filtravimas ir centrifugavimas ne visuomet leidžia atskirti bandomosios medžiagos biologiškai neįsisavinamą dalį nuo tos dalies, kuri yra biologiškai prieinama (ypač labai lipofilinių cheminių medžiagų, t. y. tokių medžiagų, kurių log $P_{ow} > 5$) (1) (5), bandinių tokiais būdais negalima apdoroti.

Vietoj to reikia imtis priemonių, kad rezervuarai būtų kiek įmanoma švaresni, o bendrosios organinės anglies kiekis sugerties ir apsivalymo tarpsnių metu turi būti nuolat kontroliuojamas.

Per kiekvieną bandinio ėmimą iš bandymo kameros paimamas atitinkamas žuvų skaičius (paprastai ne mažiau kaip keturios žuvys). Bandinio žuvys iš karto nuplaunamos vandeniu, „sausinamos“ filtravimo popieriumi, tuojau pat numarinamos pačiu tinkamiausiu ir humaniškiausiu būdu ir sveriamos.

Vandenį ir žuvis geriausiai analizuoti iš karto po bandinio ėmimo, kad būtų išvengta irimo arba kitų nuostolių, ir apskaičiuoti apytikrius sugerties bei apsivalymo greičius bandymo eigoje. Iš karto atlikta analizė taip pat leidžia nevėluojant nustatyti, kada pasiekiama horizontalioji sugerties kreivės dalis.

▼C1

Jei iš karto analizė neatliekama, bandiniai laikomi tinkamu būdu. Prieš pradedant tyrimą gaunama informacija apie tinkamą konkrečios bandomosios medžiagos laikymo metodą, pvz., užšaldymą, laikymą 4 °C temperatūroje, laikymo trukmę, ekstrahavimą ir t. t.

1.8.4.3. Analizės metodo kokybė

Kadangi visa bandymo procedūra iš esmės priklauso nuo bandomajai medžiagai nustatyti taikomo analizės metodo tikslumo, preciziškumo ir jautrumo, eksperimentiškai patikrinkite, ar konkretaus metodo cheminės analizės preciziškumas ir atkuriamumas, taip pat bandomosios medžiagos regeneravimas iš vandens ir žuvies yra pakankami. Taip pat patikrinkite, kad bandomoji medžiaga nebūtų aptinkama naudojamame skiedimo vandenyje.

Jei būtina, bandyme gautoms C_w ir C_f vertės koreguojamos atsižvelgiant į regeneravimo ir fono kontroliniuose bandiniuose gautas vertes. Su žuvies ir vandens bandiniais visą laiką elgiamasi taip, kad užteršimas ir nuostoliai (pvz., dėl bandinio ėmimo įtaiso adsorbcijos) butų kuo mažesni.

1.8.4.4. Žuvies bandinio analizė

Jei bandyme naudojamos žymėtuosius atomus turinčios medžiagos, galima nustatyti bendrą jų kiekį (t. y. pradinę medžiagą ir metabolitus) arba bandiniai gali būti gryninami, kad pradinę medžiagą galima būtų analizuoti atskirai. Taip pat pasiekus pastoviąją būseną arba sugerties tarpsnio pabaigą (kas anksčiau) galima apibūdinti pagrindinius metabolitus. Jei BKF, apskaičiuotas pagal bendrąjį žymėtuosius atomus turinčių likučių kiekį, yra ≥ 1 000 %, būtų patartina, o kai kurių cheminių medžiagų kategorijų, pvz., pesticidų, atveju labai rekomenduotina, identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti irimo produktus, kurie sudaro ≥ 10 % bendrojo likučių kiekio žuvies audiniuose pastoviosios būsenos sąlygomis. Jei yra identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti irimo produktai, kurie sudaro ≥ 10 % bendrojo žymėtuosius atomus turinčių likučių kiekio žuvies audiniuose, taip pat rekomenduojama identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti irimo produktus bandymo vandenyje.

Bandomosios medžiagos koncentracija paprastai turi būti nustatoma kiekvienoje pasvertoje atskiroje žuvyje. Jei tai neįmanoma, kiekvieno bandinio ėmimo metu bandinius galima jungti, tačiau bandinių jungimas riboja statistines metodikas, kurios galėtų būti taikomos duomenims apdoroti. Jei svarbi yra specifinė statistinė metodika ir jos statistinis reikšmingumas, tuomet bandyme turi būti naudojamas pakankamas žuvų skaičius, kuris atitiktų norimą bandinių jungimo metodiką ir statistinį reikšmingumą (6) (7).

BKF turi būti išreikštas kaip visos šlapios masės funkcija, o labai lipofiliškoms medžiagoms – kaip riebalų kiekio funkcija. Riebalų kiekis žuvyje nustatomas kiekvieno bandinio ėmimo metu, jei tai įmanoma. Riebalų kiekiui nustatyti turi būti taikomi tinkami metodai (3 priedėlio 8 ir 2 nuorodos). Etaloniniu metodu gali būti rekomenduota ekstrahavimo chloroformo ir metanolio mišiniu metodika (9). Įvairiais metodais gaunamos nevienodos vertės (10), todėl svarbu pateikti taikyto metodo detales. Kai tai įmanoma, turi būti atliekama to paties ekstrakto, kuris buvo gautas bandomajai medžiagai analizuoti, riebalų analizė, kadangi riebalus dažnai reikia pašalinti iš ekstrakto prieš jį analizuojant chromatografiškai. Riebalų kiekis žuvyje (mg/kg šlapios masės) bandymo pabaigoje turi nesiskirti nuo bandymo pradžioje nustatyto kiekio daugiau kaip ± 25 %. Taip pat reikia pateikti procentais apskaičiuotą sausos audinio medžiagos kiekį, kad riebalų koncentraciją būtų galima apskaičiuoti sausos medžiagos kiekiui.

▼C1

2. **DUOMENYS**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Bandomosios medžiagos sugerties kreivė gaunama aritmetinėje skalėje brėžiant sugerties tarpsnio metu gautos koncentracijos žuvyje arba jos paviršiuje (arba nustatytuose audiniuose) kitimą laike. Jei kreivė pasiekė horizontaliąją dalį, t. y. pasidaro beveik asimptotiška laiko ašiai, pastoviosios būsenos BKF_{NB} apskaičiuojamas taip:

$$\left(\frac{(C_f \text{ (pastovioji būsena) (vidutinė vertė)})}{(C_w \text{ (pastovioji būsena) (vidutinė vertė)})} \right)$$

Kai pastovioji būsena nepasiekiama, BKF_{NB} pakankamu pavojui įvertinti tikslumu gali būti įmanoma apskaičiuoti pagal 80 % ($1{,}6/k_2$) arba 95 % ($3{,}0/k_2$) „pastoviosios būsenos“ pusiausvyros.

Taip pat nustatomas koncentravimo faktorius (BKF_K), kaip dviejų pirmojo laipsnio kinetinių konstantų k_1/k_2 santykis. Apsivalymo greičio konstanta (k_2) paprastai nustatoma pagal apsivalymo kreivę (t. y. bandomosios medžiagos žuvyje koncentracijos mažėjimo laike grafiką). Tuomet, turint k_2 vertę ir Cf, kuri gaunama pagal sugerties kreivę, apskaičiuojama sugerties greičio konstanta (k_1) (taip pat žr. 5 priedėlį). Tinkamiausias metodas BKF_K ir greičio konstantoms k_1 ir k_2 apskaičiuoti yra netiesinių parametrų vertinimo metodų taikymas panaudojant kompiuterį (11). Kitaip k_1 ir k_2 apskaičiuoti gali būti naudojami grafiniai metodai. Jei apsivalymo kreivė akivaizdžiai yra ne pirmojo laipsnio, turi būti taikomi sudėtingesni modeliai (žr. 3 priedėlio nuorodas) ir prašoma biologinės statistikos specialisto patarimo.

2.3. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Rezultatai turi būti aiškinami atsargiai, jei išmatuotos bandomųjų tirpalų koncentracijos yra arti analizinio metodo aptikimo ribos.

Aiškiai apibrėžtos sugerties ir apsivalymo kreivės yra biologinio koncentravimo duomenų geros kokybės ženklas. Dviejų bandomųjų koncentracijų sugerties (apsivalymo) konstantų kitimas turi būti mažesnis kaip 20 %. Stebėti dviejų naudojamų bandomųjų koncentracijų dideli sugerties (apsivalymo) greičių skirtumai turi būti registruojami ir pateikti galimi aiškinimai. Dažniausiai gerai suplanuotuose tyrimuose BKF verčių pasikliovimo riba artėja prie ± 20 %.

3. **ATASKAITA**

Bandymo ataskaita turi apimti tokią informaciją:

3.1. BANDOMOJI MEDŽIAGA:

— fizikinė prigimtis ir, jei tinka, fizikinės ir cheminės savybės,

— cheminio identifikavimo duomenys (įskaitant organinės anglies kiekį, jei tinka),

— jei turi žymėtųjų atomų, tiksli žymėtojo (-ų) atomo (-ų) padėtis ir su priemaišomis siejamo radioaktyvumo procentinė dalis.

▼C1

3.2. BANDOMOSIOS RŪŠYS

— mokslinis pavadinimas, rūšis, šaltinis, bet koks išankstinis apdorojimas, aklimatizavimas, amžius, dydžio intervalas ir t. t.

3.3. BANDYMO SĄLYGOS:

— naudota bandymo metodika (pvz., dinaminis bandymas arba bandymas pusiau stacionariomis sąlygomis),

— naudoto apšvietimo tipas ir charakteristikos bei apšvietimo periodas (-ai),

— bandymo schema (pvz., bandymo kamerų skaičius ir dydis, vandens tūrio pasikeitimo sparta, lygiagrečių bandymų skaičius, žuvų skaičius lygiagrečiame bandyme, bandyme naudotų koncentracijų skaičius, sugerties ir apsivalymo tarpsnių trukmė, žuvų ir vandens bandinių ėmimo dažnis),

— pradinių tirpalų ruošimo metodas ir jų keitimo dažnis (jei naudojama tirpinimo medžiaga, turi būti nurodyta jos koncentracija ir dėl jos susidaręs organinės anglies kiekis bandymo vandenyje),

— vardinės bandomosios koncentracijos, bandymo rezervuaruose nustatytų koncentracijų vidutinės vertės ir jų standartiniai nuokrypiai bei metodas, kuriuo jie buvo nustatyti,

— skiedimo vandens šaltinis, bet kokio jo apdorojimo aprašymas, bandomųjų žuvų galimybių gyventi vandenyje įrodymo rezultatai ir vandens charakteristikos: pH, kietumas, temperatūra, ištirpusio deguonies koncentracija, liekamojo chloro lygiai (jei matuoti), bendroji organinė anglis, suspenduotos kietosios dalelės, bandomosios terpės sūrumas (jei tinka) ir visi kiti daryti matavimai,

— vandens kokybė bandymo rezervuaruose, pH, kietumas, TOC, temperatūra ir ištirpusio deguonies koncentracija,

— detali informacija apie maitinimą (pvz., maisto tipas, šaltinis, sudėtis (bent riebalų ir baltymų kiekis, jei įmanoma) duodamas kiekis ir maitinimo dažnis),

— informacija apie žuvų ir vandens bandinių apdorojimą, įskaitant ruošimo, laikymo, ekstrahavimo detales ir bandomosios medžiagos bei riebalų (jei nustatomi) analizės metodikas (ir preciziškumą).

3.4. REZULTATAI:

— bet kokių atliktų išankstinių tyrimų rezultatai,

— kontrolinių žuvų ir žuvų kiekvienoje veikimo kameroje gaištamumas bei bet koks jų neįprastas elgesys,

— riebalų kiekis žuvyje (jei nustatyta atliekant bandymą),

— kreivės (įskaitant visus matavimuose gautus duomenis), rodančios bandomosios medžiagos sugertį žuvimis, jų apsivalymą ir laiką iki pastoviosios būsenos,

▼C1

— Cf ir Cw (ir jų standartinis nuokrypis bei intervalas, jei tinka) visiems bandinio ėmimo atvejams (Cf išreikšta µg/g viso kūno arba tam tikrų jo audinių, pvz., riebalų, šlapios masės (ppm), o Cw – µg/ml (ppm)). Cw vertės kontrolinių bandymų serijose (taip pat turi būti nurodytas fonas),

— pastoviosios būsenos biologinio koncentravimo faktorius (BKF_{NB}) ir (arba) kinetinis koncentravimo faktorius (BKF_K) ir, jei taikytina, 95 % pasikliovimo ribos sugerties ir apsivalymo (netekimo) greičio konstantoms (viskas apskaičiuota viso gyvūno kūno ir bendro riebalų kiekio, jei nustatytas, arba tam tikrų jo audinių atžvilgiu), pasikliovimo ribos ir standartinis nuokrypis (kai yra) bei apskaičiavimo (duomenų analizės) metodai kiekvienai naudotos bandomosios medžiagos koncentracijai,

— jei naudojamos žymėtuosius atomus turinčios medžiagos ir jei to reikia, gali būti pateikti bet kokių aptiktų metabolitų kaupimosi rezultatai,

— visa, kas bandyme buvo neįprasto, bet koks nukrypimas nuo šių metodikų ir bet kuri kita susijusi informacija.

Mažinkite rezultatų, kurie būtų „nenustatyti aptikimo riboje“, kiekį, kurdami išankstinio bandymo metodus ir vykdydami bandymų planavimą, kadangi tokie rezultatai negali būti panaudoti greičio konstantoms apskaičiuoti.

4. **NUORODOS**

1) Connell D.W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, p. 117–156.

2) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR and QSAR in Environmental Research, 1, 29–390.

3) OECD, Paris (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and SAFEty Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No. 3.

4) Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

5) US EPA 822-R-94–002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Document for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.

6) US FDA, (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.

7) US EPA (1974). Section 5, A(l) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.

8) Compaan H. (1980) in „The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation“ Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, the Hague, The Netherlands.

▼C1

9) Gardner et al, (1995) Limn. & Oceanogr. 30, 1099–1105.

10) Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Envir. Toxicol. Chem. 10, pp 1431–1436.

11) CEC, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984 to 1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.

12) ASTM E-1022–84 (Reapproved 1988) Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

▼C1

1 priedėlis

Skiedimui tinkamo vandens cheminės savybės

	Medžiaga	Didžiausia koncentracija
1	Kietosios dalelės	5 mg/l
2	Bendroji organinė anglis	2 mg/l
3	Nejonizuotas amoniakas	1 µg/l
4	Liekamasis chloras	10 µg/l
5	Bendras fosforo organinių pesticidų kiekis	50 ng/l
6	Bendras chloro organinių pesticidų ir polichlorintų bifenilų kiekis	50 ng/l
7	Bendras organinis chloras	25 ng/l
8	Aliuminis	1 µg/l
9	Arsenas	1 µg/l
10	Chromas	1 µg/l
11	Kobaltas	1 µg/l
12	Varis	1 µg/l
13	Geležis	1 µg/l
14	Švinas	1 µg/l
15	Nikelis	1 µg/l
16	Cinkas	1 µg/l
17	Kadmis	100 ng/l
18	Gyvsidabris	100 ng/l
19	Sidabras	100 ng/l

▼C1

2 priedėlis

Bandymui rekomenduojamos žuvų rūšys

	Rekomenduojamos rūšys	Rekomenduojamas bandymo temperatūros intervalas (°C)	Rekomenduojamas bandomojo gyvūno bendras ilgis (cm)
1	*Danio rerio* ([1])*(Teleostei, Cyprinidae)* (Hamilton-Buchanan) Zebrinė danija	20–25	3,0 ± 0,5
2	Pimephales promelas *(Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque)* Juodoji drūtgalvė rainė	20–25	5,0 ± 2,0
3	*Cyprinus* carpio (*Teleostei, Cyprinidae*) (Linnaeus) Paprastasis karpis	20–25	5,0 ± 3,0
4	*Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae)* (Temminck ir Schlegel) Japoninė medaka	20–25	4,0 ± 1,0
5	*Poecilia* reticulata (Teleostei, *Poeciiidae*) (Peters) Paprastasis gupis	20–25	3,0 ± 1,0
6	*Lepomis macrochirus (Teleostei*, Centrarchidae*)* (Rafinesque) Melsvažiaunis saulešeris	20–25	5,0 ± 2,0
7	*Oncorhynchus mykiss (*Teleostei, *Salmonidae) (Walbaum)* Vaivorykštinis upėtakis	13–17	8,0 ± 4,0
8	Gasterosteus *aculeatus* (Teleostei, Gusterosteidoe) (Linnaeus) Trispyglė dyglė	18–20	3,0 ± 1,0

([1]) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B., VoL 252, p. 231.

Skirtingose šalyse 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	*Dicentrarchus labrax*
Paprastoji aukšlė	*Alburnus alburnus*

Rinkimas

Lentelėje nurodytas gėlųjų vandenų žuvis lengva auginti ir (arba) jų galima gauti ištisus metus, tuo tarpu galimybė gauti jūros ir upių žiočių žuvų iš dalies apsiriboja atitinkamomis šalimis. 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

Sugerties ir apsivalymo tarpsnių trukmės prognozavimas

1. **Sugerties tarpsnio trukmės prognozavimas**

Prieš atliekant bandymą, k_2 įvertis, taigi, pastoviajai būsenai pasiekti reikalingo laiko tam tikra procentinė dalis, gali būti gauta iš empirinių priklausomybių tarp k_2 ir pasiskirstymo koeficiento (n-oktanolis/vanduo) (P_{ow}) arba k_2 ir tirpumo vandenyje (s).

k_2 ($para^{-1}$) įvertis gali būti gautas, pvz., pagal tokią empirinę priklausomybę (1):

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

Kitos priklausomybės pateiktos 2 nuorodoje.

Jei pasiskirstymo koeficientas (P_{ow}) nežinomas, įvertis gali būti padarytas (3), jei žinomas medžiagos tirpumas vandenyje (s), taikant lygtį:

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

kurioje

s = tirpumas (mol/l): (n = 36).

Šios priklausomybės tinka tik toms cheminėms medžiagoms, kurių log (P_{ow}) vertės yra nuo 2 iki 6,5 (4).

Pastoviajai būsenai pasiekti reikalingo laiko tam tikra procentinė dalis, taikant k_2 įvertį, gali būti nustatyta iš bendrosios kinetinės lygties, aprašančios sugertį ir apsivalymą (pirmojo laipsnio kinetika):

$$\left(\frac{(dC_f)}{(dt)}\right) = (k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot Cf)$$

arba, jei C_w yra pastovus dydis:

$$C_f = \left(\frac{(k_1)}{(k_2)}\right) \cdot C_w(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{(3 lygtis)}$$

Artėjant prie pastoviosios būsenos ($t \rightarrow \infty$), 3 lygtis gali būti supaprastinta (5) (6) iki:

$$C_f = \left(\frac{(k_1)}{(k_2)}\right) \cdot C_w \text{ arba } C_f/C_w = k_1/k_2 = BCF$$

Tokiu atveju, $k_l/k_2 \cdot C_w$ yra arti koncentracijos žuvyje „pastoviosios būsenos“ sąlygomis ($C_{f,\ s}$).

3 lygtis gali būti pertvarkyta į

$$C_f = (C_f, s(1 - e^{-k_2 t})) \text{ arba } \left(\frac{(C_f)}{(C_{fs})}\right) = (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{(4 lygtis)}$$

Taikant 4 lygtį, galima prognozuoti laiką, reikalingą pasiekti tam tikrą pastoviosios būsenos procentinę dalį, kai pagal 1 arba 2 lygtį iš anksto yra įvertinta k_2.

▼C1

Statistiškai priimtiniems duomenims (BKF_K) gauti statistiškai optimalios sugerties tarpsnio trukmės atskaitos tašku laikomas laikas, per kurį kreivė, vaizduojanti priklausomybę tarp bandomosios medžiagos žuvyje koncentracijos logaritmo ir tiesinėje skalėje atidėto laiko, pasiektų jos vidurio tašką arba $1,6/k_2$, arba 80 % pastoviosios būsenos, tačiau ne didesnis kaip $3,0/k_2$, arba 95 % pastoviosios būsenos (7).

Laikas 80 % pastoviosios būsenos pasiekti yra lygus (4 lygtis):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \text{ arba } t_{80} = \left(\frac{(1,6)}{(k_2)}\right) \qquad \text{(5 lygtis)}$$

Panašiu būdu, laikas 95 % pastoviosios būsenos pasiekti yra lygus:

$$t_{95} = \left(\frac{(3,0)}{(k_2)}\right) \qquad \text{(6 lygtis)}$$

Pvz., sugerties tarpsnio trukmė (sug) bandomajai medžiagai, kurios log P_{ow} = 4, būtų (taikant lygtis 1, 5 ir 6):

$\log_{10} k_2 = - 0,414.(4) + 1,47 \qquad k_2 = 0,652 \text{ paros}^{-1}$

sug (80 %) = 1,6/0,652, t. y. 2,45 paros (59 valandos)

arba sug (95 %) = 3,0/0,652, t. y. 4,60 paros (110 valandų)

Panašiai, jei bandomosios medžiagos s = 10–5 mol/l (log(s)= – 5,0), sug trukmė būtų (taikant lygtis 1,2, 5 ir 6):

$\log_{10} (P_{ow}) = - 0,862 (- 5,0) + 0,710 = 5,02$

$\log_{10} k_{2=} - 0,414 (5,02) + 1,47$

$k_2 = 0,246 \text{ paros}^{-1}$

sug (80 %) = 1,6/0,246, t. y. 6,5 paros (156 valandos)

arba sug (95 %) = 3,0/0,246, t. y. 12,2 paros (293 valandos)

Kaip alternatyva, lygtis:

$T_{eq} = 6,54 \times 10^3 P_{ow} + 55,31$ (valandos)

gali būti naudojama apskaičiuoti laiką, reikalingą tikrajai pastoviajai būsenai pasiekti (4).

2. *Apsivalymo tarpsnio trukmės prognozavimas*

Laikas, per kurį organizme sulaikytos medžiagos kiekis sumažėja iki tam tikros pradinės koncentracijos procentinės dalies, taip pat gali būti prognozuojamas, taikant bendrąją lygtį, kuri aprašo sugertį ir apsivalymą (pirmojo laipsnio kinetika) (1) (8).

Apsivalymo tarpsnio atveju daroma prielaida, kad C_w lygi nuliui. Lygtis gali būti paversta į lygtį:

$$\left(\frac{(dC_f)}{(dt)}\right) = (-k_2 C_f) \text{ arba } C_f = (C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t})$$

▼C1

kurioje $C_{f,\,o}$ yra koncentracija apsivalymo tarpsnio pradžioje. Tuomet 50 % apsivalymas bus pasiektas per laiką (t_{50}):

$$\left(\frac{(C_f)}{(C_{f,o})}\right) = \left(\frac{(1)}{(2)}\right) = (e^{-k_2\ t_{50}}) \text{ arba } t_{50} = \left(\frac{(0{,}693)}{(k_2)}\right)$$

Panašiai, 95 % apsivalymas bus pasiektas per laiką:

$$t_{95} = \left(\frac{(3{,}0)}{(k_2)}\right)$$

Jei pirmajam periodui naudojama sugerties trukmė sudaro 80 % ($1{,}6/k_2$), o apsivalymo tarpsnyje sumažėjimas sudaro 95 % ($3{,}0/k_2$), tuomet apsivalymo tarpsnis trunka maždaug du kartus ilgiau nei sugerties tarpsnis.

Tačiau svarbu pažymėti, kad įverčiai remiasi prielaida, kad sugerties ir apsivalymo modeliai atitinka pirmojo laipsnio kinetiką. Jei pirmojo laipsnio kinetikos akivaizdžiai nepaisoma, turi būti naudojami sudėtingesni modeliai (pvz., (1) nuoroda).

Nuorodos (3 priedėlio)

1) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. and Chem. 1, p. 309–320.

2) Kristensen P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of BCFs derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.

3) Chiou C.T. and Schmedding D.W. (1982). Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. Environ. Sci. Technol. 16 (1), pp. 4–10.

4) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentralion kinetics with fish. Wat. Res. 22 (6), pp. 701–707.

5) Branson D. R, Blau G. E, Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Transactions of the American Fisheries Society, 104 (4), pp. 785–792.

6) Ernst W. (1985). Accumulation in Aquatic organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Ed. by Sheehman P., Korte P., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4, pp. 243–255. SCOPE, 1985, John Wiley & amp; Sons Ltd N.Y.

7) Reilly P. M, Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhotf M.W. (1977). Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, Can. J. Chem. Eng. 55. pp. 614–622.

8) Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980). Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. Chemosphere, 9, p. 3–19.

▼C1

4 priedėlis

Bandinių ėmimo tiriant medžiagų, kurių log P_{ow}= 4, Biologinį koncentravimą, grafiko teorinis pavyzdys

Žuvų bandinių ėmimas	Bandinių ėmimo tvarkaraštis		Vandens bandinių skaičius	Žuvų skaičius bandinyje
	Mažiausias reikalingas dažnis (paros)	Papildomas bandinių ėmimas		
Sugerties tarpsnis	-1 0		2 (*) 2	Pridėti 45–80 žuvų
1-asis	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2-asis	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3-asis	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4-asis	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5-asis	4,7		2	6
Apsivalymo tarpsnis				Pernešti žuvis į vandenį be bandomosios medžiagos
6-asis	5,0	5,3		4 (4)
7-asis	5,9	7,0		4 (4)
8-asis	9,3	11,2		4 (4)
9-asis	14,0	17,5		6 (4)

(*) Vandens bandinys imamas po to, kai buvo patiekti mažiausiai trys „kameros tūriai“.

Pastaba: Prieš bandymą darytas k_2 įvertis, kai log P_{ow} = 4,0, yra 0,652 paros^{-1}. Bendra bandymo trukmė nustatyta 3 × sug = 3 × 4,6 paros, t. y. 14 parų. Kaip vertinti „sug“, žr. 3 priedėlį.„“

Vertės skliausteliuose rodo bandinių (vandens, žuvų) skaičių, kurį reikia paimti, jei daromas papildomas bandinių ėmimas.

▼C1

5 priedėlis

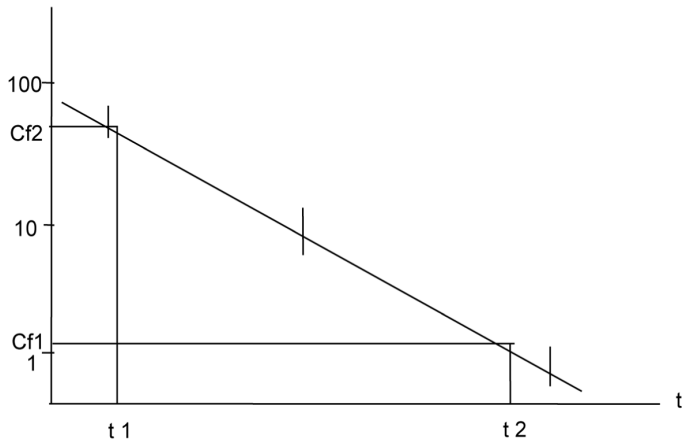
Modelio pasirinkimas

Buvo padaryta prielaida, kad biologinio koncentravimo duomenys „pakankamai“ gerai aprašomi paprasto dviejų kamerų ir dviejų parametrų modelio, ką rodo ištiesinta kreivė, aproksimuojanti koncentracijos žuvyje apsivalymo tarpsnio metu taškus, kai jie vaizduojami pusiau logaritminiame popieriuje. (Jei šie taškai negali būti aprašyti ištiesinta kreive, tuomet reikia naudoti sudėtingesnius modelius, žr. pvz., Spacie ir Hamelink, 3 priedėlio 1 nuoroda).

Grafinis metodas apsivalymo (netekimo) greičio konstantai k_2 nustatyti

Pusiau logaritminiame popieriuje nubraižykite kiekviename žuvies bandinyje rastos bandomosios medžiagos koncentracijos kitimo laike grafiką. Šios tiesės krypties koeficientas yra k_2.

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



Atkreipkite dėmesį, kad nukrypimai nuo tiesės gali reikšti, kad apsivalymo modelis yra sudėtingesnis, nei pirmojo laipsnio kinetika. Norint spręsti apie tai, ar apsivalymo tipas nukrypsta nuo pirmojo laipsnio kinetikos, galima taikyti grafinį metodą.

Grafinis metodas sugerties greičio konstantai k_1 nustatyti

Duotai k_2 vertei k_1 apskaičiuokite taip:

$$k_1 = \frac{(C_f k_2)}{(C_w \times (1 - e^{-k_2 t}))} \qquad \text{(1 lygtis)}$$

C_f vertė nustatoma pagal lygios sugerties kreivės, nubrėžtos remiantis gautais duomenimis, kai braižoma log koncentracijos priklausomybė nuo laiko (aritmetinėje skalėje), vidurio tašką.

▼C1

Kompiuteriniai metodai sugerties ir apsivalymo (netekimo) greičio konstantoms apskaičiuoti

Geriausia priemonė biologinio koncentravimo faktoriui ir k_1 bei k_2 greičio konstantoms apskaičiuoti yra netiesinių parametrų vertinimo metodų taikymas panaudojant kompiuterį. Jei duota koncentracijos kitimo laike duomenų aibė ir modelis, šios programos apskaičiuoja k_1 ir k_2 vertes:

$$C_f = C_w \cdot \left(\frac{(k_1)}{(k_2)}\right) \times (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \qquad \text{(2 lygtis)}$$

$$C_f = C_w \cdot \left(\frac{(k_1)}{(k_2)}\right) \times ((e^{-k_2 (t - t_c)}) - (e^{-k_2 t})) \quad t > t_c \qquad \text{(3 lygtis)}$$

čia: t_c = sugerties tarpsnio pabaigos laikas.

Šis metodas duoda k_1 ir k_2 standartinio nuokrypio įverčius.

Kadangi k_2 didesnei daliai atvejų pagal apsivalymo kreivę gali būti įvertinta palyginus labai tiksliai ir kadangi tarp dviejų parametrų k_1 ir k_2, jei juos vertinti vienu metu, yra stipri koreliacija, galima būtų patarti iš pradžių tik pagal apsivalymo duomenis apskaičiuoti k_2, o vėliau pagal sugerties duomenis, taikant netiesinę regresiją, apskaičiuoti k_1.

▼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 (1)	—	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	μg cm^{-3}
C_o	sąlytyje su dirvožemiu esančio bandomojo tirpalo pradinė masės koncentracija	μg cm^{-3}
$(C_{aq}^{ads}(t_i))$	medžiagos vandeninės fazės masės koncentracija laiku t_i, kai buvo atliekama analizė	μg cm^{-3}
$(C_s^{ads}(eq))$	dirvožemiu adsorbuotos medžiagos kiekis adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis	μg g^{-1}
$(C_{aq}^{ads}(eq))$	medžiagos vandeninės fazės masės koncentracija adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis	μg 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	μg $^{-1-1/n}$ $(cm^3)^{1/n}$ 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	μg 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 l–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**

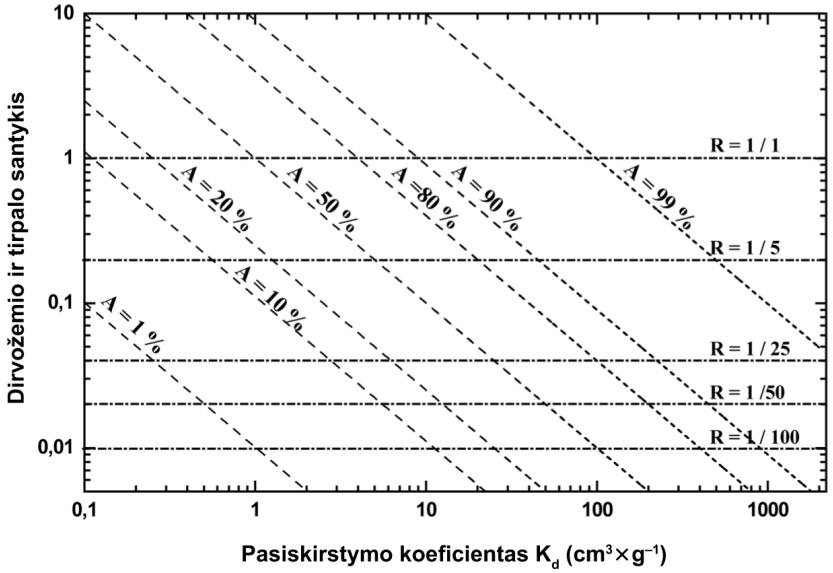
Tinkamo dirvožemio ir tirpalo santykio parinkimas sorbcijos tyrimams priklauso nuo pasiskirstymo koeficiento K_d ir nuo pageidaujamo santykinio adsorbcijos laipsnio. Matavimo, pagrįsto adsorbcijos lygties forma ir analizės metodo riba, statistinį tikslumą nustatant medžiagos tirpalo koncentraciją lemia 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_{t_i}) = 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:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \left(\frac{\log K_F^{ads} + 1}{n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq)} \right) \quad (9)$$

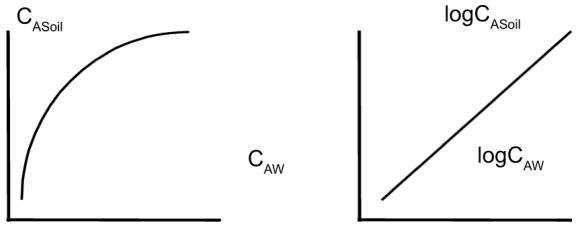
čia:

(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}) ($\mu g^{1-l/n}\ (cm^3)^{1/n} g^{-1}$);

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_{t_i}) = 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_{ti} 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:

$$K_{des} = \left(\left(\frac{(m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq))}{(m_{aq}^{des}(eq))}\right)\left(\frac{(V_T)}{(m_{soil})}\right)\right) \quad (cm^3\ g^{-1}) \qquad (12)$$

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):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} \ (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

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 (μg 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.

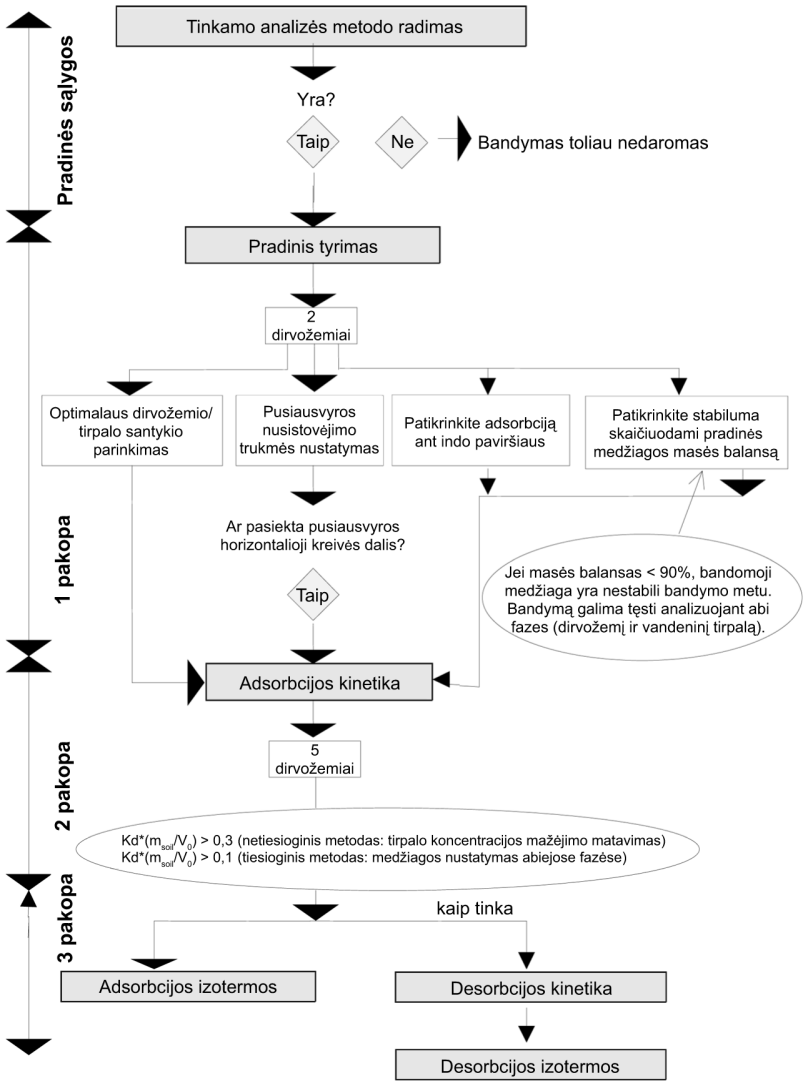
84) Guth, J.A., (1985), „Adsorption/desorption“, in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1–3, Canterbury, UK.

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 %

$$(*m_s^{ads}(eq)) = ((m_0) - (m_{aq}^{ads})(eq)), (C_s^{ads}(eq)) = \left(\frac{\left(\left[(C_0) - (C_{aq}^{ads})(eq)\right]V_0\right)}{(m_{soil})}\right).$$

$$Kd = \left(\frac{((m_s^{ads})(eq))}{((m_{aq}^{ads})(eq))}\right) \times \left(\frac{(V_0)}{(m_{soil})}\right)$$

$m_s^{ads}(eq)$ = 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:

$$t = \left(\frac{(9)}{(2)}\right)\left[\frac{(\eta)}{(\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{aq}))}\right]\ln(R_b/R_t) \qquad (1)$$

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.

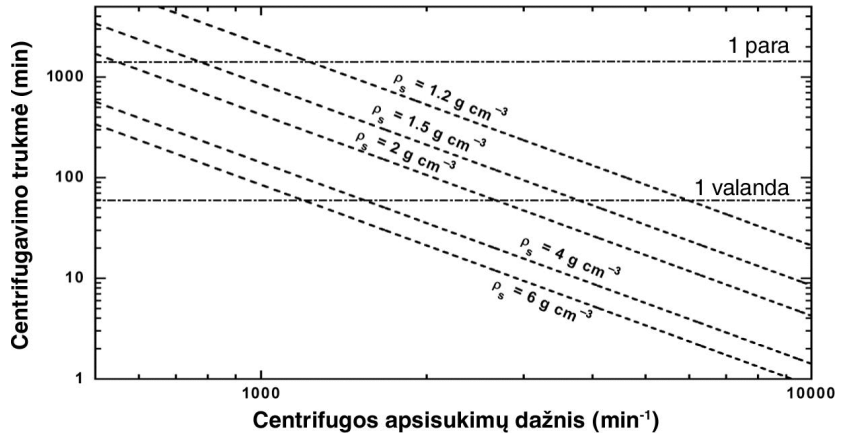
4. 1 pvz., pavaizduotas centrifugavimo trukmės (t) kitimas pagal centrifugos apsisukimų dažnį (min^{-1}) esant skirtingiems dirvožemių tankiams (ρ_s) (1a pav.) ir skirtingiems mišinio stulpelio centrifugavimo mėgintuvėlyje ilgiams (1b pav.). Iš 1a pvz., matyti, kad dirvožemio tankio įtaka yra akivaizdi; 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.

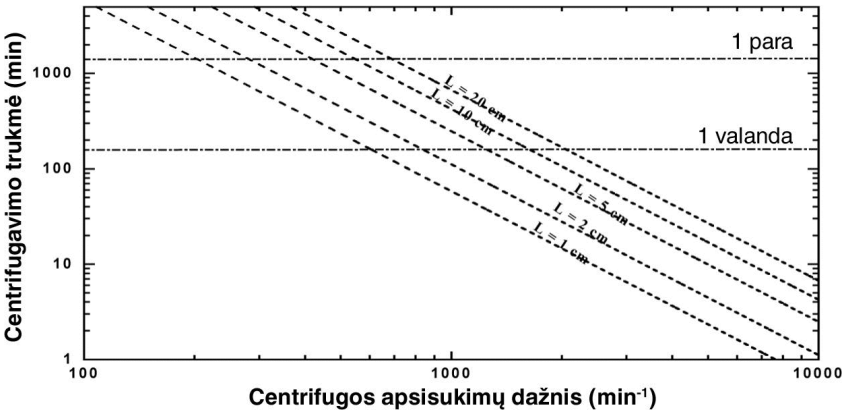
   Jei bandymus atliekanti laboratorija turi ultracentrifugavimo ar ultrafiltravimo priemones, medžiagos adsorbcija/desorbcija dirvožemiu galėtų būti ištirta išsamiau, įskaitant informaciją apie medžiagos adsorbciją koloidinėmis dalelėmis. Šiuo atveju norint atskirti tris fazes: dirvožemį, koloidines daleles 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.



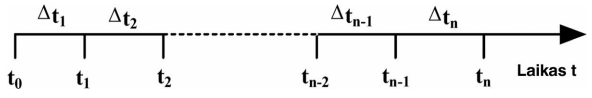
Centrifugavimo trukmės (t) kitimas pagal centrifugos apsisukimų dažnį (min^{-1}) esant skirtingam mišinio stulpelio centrifugavimo mėgintuvėlyje ilgiui (R_b -R_t) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10–3g s- cm^{-1}, ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} esant 25 °C temperatūrai ir ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

▼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_{t_i} = 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);

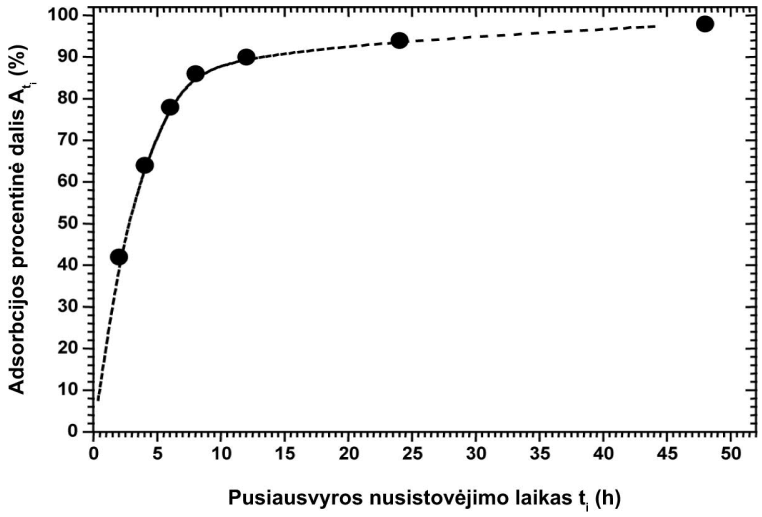
C_0 = sąlytyje su dirvožemiu esančio bandomojo tirpalo pradinė masės koncentracija (μg cm^{-3});

▼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,

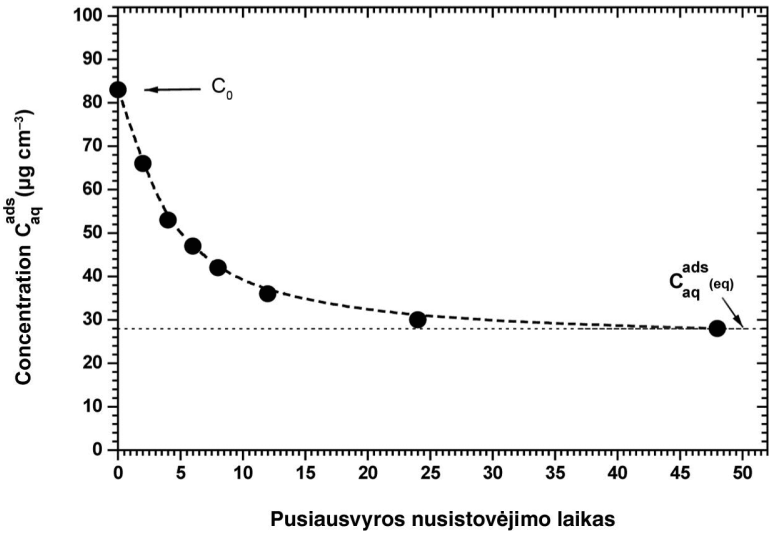
V_0 = sąlytyje su dirvožemiu esančio bandomojo tirpalo pradinis tūris (cm^3).

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 $\Delta t_n = t_n - t_n - 1$

$$(m_s^{ads}(\Delta t_n)) = (m_m^{ads}(t_{n-1})) \cdot \left(\frac{(V_0 - (n-2) \cdot v_a^A)}{(v_a^A)}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A)}{(v_a^A)}\right) \quad (7)$$

— 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:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Adsorbcijos vertės A_{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);

$(A_{\Delta t_i})$ = 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:

$$(m_{aq}^{des}(t_i)) = (m_m^{des}(t_i)) \cdot \left(\frac{(V_0)}{(v_r^i)}\right) - \left(m_{aq}^A\right) \quad (13)$$

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_{t_i}) = desorbcijos procentinė dalis laiko momentu t_i (%),

$(D_{\Delta t_i})$ = 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_{t_i}) 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 $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$(m_{aq}^{des}(\Delta t_1)) = (m_m^{des}(t_1)) \cdot \left(\frac{(V_T)}{(v_a^D)}\right) - (m_{aq}^A) \text{ and } (m_s^{des}(t_1)) = (m_s^{aq}(eq)) - (m_{aq}^{des}(\Delta t_1)) \quad (21)$$

— antrajam laiko tarpui $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$(m_{aq}^{des}(\Delta t_2)) = (m_m^{des}(t_2)) \cdot \left(\frac{(V_T)}{(v_a^D)}\right) - (m_{aq}^{des}(\Delta t_1)) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{(V_T)}\right) - (m_{aq}^A) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{(V_T)}\right)$$

$$(m_s^{des}(t_2)) = (m_s^{ads}(eq)) - [m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + (m_{aq}^{des}(\Delta t_2))] \quad (22)$$

— n-ajam laiko tarpui $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$(m_{aq}^{des}(\Delta t_n)) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{(V_T)}{(v_a^D)}\right) - (m_{aq}^A) \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1)\ v_a^D\right)}{(V_T)}\right) - \left(\sum_{i=1, n\neq 1}^{n-1}\right)\left(\frac{(V_T - (n-i)\ v_a^D)}{(V_T)}\ m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right]$$

$$\left(m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \left(\sum_{i=1, n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right) \quad (23)$$

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 nuosekliųjį 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	µg cm^3	
Galutinio tirpalo analizinė koncentracija	µg 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	µg 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 (apskaičiuotas)	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). Įvertčiai yra patikimesni 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.

$$K_d = \left(\frac{(C_{soil})}{(C_{aq})}\right) or \left(\frac{(C_{sludge})}{(C_{aq})}\right) \quad (1)$$

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.

$$Koc = \left(\frac{(Kd)}{(foc)}\right)(\text{bedimensinis arba ml}\cdot g^{-1}) \text{ ar } \left(\frac{(Kf)}{(foc)}\right)(\mu g\cdot g^{-1}) \quad (3)$$

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.

$$Pow = \left(\frac{(Coctanol)}{(Caq)}\right)(= Kow) \quad (5)$$

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 gimininguma 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	[c]
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	24017–47–4017–4-7–8	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.

▼C1

C.20 **DAPHNIA MAGNA REPRODUKCIJOS BANDYMAS**

1. **METODAS**

Šis toksiškumo reprodukcijai bandymo metodas yra OECD TG 211 (1998) kopija.

1.1. ĮVADAS

Pagrindinis šio bandymo tikslas – įvertinti cheminių medžiagų poveikį *Daphnia magna* reprodukcijos našumui.

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Motininiai gyvūnai – nuo bandymo pradžios naudojamos moteriškos lyties dafnijos, kurių yra tiriamas reprodukcijos našumas.

Palikuonys – atliekant bandymą atvestos dafnijos.

Mažiausia pastebimą poveikį sukelianti koncentracija (LOEC) – mažiausia bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant medžiaga per nustatytą veikimo laikotarpį daro statistiškai reikšmingą poveikį, lyginant su kontroliniais bandiniais, reprodukcijai ir motininių gyvūnų gaištamumui ($p < 0,05$). Tačiau visų didesnių kaip LOEC bandomųjų koncentracijų kenksmingas poveikis turi būti lygus ar didesnis kaip LOEC koncentracijos bandomosios medžiagos poveikis. Jei šios dvi sąlygos negali būti įvykdytos, turi būti pateiktas išsamus paaiškinimas, kodėl buvo pasirinkta LOEC (taigi ir NOEC).

Nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC) – bandomoji koncentracija bent kiek mažesnė už LOEC, kuri per nustatytą veikimo laikotarpį nedaro statistiškai reikšmingo poveikio ($p < 0,05$) lyginant su kontroliniais bandiniais.

EC_x – vandenyje ištirpintos bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai *esant Daphnia magna* reprodukcija per nustatytą veikimo laikotarpį sumažėja x %.

Būdingasis prieaugio greitis – populiacijos augimo matas, apimantis reprodukcijos našumą ir amžiui būdingą gaištamumą (20) (21) (22). Stacionarios būsenos populiacijų būdingasis prieaugio greitis lygus nuliui. Augančių populiacijų greitis yra teigiamas, o nykstančių populiacijų – neigiamas. Aišku, kad pastarosios yra neilgaamžės ir galiausiai išnyksta.

Aptikimo riba – mažiausia koncentracija, kai medžiagą galima aptikti, bet nenustatyti kiekybiškai.

Nustatymo riba – mažiausia kiekybiškai nustatoma koncentracija.

Gaištamumas – gyvūnas registruojamas nugaišęs, kai jis nejuda, t. y. kai negali plaukti arba kai, 15 s lengvai papurčius bandymo indą, nepastebima judant galūnių ar pilvelio. (Jei taikoma kitas apibrėžtis, ji turi būti pateikta kartu su nuoroda.).

▼C1

1.3. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Jaunos moteriškos lyties dafnijos (motininiai gyvūnai), kurių amžius bandymo pradžioje mažesnis kaip 24 h, yra veikiamos bandomąja medžiaga, ištirpinta vandenyje tam tikram koncentracijos verčių intervalui gauti. Bandymo trukmė 21 para. Baigiant bandymą įvertinamas vienam gyvam motininiam gyvūnui tenkančių gyvų palikuonių bendras skaičius. Suaugusiųjų atvesti jaunikliai, kurie žūva atliekant bandymą, į skaičiavimus neįtraukiami. Motininių gyvūnų reprodukcijos našumą galima išreikšti kitais būdais (pvz., gyvų palikuonių, atvestų vieno gyvūno per parą nuo pirmos palikuonių pastebėjimo dienos, skaičiumi), tačiau ataskaitoje šie skaičiai turi būti pateikiami papildomai prie bendro gyvų jauniklių skaičiaus, bandymo pabaigoje tenkančio vienam motininiam gyvūnui. Mažiausiai pastebimą poveikį sukeliančiai koncentracijai (LOEC), kartu ir nepastebėto poveikio koncentracijai, nustatyti (NOEC) bandomąja medžiaga veikiamų gyvūnų reprodukcijos našumas lyginamas su kontrolinio (-ių) bandinio (-ių) našumu. Be to, duomenys analizuojami taikant, kiek įmanoma, regresijos modelį, kad būtų galima įvertinti koncentraciją, kuriai esant reprodukcijos našumas sumažėtų x % (t. y. the EC_{50}, EC_{20}, ar EC_{10}).

Ataskaitoje taip pat turi būti nurodytas motininių gyvūnų išlikimo laipsnis ir pirmosios vados atsiradimo laikas. Gali būti ištirti kiti medžiagos veikiami parametrai, pvz., augimas (pvz., ilgis) ir galbūt būdingasis prieaugio greitis.

1.4. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

Reikėtų turėti su *Daphnia magna* atlikto trumpalaikio toksiškumo bandymo (žr. C.2 metodo I dalį) rezultatus. Rezultatas gali būti naudingas pasirenkant atitinkamą reprodukcijos bandymų bandomosios koncentracijos intervalą. Turi būti žinomas bandomosios medžiagos tirpumas vandenyje ir garų slėgis, be to, bandomosios medžiagos tirpalų koncentracijai kiekybiškai nustatyti turi būti prieinamas patikimas analizės metodas, kurio žinomi regeneravimo efektyvumas ir nustatymo riba.

Informacija apie bandomąją medžiagą, galinti būti vertinga nustatant bandymo sąlygas, apima struktūrinę formulę, medžiagos grynumą, stabilumą šviesoje, stabilumą bandymo sąlygomis, pKa, P_{ow} ir lengvo biologinio skaidumo bandymo rezultatus (žr. C.4 metodą).

1.5. BANDYMO TINKAMUMAS

Metodas yra tinkamas, jei, atliekant kontrolinį (-ius) bandymą (-us), įvykdomi šie veiksmingumo kriterijai:

— bandymo pabaigoje motininių gyvūnų gaištamumas (moteriškos lyties dafnijų) yra ne didesnis kaip 20 %,

— iš vieno iki bandymo pabaigos išgyvenusio motininio gyvūno gautų gyvų palikuonių vidutinis skaičius yra ≥ 60.

1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Aparatūra**

Bandymo indai ir kita aparatūra, su kuria liečiasi bandomieji tirpalai, turi būti pagaminti vien tik iš stiklo ar kitos chemiškai inertiškos medžiagos. Bandymams paprastai naudojamos laboratorinės stiklinės.

Be to, yra reikalinga ši aparatūra arba jos dalis:

— deguonies matuoklis (su mikroelektrodu ar kita tinkama įranga ištirpusiam deguoniui mažo tūrio bandiniuose matuoti),

▼C1

— atitinkama aparatūra pastoviai temperatūrai palaikyti,

— pH-metras,

— įranga vandens kietumui nustatyti,

— įranga bendrosios organinės anglies vandenyje koncentracijai (TOC) ar įranga cheminiam deguonies suvartojimui (COD) nustatyti,

— tinkama aparatūra apšvietimo režimui kontroliuoti ir šviesos intensyvumui matuoti.

1.6.2. **Bandomieji organizmai**

Bandymui reikėtų naudoti *Daphnia magna Straus*. Galima naudoti kitas dafnijų rūšis, jei jos atitinka nustatytus tinkamumo kriterijus (dafnijų rūšiai turi būti taikomas su kontrolinių bandinių reprodukcijos našumu susijęs tinkamumo kriterijus). Jei naudojamos kitos dafnijų rūšys, jos turi būti aiškiai apibrėžtos ir jų naudojimas turi būti pagrįstas.

Kloną geriau būtų identifikuoti pagal genotipą. Tyrimas (1) parodė, kad A klono (jo kilmė – IRCHA (*Institut de Recherche en Chimie Appliquee*), Prancūzija) (3) reprodukcijos našumas visą laiką atitinka tinkamumo kriterijų, pagal kurį vieno motininio gyvūno, išlikusio gyvo auginant šiame metode aprašytomis sąlygomis, vidutinis palikuonių skaičius $\geq$ 60. Tačiau priimtini ir kiti klonai, jei parodoma, kad dafnijų kultūra atitinka bandymo tinkamumo kriterijus.

Bandymo pradžioje gyvūnai turi būti jaunesni kaip 24 h ir neturi būti pirmoji palikuonių karta. Jie turi būti gauti iš sveikų motininių gyvūnų (t. y. be streso požymių, pvz., didelis gaištamumas, vyriškos lyties atstovų ir *ephippia* buvimas, vėlavimas atvesti pirmąją vadą, pasikeitusi gyvūnų spalva ir t. t.). Motininiai gyvūnai turi būti laikomi tokiomis sąlygomis (šviesa, temperatūra, terpė, maitinimas ir gyvūnų skaičius tūrio vienetui), kurios būtų panašios į bandymo sąlygas. Jei bandymui naudota auginimo terpė skiriasi nuo įprastos dafnijų auginimo terpės, motininių gyvūnų stresui išvengti gera praktika reikalauja leisti dafnijoms paprastai maždaug per tris savaites (t. y. vienos kartos laikotarpiu) aklimatizuotis.

1.6.3. **Bandomoji terpė**

Rekomenduojama šiems bandymams naudoti visiškai apibrėžtą terpę. Taip galima išvengti sunkiai apibūdinamų priedų naudojimo (pvz., jūros dumblių, dirvožemio ekstrakto ir t. t.), taigi pagerėja tarplaboratorinio standartizavimo galimybės. Buvo nustatyta, kad geriausiai tinka Elendt M4 (4) ir M7 terpės (žr. 1 priedėlį). Tačiau yra priimtinos ir kitos terpės (pvz., (5) (6)), jei jose išauginta dafnijų kultūra atitinka bandymui nustatytus tinkamumo kriterijus.

Jei naudojamos terpės su neapibrėžtais priedais, šie priedai turi būti aiškiai apibūdinti ir bandymo ataskaitoje turi būti informacija apie jų sudėtį, ypač apie organinės anglies kiekį, nes ji gali būti tiekiamo maisto dalis. Rekomenduojama nustatyti organinio priedo pradinio tirpalo bendrąją organinę anglį (TOC) ir (ar) cheminį deguonies suvartojimą (COD) ir įvertinti dėl jų paruoštoje terpėje susidarantį TOC/COD. Rekomenduojama, kad terpės (t. y. prieš pridedant dumblių) TOC lygis būtų mažesnis kaip 2 mg/l (7).

▼C1

Bandant metalų turinčias medžiagas, svarbu suprasti, kad bandomosios terpės savybės (pvz., kietumas, chelatavimo geba) gali turėti įtakos bandomosios 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 chelatavimo medžiagos EDTA. Darbas (2) parodė, kad, reprodukcijos bandymą atliekant M4 ir M7 terpėje, kadmio „tariamasis toksiškumas“ paprastai yra mažesnis lyginant su EDTA neturinčia terpe. Taigi M4 ir M7 nerekomenduojama naudoti bandant metalų turinčias medžiagas, taip pat reikėtų vengti naudoti terpes, turinčias žinomas chelatavimo medžiagas. Metalų turinčioms medžiagoms patartina naudoti kitą terpę, pvz., ASTM (*American Society for Testing and Materials*) atkurtąjį kietą gėlą vandenį (7) be EDTA, į kurį pridėta jūros dumblių ekstrakto (8). Šis ASTM atkurtojo kieto gėlo vandens ir jūros dumblių ekstrakto derinys taip pat tinka ilgą laiką auginti ir bandyti *Daphnia magna* (2), nors dėl jūros dumblių ekstrakto organinio komponento vis dar pasireiškia nedidelis chelatuojantis veikimas.

Bandymo pradžioje ir toliau per visą bandymą ištirpusio deguonies koncentracija turi būti didesnė kaip 3 mg/l. pH vertė turi būti 6–9 ir atliekant bet kurį bandymą ji paprastai neturi kisti daugiau kaip 1,5 vieneto. Rekomenduojamas 140 mg/l (pagal $CaCO_3$) kietumas. Bandymai, atlikti esant šiam ar aukštesniam lygiui, parodė, kad reprodukcijos našumas atitinka tinkamumo kriterijus (9) (10).

1.6.4. **Bandomieji tirpalai**

Pasirinktos koncentracijos bandomieji tirpalai paprastai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Pradinius tirpalus geriau ruošti tirpinant medžiagą bandomojoje terpėje.

Kartais, norint gauti tinkamos koncentracijos pradinį tirpalą, gali tekti naudoti organinius tirpiklius ar dispergatorius, tačiau reikia kiek įmanoma stengtis šių medžiagų nenaudoti. Tinkami tirpikliai yra acetonas, etanolis, metanolis, dimetilformamidas ir trietilenglikolis. Tinkami dispergatoriai yra *Cremophor* RH40, 0,01 % metilceliuliozė ir HCO-40. Bet kuriuo atveju bandomosios medžiagos bandomojo tirpalo koncentracija neturi būti didesnė kaip tirpumo bandomojoje terpėje riba.

Tirpikliai naudojami pradiniam tirpalui ruošti, kuris gali būti tiksliai dozuojamas vandeniu. Kai pirmiau išvardyti tirpikliai galutinėje bandomojoje terpėje bus rekomenduojamos koncentracijos (t. y. ≤ 0,1 ml/l), jie nebus toksiški ir nepadidins medžiagos tirpumo vandenyje.

Dispergatoriai gali padėti tiksliai dozuoti ir disperguoti. Kai pirmiau išvardyti dispergatoriai galutinėje bandomojoje terpėje bus rekomenduojamos koncentracijos (≤ 0,1 ml/1), jie nebus toksiški ir nepadidins medžiagos tirpumo vandenyje.

▼C1

1.7. BANDYMO SCHEMA

Bandymo indai paskirstomi pagal apdorojimo būdus, o toliau visi bandymo indai turi būti tvarkomi atsitiktiniu būdu. Taip nedarant, gali atsirasti nukrypimas, kuris galėtų būti aiškinamas koncentracijos poveikiu. Ypač jei bandymo vienetai tvarkomi tokia seka, kokia jie buvo apdoroti, arba atsižvelgiant į koncentraciją, kai kurie su laiku susiję veiksniai, pvz., operatoriaus nuovargis ar kita klaida esant didesnėms koncentracijos vertėms gali turėti rimtesnių padarinių. Be to, jei bandymo rezultatus gali veikti bandymo pradinės ar aplinkos, pvz., padėties laboratorijoje, sąlygos, reikėtų svarstyti blokinę bandymo schemą.

1.8. BANDYMO PROCEDŪRA

1.8.1. **Veikimo sąlygos**

1.8.1.1. *Trukmė*

Bandymo trukmė – 21 para.

1.8.1.2. *Įkrova*

Motininiai gyvūnai laikomi atskirai po vieną bandymo inde su 50–100 ml terpės.

Kartais, atsižvelgiant į analizės metodikos bandomajai medžiagai nustatyti reikalavimus, gali būti reikalingas didesnis tūris, nors cheminei analizei atlikti leidžiama kartu supilti tos pačios koncentracijos bandinius. Jei naudojamas didesnis kaip 100 ml tūris, gali tekti padidinti dafnijų maisto davinį, kad turimo maisto pakaktų ir būtų garantuota tinkamumo kriterijų atitiktis. Dinaminiams bandymams dėl techninių priežasčių galima numatyti alternatyvias bandymo schemas (pvz., keturias grupes po 10 gyvūnų didesniame bandymo tūryje), tačiau visi bandymo schemos pakeitimai turi būti nurodyti ataskaitoje.

1.8.1.3. *Gyvūnų skaičius*

Pusiau statiniams bandymams kiekvienai koncentracijai imama bent 10 atskirai laikomų gyvūnų ir bent 10 atskirai laikomų gyvūnų kontrolinės serijos bandiniams.

Buvo parodyta, kad dinaminiams bandymams kiekvienai koncentracijai tinka naudoti 40 gyvūnų, padalytų į keturias grupes po 10 gyvūnų (1). Galima naudoti mažiau bandomųjų organizmų, bet kiekvienai koncentracijai rekomenduojama naudoti ne mažiau kaip po 20 gyvūnų, padalytų į du ar daugiau bandinių su vienodu gyvūnų skaičiumi (pvz., į keturis bandinius su 5 dafnijomis kiekvienam bandiniui). Atkreiptinas dėmesys, kad, jei atliekant bandymus su grupėmis laikomais gyvūnais, motininiai gyvūnai žūva, reprodukcijos našumo bus neįmanoma išreikšti kaip bendro gyvų palikuonių skaičiaus, tenkančio vienam bandymo pabaigoje gyvam motininiam gyvūnui. Tokiais atvejais reprodukcijos našumas išreiškiamas kaip „bendras skaičius gyvų palikuonių, tenkantis vienam bandymo pradžioje buvusiam gyvūnui“.

1.8.1.4. *Maitinimas*

Atliekant pusiau statinius bandymus geriau maitinti kasdien, tačiau ne mažiau kaip tris kartus per savaitę (tai atitinka terpės keitimą). Nukrypimai nuo šių sąlygų (pvz., dinaminių bandymų) nurodomi ataskaitoje.

▼C1

Atliekant bandymą motininių gyvūnų maistą turėtų sudaryti šių gyvų dumblių ląstelės: *Chlorella sp., Selenastrum capricornutum* (dabar *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)) ir *Scenedesmus subspicatus*. Tiekiamas maistas turėtų būti apskaičiuotas pagal organinės anglies (C) kiekį, duodamą kiekvienam motininiam gyvūnui. Tyrimas (12) parodė, kad *Daphnia magna* pakanka gauti 0,1– 0,2 mg C/dafnijai/parai, kad būtų pasiektas bandymo tinkamumo kriterijus, atitinkantis palikuonių skaičių. Maistą galima tiekti vienodai visą bandymo laiką ar, jei norima, mažiau bandymo pradžioje ir daugiau bandymo eigoje, atsižvelgiant į motininių gyvūnų augimą. Šiuo atveju visą laiką davinys turi atitikti rekomenduotą intervalą 0,1– 0,2 mg C/dafnijai/parai.

Jei maitinimo lygiui nustatyti naudojami pakeitimo parametrai, pvz., dumblių ląstelių skaičius ar šviesos absorbcija (t. y. kad būtų patogiau, nes anglies kiekiui nustatyti reikia daug laiko), kiekviena laboratorija turi daryti savo nomogramą, kuri pakeitimo parametrą susietų su anglies kiekiu dumbliuose (žr. 2 priedėlį apie nomogramos darymą). Nomogramas būtina tikrinti bent kartą per metus ir dažniau, jei kinta dumblių auginimo sąlygos. Buvo nustatyta, kad šviesos absorbcija yra geresnis anglies kiekio pakeitimo parametras negu ląstelių skaičius (13).

Dafnijos maitinamos koncentruota dumblių suspensija, kad į bandymo indus pilamos kultūros terpės tūris būtų kiek įmanoma mažesnis. Dumbliams koncentruoti galima naudoti centrifugavimą ir pakartotinį suspendavimą distiliuotame vandenyje, dejonizuotame vandenyje ar dafnijų kultūros terpėje.

1.8.1.5. *Šviesa*

16 h trukmės apšvietimas, kurio intensyvumas ne didesnis kaip 15–20 μE m^{-2} s^{-1}.

1.8.1.6. *Temperatūra*

Band terpės temperatūra turi būti 18–22 °C. Tačiau, jei įmanoma, atliekant visus bandymus temperatūra neturėtų kisti daugiau kaip 2 °C taikant šiuos intervalus (pvz., 18–20, 19–21 ar 20–22 °C). Temperatūrai kontroliuoti gali būti naudingas papildomas bandymo indas.

1.8.1.7. *Aeravimas*

Atliekant bandymą bandomieji tirpalai neaeruojami.

1.8.2. **Bandomoji koncentracija**

Paprastai naudojamos bent penkios bandomosios koncentracijos vertės, sudarančios geometrinę progresiją, kurios daugiklis būtų ne didesnis kaip 3,2, ir kiekvienai bandomosios koncentracijos vertei daromas atitinkamas skaičius lygiagrečiųjų bandymų (žr. 1.8.1.3 skirsnį). Jei naudojamos mažiau kaip penkios koncentracijos vertės, tai reikia pagrįsti. Neturi būti bandomos medžiagos, jei jų koncentracija yra didesnė nei tirpumo bandomojoje terpėje riba.

▼C1

Nustatant koncentracijų intervalą būtina žinoti:

i) jei tikslas – nustatyti LOEC/NOEC, mažiausia bandomoji koncentracija turi būti gana maža, kad ją naudojant vaisingumas lyginant su kontroliniu bandiniu nebūtų pastebimai mažesnis. Jei taip nėra, bandymą reikia pakartoti su dar mažesne mažiausia koncentracija;

ii) jei tikslas – nustatyti LOEC/NOEC, didžiausia bandomoji koncentracija turi būti gana didelė, kad ją naudojant vaisingumas lyginant su kontroliniu bandiniu būtų daug mažesnis. Jei taip nėra, bandymą reikia pakartoti su dar didesne didžiausia koncentracija;

iii) jei vertinama reprodukciją veikianti EC_x, jai apibrėžti atitinkamu pasikliovimo lygiu patartina naudoti pakankamą koncentracijos verčių skaičių. Jei vertinama reprodukciją veikianti EC_{50}, patartina, kad didžiausia bandomoji koncentracija būtų didesnė kaip ši EC_{50}. Priešingu atveju, nors EC_{50} vis dar galima įvertinti, EC_{50} pasikliovimo intervalas būtų labai platus, ir gali būti neįmanoma tinkamai įvertinti parinkto modelio tinkamumo;

iv) reikėtų vengti į bandomosios koncentracijos verčių intervalą įtraukti koncentracijos vertes, kurios būtų statistiškai reikšmingos suaugusių gyvūnų išlikimui, nes taip pasikeistų bandymo principas, ir jis iš paprasto reprodukcijos bandymo taptų sudėtinio reprodukcijos ir gaištamumo bandymu, kuriam reikalinga daug sudėtingesnė statistinė analizė.

Tinkamas bandomąsias koncentracijas parinkti turėtų padėti anksčiau gautos žinios apie bandomąją medžiagą (pvz., trumpalaikio toksiškumo ir (ar) intervalo nustatymo tyrimų duomenys).

Jei bandomiesiems tirpalams ruošti naudojamas tirpiklis ar dispergatorius (žr. 1.6.4 skirsnį), jų galutinė koncentracija visuose bandymo induose turi būti vienoda ir ne didesnė kaip 0,1 ml/l.

1.8.3. **Kontroliniai bandiniai**

Be bandomosios medžiagos bandinių serijos, bandoma viena bandymo terpės kontrolinių bandinių serija ir, jei tinka, viena tirpiklio ar dispergatoriaus kontrolinių bandinių serija. Naudojamo tirpiklio ar dispergatoriaus koncentracija turi būti tokia, kokia yra induose su bandomąja medžiaga. Turi būti atliekamas atitinkamas skaičius lygiagrečiųjų bandymų (žr. 1.8.1.3 skirsnį).

Paprastai jei bandymas atliekamas tinkamai, kontrolinio (-ių) bandinio (-ių) variacijos apie vidutinę motininio gyvūno produkuotų palikuonių vertę koeficientas turi būti $\leq$ 25 %, ir jis turi būti nurodomas bandymo schemoms su atskirai laikomais gyvūnais.

1.8.4. **Bandomosios terpės atnaujinimas**

Bandomosios terpės atnaujinimo dažnis priklauso nuo bandomosios medžiagos, tačiau ji turėtų būti atnaujinama tris kartus per savaitę. Jei pagal išankstinius stabilumo bandymus (žr. 1.4 skirsnį) bandomosios medžiagos koncentracija ilgiausiu (t. y. trijų parų) atnaujinimo laikotarpiu yra nestabili (t. y. yra už 80–120 % vardinės koncentracijos ribų ar yra mažesnė kaip 80 % išmatuotos pradinės koncentracijos), reikėtų numatyti dažnesnį terpės atnaujinimą arba taikyti dinaminį bandymą.

▼C1

Kai atnaujinama pusiau statinių bandymų terpė, paruošiama antra bandymo indų serija, ir į juos pernešami motininiai gyvūnai naudojant, pvz., tinkamo skersmens stiklinę pipetę. Su *Daphnia* pernešamos terpės tūris turi būti kuo mažesnis.

1.8.5. **Matavimai**

Stebėjimų rezultatai, gauti atliekant bandymą, registruojami specifikacijose (žr. 3 ir 4 priedėlių pavyzdžius). Jei reikia daryti kitus matavimus (žr. 1.3 ir 1.8.8), gali būti atliekami papildomi stebėjimai.

1.8.6. **Palikuonys**

Kiekvieno motininio gyvūno atvestus palikuonis geriau atskirti ir skaičiuoti kasdien nuo pirmosios vados atsiradimo, kad jie nevartotų suaugusiems gyvūnams skirto maisto. Pagal šį metodą reikia skaičiuoti tik gyvus palikuonis, tačiau reikia registruoti neapvaisintų kiaušinių ar negyvų palikuonių skaičių.

1.8.7. **Gaištamumas**

Motininių gyvūnų gaištamumą geriau registruoti kasdien, bent jau tuomet, kai skaičiuojami palikuonys.

1.8.8. **Kiti parametrai**

Nors šis metodas iš esmės yra skirtas reprodukcijos rezultatams vertinti, galima kiekybiškai įvertinti ir kitus rezultatus, kad būtų įmanoma jų statistinė analizė. Labai pageidautina, kad būtų daromi augimo matavimai, nes jie suteikia informacijos apie galimus subletalius rezultatus, kurie gali būti naudingesni nei vien tik reprodukcijos matavimas; 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 ar *ephippia* buvimas ir populiacijos prieaugio būdingasis greitis.

1.8.9. **Analizinių nustatymų ir matavimų dažnis**

Deguonies koncentracija, temperatūra, kietumas ir pH vertės turi būti matuojamos bent kartą per savaitę prieš ir po terpės atnaujinimo kontroliniame (-iuose) bandinyje (-iuose) ir induose su didžiausia bandomosios medžiagos koncentracija.

Atliekant bandymą bandomosios medžiagos koncentracijos vertės nustatomos reguliariais laiko tarpais.

Jei pusiau statiniuose bandymuose daroma prielaida, kad bandomosios medžiagos koncentracija lieka ± 20 % vardinės koncentracijos vertės (t. y. 80–120 % intervalo, žr. 1.4 ir 1.8.4), rekomenduojama nustatyti bent didžiausią ir mažiausią bandomąją koncentraciją iš karto po tirpalo paruošimo ir prieš pat jo atnaujinimą pirmąją bandymo savaitę (t. y. turi būti atliekama to paties tirpalo mėginių analizė iš karto po tirpalo paruošimo ir jį atnaujinant). Vėliau šis nustatymas turi būti kartojamas bent kas savaitę.

▼C1

Jei tai yra bandymai, kuriuos atliekant nesitikima, kad koncentracija liks ± 20 % vardinės koncentracijos vertės, būtina analizuoti visų koncentracijos verčių bandomuosius tirpalus iš karto po jų paruošimo ir prieš pat atnaujinimą. Tačiau bandymuose, kur išmatuota pradinė bandomosios medžiagos koncentracija nesudaro ± 20 % vardinės vertės, bet galima gauti pakankamai įrodymų, kad pradinės koncentracijos vertės yra pakartojamos ir stabilios (t. y. 80–120 % pradinės koncentracijos verčių intervalo), bandymo antrą ar trečią savaitę cheminių analizių skaičių galima sumažinti ir apsiriboti didžiausios ir mažiausios bandomosios koncentracijos nustatymu. Visais atvejais prieš atnaujinimą turi būti daromas tik vieno lygiagretaus kiekvienos koncentracijos bandinio bandomosios koncentracijos nustatymas.

Jei taikomas dinaminis bandymas, tinka pusiau statinių bandymų bandinių ėmimo režimas (bet „senų“ tirpalų analizė šiuo atveju netinka). Tačiau, norint patikrinti bandomosios koncentracijos verčių stabilumą, patartina pirmąją savaitę bandinius imti dažniau (pvz., trys matavimų serijos). Šio tipo bandymuose skiediklio srautas ir bandomoji medžiaga turi būti kontroliuojami kasdien.

Jei yra įrodymų, kad bandomosios medžiagos koncentracija visą bandymą gali būti išlaikyta ± 20 % vardinės koncentracijos ar išmatuotos pradinės koncentracijos vertės, rezultatai gali būti išreikšti vardinėmis ar išmatuotomis pradinėmis vertėmis. Jei vardinės ar išmatuotos pradinės koncentracijos nuokrypis yra didesnis kaip ± 20 %, rezultatai turėtų būti išreiškiami kaip laiko svorinis vidurkis (žr. 5 priedėlį).

2. DUOMENYS IR ATASKAITA

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Šio bandymo tikslas – nustatyti, kokį poveikį daro bandomoji medžiaga bendram kiekiui palikuonių, kuriuos atveda kiekvienas iki bandymo pabaigos gyvas išlikęs motininis gyvūnas. Bendras vieno motininio gyvūno palikuonių skaičius apskaičiuojamas kiekvienam bandymo indui (t. y. lygiagretusis bandinys). Jei kuriame nors inde motininis gyvūnas atliekant bandymą žūva arba pasirodo, kad yra vyriškos lyties, lygiagretusis bandinys iš analizės pašalinamas. Tuomet analizė bus pagrįsta mažesniu skaičiumi lygiagrečiųjų bandinių.

Norint įvertinti LOEC, taigi ir NOEC, susijusią su cheminės medžiagos poveikiu reprodukcijos našumui, būtina apskaičiuoti vidutinį reprodukcijos našumą visiems kiekvienos koncentracijos lygiagretiesiems bandiniams ir grupinį liekamąjį standartinį nuokrypį, o tai galima padaryti taikant dispersinę analizę (ANOVA). Toliau kiekvienos koncentracijos vidutinė vertė turi būti palyginta su kontrolinio bandinio vidutine verte taikant atitinkamą daugybinio lyginimo metodą. Gali būti naudingi Dunnetto ar Williamso bandymai (14) (15) (16) (17). Būtina patikrinti, ar taikant dispersinę analizę galioja sklaidos homogeniškumo prielaida. Rekomenduojama tai daryti grafiškai, o ne taikant formalų reikšmingumo kriterijų (18); tinkama alternatyva būtų Bartletto bandymas. Jei ši prielaida negalioja, reikėtų numatyti duomenų transformavimą sklaidoms homogenizuoti prieš atliekant dispersinę analizę ar atlikti svorinę dispersinę analizę. Taikant dispersinę analizę aptinkamo poveikio dydis (t. y. mažiausias reikšmingas skirtumas) turi būti apskaičiuotas ir pateiktas ataskaitoje.

▼C1

Koncentracijai, kuri sukeltų reprodukcijos našumo sumažėjimą 50 % (t. y. EC_{50}), įvertinti pagal duomenis turi būti pritaikyta tinkama kreivė, pvz., logistinė kreivė taikant statistinį, pvz., mažiausių kvadratų, metodą. Kreivė galėtų būti parametrizuota taip, kad EC_{50} ir jos standartinė paklaida būtų įvertinta tiesiogiai. Tai labai palengvintų EC_{50} pasikliovimo ribų apskaičiavimą. Jei nėra svarbių priežasčių, kodėl turėtų būti naudojami kiti pasikliovimo lygiai, turi būti nurodyti dvipusės 95 % pasikliovimo ribos. Pritaikymo metodika geriau turėtų numatyti būdą atitikties nebuvimo reikšmingumui įvertinti. Tai galima padaryti grafiškai arba liekamąją kvadratų sumą padalijus į „atitikties nebuvimo“ dalį ir „grynos paklaidos komponentų“ dalį ir daryti atitikties nebuvimo reikšmingumo tikrinimą. Kadangi po apdorojimų, po kurių vaisingumas būna didelis, gali būti didesnė jauniklių skaičiaus sklaida negu po apdorojimų, po kurių vaisingumas būna mažas, reikėtų atsižvelgti į galimybę stebėtoms vertėms taikyti svorinius koeficientus, kad būtų galima atspindėti skirtingą sklaidą skirtingose apdorojimo grupėse (žr. (18) nuorodą, kurioje pateikiama pagrindinė informacija).

Analizuojant galutinio tarplaboratorinio bandymo duomenis (2), logistinė kreivė buvo pritaikyta naudojant šį modelį, nors galima naudoti kitus tinkamus modelius:

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

Čia:

Y = bendras jauniklių skaičius, tenkantis vienam gyvam motiniam gyvūnui bandymo pabaigoje (apskaičiuotas kiekvienam indui),

x = medžiagos koncentracija,

c = laukiamas jauniklių skaičius, kai x = 0,

x_0 = populiacijos EC_{50},

b = krypties koeficiento parametras.

Šis modelis turėtų tikti daugeliui situacijų, tačiau pasitaikys bandymų, kuriems jis netinka. Reikėtų patikrinti modelio tinkamumą, kaip užsiminta pirmiau. Kai kuriais atvejais gali tikti *hormesis* modelis, kurį taikant būna didesnis mažų koncentracijos verčių poveikis (19).

Gali būti įvertintos kitos poveikio koncentracijos vertės, pvz., EC_{10} ar EC_{20}, bet modelio parametrams nustatyti geresnis gali pasirodyti kitas būdas, nei buvo naudotas EC_{50} įvertinti.

2.2. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti:

2.2.1. **Bandomoji medžiaga:**

— fizikinė būsena ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės,

▼C1

— cheminio identifikavimo duomenys, įskaitant grynumą.

2.2.2. **Bandomieji gyvūnai:**

— klonas (jei nustatytas jo genotipas), tiekėjas ar šaltinis (jei žinomas) ir taikytos auginimo sąlygos. Jei naudojama ne *Daphnia magna* rūšis, tai turi būti nurodyta ataskaitoje ir pagrįsta.

2.2.3. **Bandymo sąlygos:**

— taikyta bandymo metodika (pvz., pusiau statinis ar dinaminis bandymas, tūris, įkrova ir *Daphnia* skaičius litrui),

— apšvietimo trukmė ir šviesos intensyvumas,

— bandymo schema (pvz., lygiagrečiųjų bandinių skaičius, vieno lygiagrečiojo bandinio motininių gyvūnų skaičius),

— naudotos auginimo terpės detalės,

— organinės medžiagos priedai, jei naudoti, įskaitant sudėtį, šaltinį, ruošimo metodą, pradinių tirpalų TOC/COD, gautų bandymo terpės TOC/COD verčių įvertinimas,

— išsami informacija apie maitinimą, įskaitant kiekį (mg *C/Daphnia*/parai) ir programa (pvz., maisto rūšies (-ių) tipas, įskaitant, jei tai dumbliai, specifinį pavadinimą (rūšį) ir, jei žinomas, štamą, auginimo sąlygas),

— pradinių tirpalų paruošimo metodas ir atnaujinimo dažnumas (tirpiklis ar dispergatorius, jei naudojami, ir jų koncentracija).

2.2.4. **Rezultatai:**

— visų išankstinių bandomosios medžiagos stabilumo tyrimų rezultatai,

— bandomosios koncentracijos vardinės vertės ir medžiagos kiekiui bandymo induose nustatyti analizių rezultatai (žr. 4 priedėlio specifikacijų pavyzdžius); taip pat ataskaitoje pateikiamas metodo regeneravimo našumas ir nustatymo riba,

— vandens kokybė bandymo induose (t. y. pH, temperatūra, ištirpusio deguonies koncentracija, TOC ir (ar) COD bei kietumas, jei tinka) (žr. 3 priedėlio specifikacijos pavyzdį),

— išsamus kiekvieno motininio gyvūno gyvų palikuonių registravimas (žr. 3 priedėlio specifikacijos pavyzdį),

— nugaišusių motininių gyvūnų skaičius ir nugaišimo diena (žr. 3 priedėlio specifikacijos pavyzdį),

— kontrolinių bandinių vaisingumo variacijos koeficientas (pagrįstas bendru gyvų palikuonių skaičiumi, tenkančiu vienam iki bandymo pabaigos gyvam išlikusiam motininiam gyvūnui),

— vienam iki bandymo pabaigos gyvam išlikusiam motininiam gyvūnui tenkančio gyvų palikuonių bendro skaičiaus (kiekvienam lygiagrečiajam bandiniui) ir bandomosios medžiagos koncentracijos grafikas,

— mažiausia pastebimą poveikį reprodukcijai sukelianti koncentracija (LOEC), įskaitant taikytų statistinių metodikų aprašymą ir nurodymą, kokio dydžio poveikis gali būti aptiktas, ir nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC); jei tinka, taip pat turi būti pateikta motininių gyvūnų gaištamumo LOEC/NOEC,

▼C1

— jei tinka, reprodukcijos EC_x ir pasikliovimo intervalai bei jai apskaičiuoti taikyto modelio grafikas, dozės ir atsako kreivės krypties koeficientas ir jos standartinė paklaida,

— kiti stebėti biologiniai rezultatai ar matavimai: pateikiami visi kiti pastebėti ar matuoti biologiniai rezultatai (pvz., motininių gyvūnų augimas), įskaitant bet kurį tinkamą pagrindimą,

— bet kokio nukrypimo nuo bandymo metodo pagrindimas.

3. **NUORODOS**

1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20–21 March 1993.

2) OECD Environmental Health and SAFEty Publications. Series on Testing and Assessment No.6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.

3) Baird D.J., Barber J., Bradley M.C., Soares A.M.V.M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. Ecotoxicology and Environmental SAFEty, 21, 257–265.

4) Elendt B.P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25–33.

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

6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, 775–782.

7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729–88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 pp.

8) Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M.C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H. L0kke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144–148.

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

10) Cowgill U.M. and Milazzo D.P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2), 185–196.

11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.

12) Sims I.R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 2053–2058.

▼C1

13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459–466.

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

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

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

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

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

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

20) Wilson E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

21) Poole R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.

22) Meyer J.S., Ingersoll C.G., McDonald L.L. and Boyce M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156–1166.

▼C1

1 priedėlis

VISIŠKAI APIBRĖŽTŲ ELENDT M7 IR M4 TERPIŲ RUOŠIMAS

Aklimatizavimas *Elendt* M7 ir M4 terpėse

Kai kurios laboratorijos turėjo sunkumų, norėdamos dafnijas pernešti tiesiai į M4 (1) ir M7 terpes. Tačiau šiek tiek pasisekė 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), kuriame yra visi mikroelementai (sudėtinis tirpalas), t. y.:

I pradinis tirpalas (atskira medžiaga)	Į vandenį įdėtas kiekis mg/l	Koncentracija (lyginant su M4 terpe) (kartų)	Ruošiant bendrą II pradinį tirpalą, į vandenį įpilto I pradinio tirpalo tūris ml/l	
			M4	M7
H_3BO_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
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
$Na_2MoO_4 * 2H_2O$	1 260	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
$CuCl_2 * 6H_2O$	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000	1,0	1,0
$Na_2EDTA * 2H_2O$	5 000	2 000	—	—
$FeSO_4 * 7H_2O$	1 991	2 000	—	—

Na_2EDTA ir $FeSO_4$ tirpalai ruošiami atskirai, vėliau supilami kartu ir iškart apdorojami autoklave. Taip gaunamas:

21 Fe-EDTA tirpalas		1 000	20,0	5,0

▼C1

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 (lyginant su M4 terpe) (kartų)	Terpei paruošti įpilto pradinio tirpalo tūris ml/l	
			M4	M7
II pradinis visų mikroelementų tirpalas		20	50	50
Mitybinių makroelementų pradiniai tirpalai (atskira medžiaga)				
$CaCl_2$ * $2H_2O$	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4$ * $7H_2O$	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_2SiO_3 * $9H_2O$	50 000	5 000	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000	0,1	0,1
Vitaminų mišinio pradinis tirpalas	—	10 000	0,1	0,1
Vitaminų mišinio pradinis tirpalas ruošiamas į 1 litrą įdedant tokių šių vitaminų kiekį:				
Tiamino hidrochloridas	750	10 000	—	—
Ciankobalaminas (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 ruošdami galutinę terpę norite išvengti druskų nuosėdų susidarymo, įpilkite alikvotines pradinio tirpalo dalis į maždaug 500–800 ml dejonizuoto vandens ir praskieskite 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.

▼C1

2 priedėlis

BENDROSIOS ORGANINĖS ANGLIES (TOC) ANALIZĖ IR DUMBLIŲ MAISTO TOC KIEKIO NOMOGRAMŲ GAVIMAS

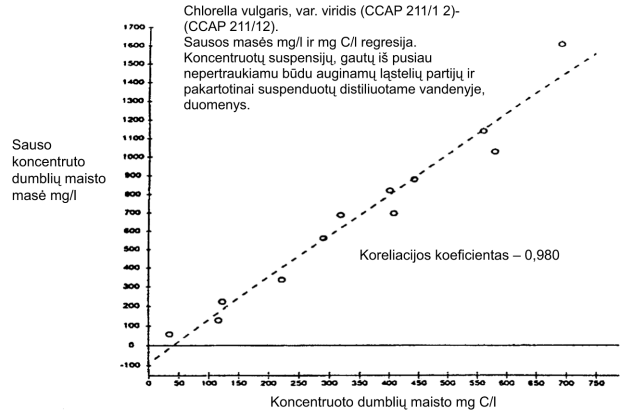
Pripažinta, kad dumblių maisto anglies kiekis tiesioginiu metodu paprastai nematuojamas, bet taikoma jo koreliacija (t. y. nomogramos) su pakeitimo parametrais, pvz., dumblių ląstelių skaičiumi ar šviesos absorbcija.

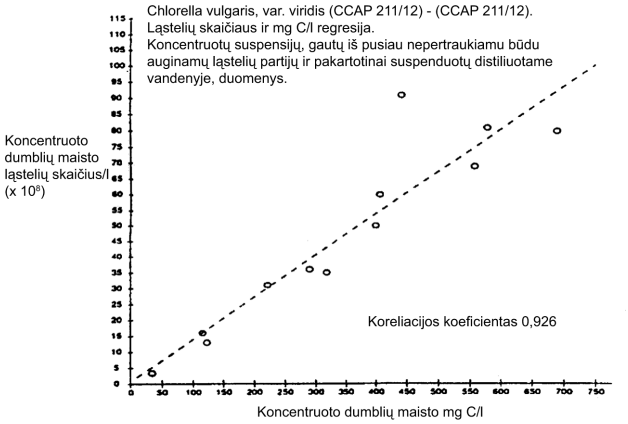
TOC reikėtų matuoti taikant oksidavimo aukštos temperatūros sąlygomis metodą, bet ne UV ar persulfatinį metodą (žr. *The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn*, London WC1V 6HB).

Nomogramai gauti dumbliai ir auginimo terpė atskiriami centrifuguojant, paskui dumbliai vėl suspenduojami distiliuotame vandenyje. Kiekvieno bandinio pakeitimo parametras ir TOC koncentracija matuojami tris kartus. Analizuojami distiliuoto vandens tuštieji bandiniai ir jų TOC koncentracija atimama iš dumblių bandinio TOC koncentracijos.

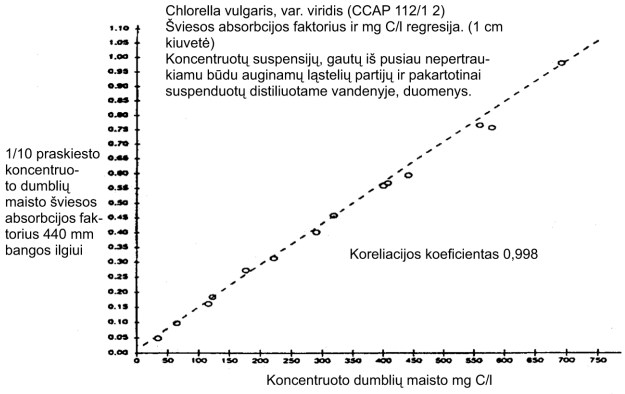
Nomograma nustatytam anglies koncentracijų diapazonui turėtų būti tiesinė. Pavyzdžiai pateikti toliau.

Pastaba. Jų negalima naudoti perskaičiavimams; svarbu, kad laboratorijos turėtų savo darytas nomogramas.





▼C1


Chlorella vulgaris, var. viridis (CCAP 112/1 2)
Šviesos absorbcijos faktorius ir mg C/l regresija. (1 cm kiuvetė)
Koncentruotų suspensijų, gautų iš pusiau nepertraukiamu būdu auginamų ląstelių partijų ir pakartotinai suspenduotų distiliuotame vandenyje, duomenys.
1/10 praskiesto koncentruoto dumblių maisto šviesos absorbcijos faktorius 440 mm bangos ilgiui
Koreliacijos koeficientas 0,998
Koncentruoto dumblių maisto mg C/l

▼C1

3 priedėlis

TERPĖS ATNAUJINIMO, FIZIKOCHEMINIO MONITORINGO, MAITINIMO, DAFNIJŲ REPRODUKCIJOS IR SUAUGUSIŲ GYVŪNŲ GAIŠTAMUMO DUOMENŲ REGISTRAVIMO LENTELĖS PAVYZDYS

Bandymo Nr.:	Pradžios data:				Klonas:			Terpė:				Maisto tipas:					Bandomoji medžiaga:				Vardinė konc.:			
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 ([1])																							naujos	
																							senos	
O_2 mg/l ([1])																							naujos	
																							senos	
Temperatūra °C ([1])																							naujos	
																							senos	
Duota maisto (dėti varnelę)																								
Nėra gyvų palikuonių ([2])																								Bendras
1 indas																								
2																								
3																								
4																								
5																								

2008R0440 — LT — 22.03.2014 — 004.001 — 1124

▼C1

Bandymo Nr.:	Pradžios data:				Klonas:			Terpė:				Maisto tipas:					Bandomoji medžiaga:				Vardinė konc.:			
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																								
																							Bendras	
Bendras suaugusių gyvūnų gaištamumas ([3])																								

([1]) Nurodomas bandymui naudotas indas.
([2]) Registruojamas visų suaugusių gyvūnų giaštamumas, atitinkamame langelyje įrašant „„M““
([3]) Registruojami neapvaisinti kiaušiniai, aitinkamame langelyje įrašant „„AB““

▼C1

4 priedėlis

CHEMINĖS ANALIZĖS REZULTATŲ REGISTRAVIMO LENTELĖS PAVYZDYS

a) **Išmatuotos koncentracijos vertės**

Vardinė konc.	1 savaitės bandinys		2 savaičių bandinys		3 savaičių bandinys	
	Šviežias	Senas	Šviežias	Senas	Šviežias	Senas

b) **Išmatuotos koncentracijos vertės, išreikštos vardinės koncentracijos procentine dalimi**

Vardinė konc.	1 savaitės bandinys		2 savaičių bandinys		3 savaičių bandinys	
	Šviežias	Senas	Šviežias	Senas	Šviežias	Senas

▼C1

5 priedėlis

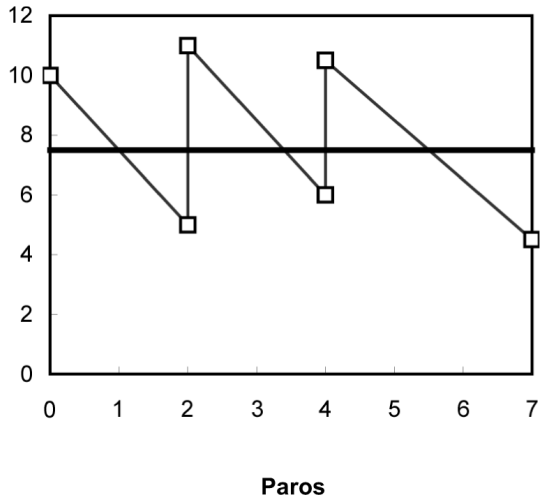
LAIKO SVERTINIO VIDURKIO APSKAIČIAVIMAS

Laiko svertinis vidurkis

Darant prielaidą, kad bandomosios medžiagos koncentracija laikotarpyje tarp terpės atnaujinimų gali mažėti, būtina nustatyti koncentracijos vertę, kuri atspindėtų motinines dafnijas veikiančios medžiagos koncentracijos verčių diapazoną. Pasirinkimas turi būti pagrįstas biologiniais ir statistiniais sumetimais. Pvz., jei manoma, kad reprodukciją labiausiai veikia didžiausia koncentracija, reikia naudoti didžiausios koncentracijos vertę. Tačiau jei svarbesniu laikomas kaupiamasis ar ilgalaikis toksiškos medžiagos poveikis, labiau tinka koncentracijos vidurkis. Šiuo atveju tinkamas naudoti vidurkis yra laiko svertinė vidutinė koncentracijos vertė, nes ją nustatant atsižvelgiama į momentinį koncentracijos kitimą laike.

1 paveikslas

Laiko 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 koncentracijos mažėjimas atitinka irimo pagal eksponentę procesą.

Šeši pažymėti taškai rodo stebimas koncentracijų vertes, išmatuotas kiekvieno atnaujinimo laikotarpio pradžioje ir pabaigoje.

Stora linija rodo laiko svertinio vidurkio padėtį.

Laiko svertinis vidurkis apskaičiuojamas taip, kad plotas po laiko svertinio vidurkio tiese yra lygus plotui po koncentracijos kitimo kreive. Pirmiau pateikto pavyzdžio apskaičiavimas parodytas 1 lentelėje.

▼C1

1 lentelė

Laiko svertinio vidurkio apskaičiavimas

Atnaujinimo Nr.	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
				Bendras parų skaičius: 7	Bendras plotas	50,091
					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“ – plotas po eksponentės kreive kiekvienam atnaujinimo laikotarpiui. Jis apskaičiuojamas:

$$Plotas = \left(\frac{(Conc0 - Conc1)}{(Ln(Conc0) - Ln(Conc1))} \right) \times Paros$$

Laiko svertinis vidurkis („LS vidurkis“) yra „bendro ploto“ ir „bendro parų skaičiaus“ dalmuo.

Savaime aišku, kad darant dafnijų reprodukcijos bandymą lentelė turėtų būti išplėsta 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, atnaujinimo laikotarpio pabaigoje atliekant cheminę analizę, nerandama jokios medžiagos. Jei negalima įvertinti, kaip greitai medžiaga išnyko iš tirpalo, neįmanoma gauti tikrojo ploto po kreive, taigi neįmanoma gauti pagrįsto laiko svertinio vidurkio.

▼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 Viduržemio 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 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 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 Nº 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:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ arba } \ln k = 1nA - \left(\frac{(B)}{(T)}\right)$$

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

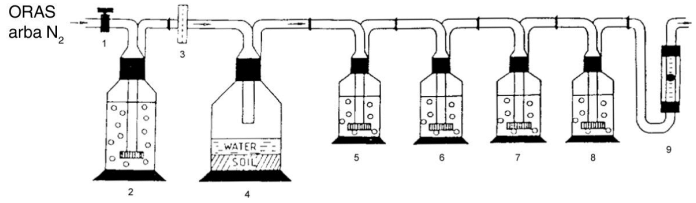
4: medžiagų apykaitos dirvožemyje kolba (vandens įpilama tik anaerobinių ir ryžių laukų dirvožemio sąlygomis)

5: lakiųjų organinių junginių gaudyklė, užpildyta etilenglikoliu

6: lakiųjų šarminių junginių gaudyklė, užpildyta sieros rūgštimi

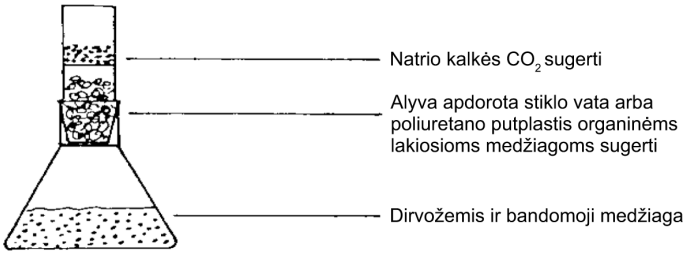
7, 8: CO_2 ir kitų rūgštinių medžiagų gaudyklė, užpildyta natrio šarmu

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 surištuosius 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

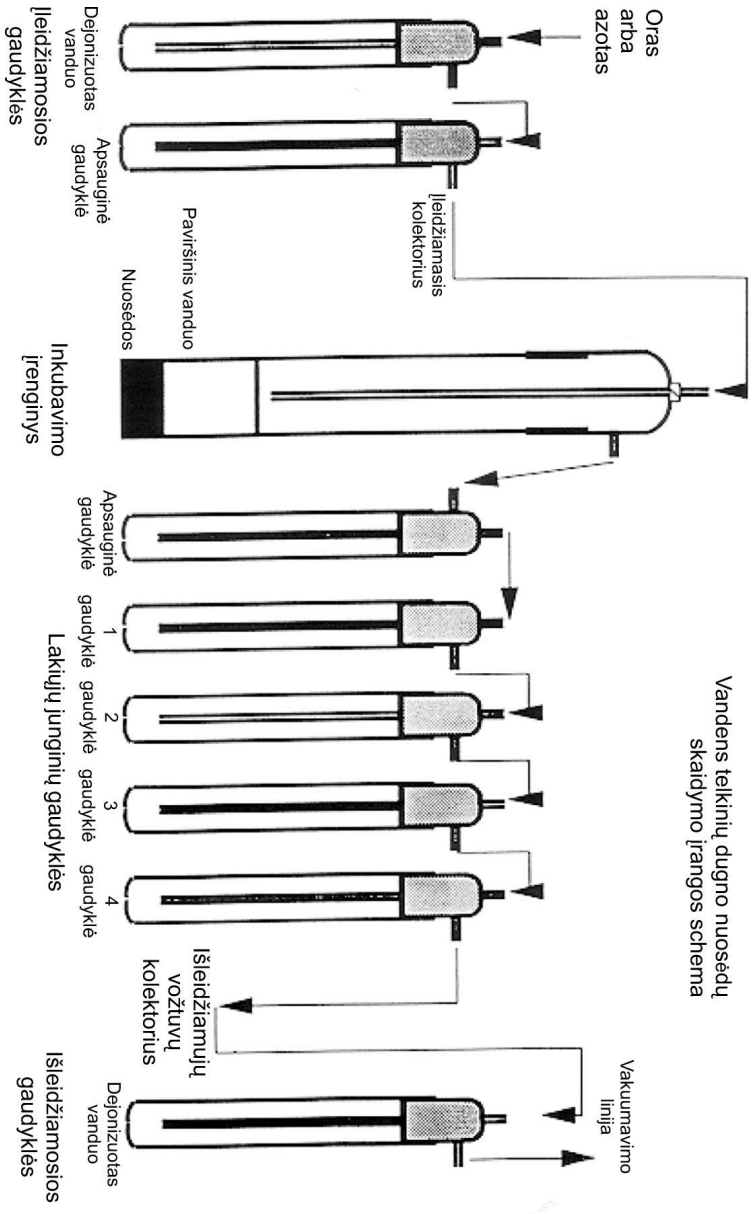
Bandymo naudojant anaerobinę bandymo sistemą metodika iš esmės atitinka metodiką, aprašytą aerobinei sistemai, išskyrus tai, kad virš vandens paviršiaus leidžiamas drėgnas azotas kiekviename inkubavimo įrenginyje pakankamam azoto kiekiui erdvėje virš skysčio užtikrinti. Nuosėdos ir vanduo laikomi anaerobiniais, 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

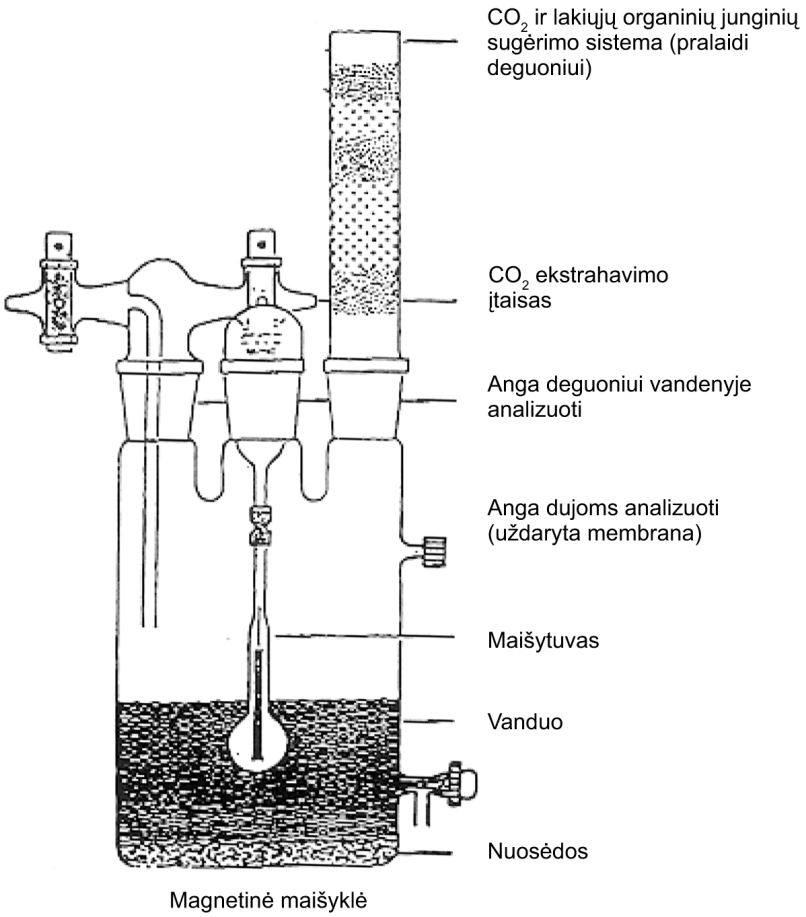


Apsauginė gaudyklė, tuščia
1 gaudyklė – etilenglikolis lakiesiems organiniams junginiams gaudyti
2 gaudyklė – 0,1 mol/l sieros rūgšties lakiesiems šarminiams junginiams gaudyti

▼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 × 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:	= 30,18 µg
12 x 251,5 ÷ 100	
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 $Pa \cdot m^3/mol$ arba < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$), 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 ≥ 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.

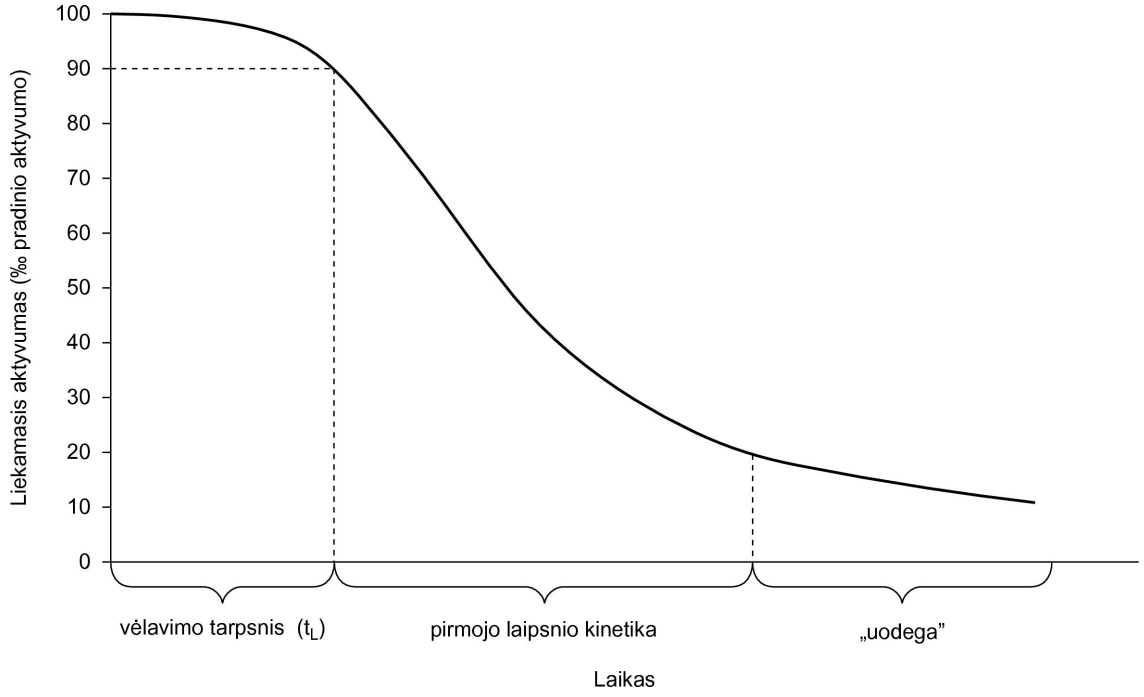
Tiesioginis $^{14}CO_2$ nustatymas

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**

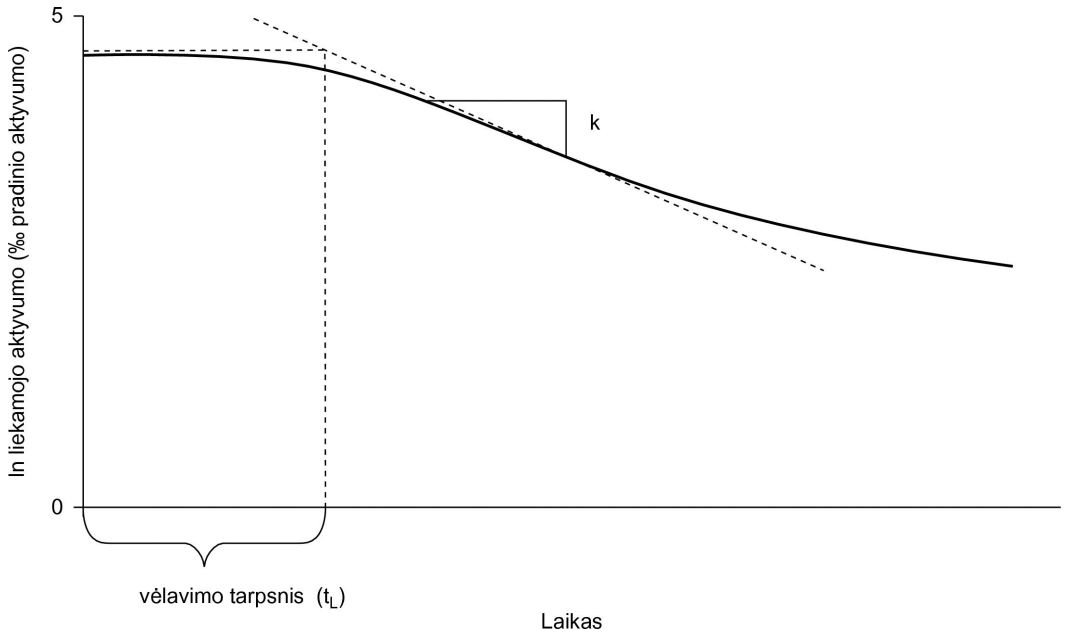
1a paveikslas.

Aritmetinio duomenų grafiko pavyzdys (liekamasis aktyvumas kaip laiko funkcija)



1b paveikslas.

Pusiau logaritminio duomenų grafiko pavyzdys (ln liekamojo aktyvumo kaip laiko funkcija)



▼M1

C.26. *LEMNA* SPP. AUGIMO INHIBAVIMO BANDYMAS

1. METODAS

Šis metodas atitinka OECD TG 221 (2006) (1). Daug ES institucijų sutaria, kad tiriant ryškių spalvų medžiagas *Lemna* bandymas yra tinkama dumblių bandymo alternatyva (2)(3).

1.1. ĮVADAS

Šis bandymo metodas yra skirtas medžiagų toksiškumui genties *Lemna* (plūdena) gėlavandeniams augalams įvertinti. Jis yra pagrįstas esamomis rekomendacijomis (4)(5)(6)(7)(8)(9), bet į jį įtraukti šių metodų pakeitimai, siekiant atsižvelgti į naujus tyrimus ir konsultacijas dėl daugelio pagrindinių problemų. Pasiūlyto metodo tinkamumas buvo patvirtintas atliekant tarptautinį tarplaboratorinį bandymą (10).

Šiame bandymo metode aprašomas toksiškumo bandymas naudojant *Lemna gibba* ir *Lemna minor* rūšis, kurios abi buvo plačiai tiriamos ir yra pirmiau nurodytų standartų tiriamasis objektas. *Lemna* spp. klasifikavimas yra sudėtingas, nes jį apsunkina didelio kiekio fenotipų buvimas. Nors *Lemna* atsakas į toksines medžiagas gali būti genetinis kintamumas, šiuo metu nepakanka duomenų apie šio kintamumo šaltinį, kad šiam bandymui būtų galima rekomenduoti specifinį kloną. Reikėtų pažymėti, kad bandymas nėra atliekamas steriliai, bet atliekant atskiras bandymo pakopas imamasi žingsnių kiek įmanoma sumažinti užkrėtimą kitais organizmais.

Aprašytos bandymo su bandymo tirpalo atnaujinimu (pusiau stacionariojo ir pratekamojo srauto) ir be atnaujinimo (stacionariojo) detalės. Atsižvelgiant į bandymo tikslus ir norminius reikalavimus, rekomenduojama išnagrinėti galimybę taikyti pusiau stacionarųjį ir pratekamojo srauto metodus, pvz., jei medžiagos greit išnyksta iš tirpalo dėl garavimo, fotocheminio skaidymo, nusėdimo arba biologinio skaidymo. Papildomi nurodymai pateikti (11).

1.2. APIBRĖŽTYS

Šiame bandymo metode vartojamos šios apibrėžtys ir santrumpos:

Biomasė: populiaciją sudarančios sausos gyvos medžiagos masė. Šiame bandyme vietoj biomasės paprastai matuojami pakaitiniai parametrai, pvz., gniužulų skaičius arba gniužulų plotas, taigi terminas „biomasė“ taikomas ir šiems pakaitiniams matams.

Chlorozė: gniužulų audinio pageltimas.

Klonas: organizmas arba ląstelė, gauta iš vieno individo nelytinio dauginimosi būdu. Taigi to paties klono individai yra genetiškai tapatūs.

Kolonija: sujungtų moterinių ir dukterinių gniužulų (paprastai nuo 2 iki 4) sankaupa. Kartais vadinama augalu.

▼M1

EC_x: bandymo terpėje ištirpusios bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant *Lemna* augimo greitis per nustatytą veikimo laikotarpį (tiksliai nurodomą, jei nukrypsta nuo visos arba normalios 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 (gniužulų skaičius).

Pratekamojo srauto: bandymas, kurį atliekant bandymo tirpalai keičiami nepertraukiamai.

Gniužulas: atskira (pavienė) plūdenos augalo „lapo formos“ struktūra. Tai yra mažiausiais galintis daugintis vienetas, t. y. individas.

Gumbuotumas: žymi 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 veikimo laikotarpiu.

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 kaip LOEC bandymo koncentracijos vertėms, kenksmingas poveikis turi būti lygus arba didesnis nei poveikis, kuris būtų esant LOEC. Kai negalima įvykdyti šių dviejų sąlygų, turi būti pateiktas išsamus paaiškinimas, kaip buvo pasirinkta LOEC (taigi ir NOEC) vertė.

Matuojami kintamieji: visų tipų kintamieji, kurie yra matuojami bandymo rezultatui išreikšti, naudojant vieną arba daugiau skirtingų atsako kintamųjų. Šiame metode matuojami kintamieji yra gniužulų skaičius, gniužulų plotas, šviežios medžiagos masė ir sausos medžiagos masė.

Monokultūra: vienos rūšies augalų kultūra.

Nekrozė: žuvęs (t. y. baltas arba vandens persisunkęs) gniužulų audinys.

Nestebimo poveikio koncentracija (NOEC): vos mažesnė nei LOEC bandymo koncentracija.

Fenotipas: stebimos organizmo charakteristikos, nustatomos pagal jo genų sąveiką su aplinka.

Atsako kintamieji: toksiškumui įvertinti naudojami kintamieji, gauti pagal bet kurį nors iš matuojamų kintamųjų, skirtingais apskaičiavimo metodais apibūdinančių biomasę. Šiame metode iš matuojamų kintamųjų gauti atsako kintamieji yra gniužulų skaičius, gniužulų plotas, šviežios medžiagos masė arba sausos medžiagos masė.

Pusiau stacionarusis (atnaujinimo) bandymas: bandymas, kurį atliekant bandymo tirpalas periodiškai keičiamas po tam tikro laiko tarpo.

Stacionarusis bandymas: bandymas, kurį atliekant bandymo tirpalas neatnaujinamas.

▼M1

Bandymo rezultatas: aprašo bendrąjį veiksnį, kurį siekiama pakeisti palyginti su kontroliniu ėminiu, veikiant bandomąja chemine medžiaga. Šiame bandymo metode bandymo rezultatas yra augimo inhibavimas, kuris gali būti išreikštas skirtingais atsako kintamaisiais, pagrįstais vienu arba daugiau matuojamųjų kintamųjų.

Bandymo terpė: visiškai paruošta sintetinė kultūros terpė, kurioje auga bandomosios medžiagos veikiami bandymo augalai. Bandomoji medžiaga paprastai tirpinama bandymo terpėje.

Išeiga: matuojamo kintamojo vertė biomasės skirtumui veikimo laikotarpio pabaigoje ir pradžioje išreikšti.

1.3. BANDYMO ESMĖ

Pagal eksponentės dėsnį augančios *Lemna* genties augalų kultūros septynių parų laikotarpiu auginamos kaip monokultūra esant skirtingoms bandomosios medžiagos tirpalo koncentracijos vertėms. Bandymo tikslas – su medžiaga susijusių poveikių vegetatyviniam augimui šiuo laikotarpiu kiekybinis įvertinimas, pagrįstas pasirinktų matuojamų kintamųjų įvertinimu. Gniužulų skaičius yra pagrindinis matuojamas kintamasis. Be to, nustatomas dar bent vienas kitas matuojamas kintamasis (suminis gniužulų plotas, sausos medžiagos masė arba šviežios medžiagos masė), kadangi kitus matuojamus kintamuosius kai kurios medžiagos gali veikti labiau nei gniužulų skaičių. Norint kiekybiškai įvertinti su medžiaga susijusius poveikius, augimas bandymo tirpaluose yra lyginamas su augimu kontroliniuose ėminiuose ir nustatoma apibrėžtą augimo greičio mažėjimą x % (pvz., 50 %) sukelianti koncentracija, kuri išreiškiama EC_x (pvz., EC_{50}).

Bandymo rezultatas yra augimo inhibavimas, išreiškiamas kaip logaritminis matuojamo kintamojo padidėjimas (vidutinis savitasis augimo greitis) veikimo laikotarpiu. Pagal bandymo tirpalų serijoje gautus vidutinius savituosius augimo greičius nustatoma apibrėžtą augimo greičio mažėjimą x % (pvz., 50 %) sukelianti koncentracija, kuri išreiškiama E_rC_x (pvz., E_rC_{50}).

Šiame metode taikomas papildomas atsako kintamasis – išeiga, kuris gali būti reikalingas kai kurių valstybių nustatytiems specifiniams norminiams reikalavimams įvykdyti. Jis yra apibrėžiamas kaip biomasės veikimo laikotarpio pabaigoje ir pradžioje skirtumas. Pagal bandymo tirpalų serijoje gautą išeigą apskaičiuojama apibrėžtą išeigos mažėjimą x % (pvz., 50 %) sukelianti koncentracija, kuri išreiškiama E_yC_x (pvz., E_yC_{50}).

Be to, galima statistiškai nustatyti mažiausią stebimo poveikio koncentraciją (LOEC) ir nestebimo poveikio koncentraciją (NOEC).

1.4. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

Turėtų būti atitinkamo jautrio analizės metodas medžiagos kiekiui bandymo terpėje kiekybiškai nustatyti.

▼M1

Informaciją apie bandomąją medžiagą, kuri gali būti naudinga bandymo sąlygoms nustatyti, sudaro struktūrinė formulė, grynumas, tirpumas vandenyje, patvarumas veikiant vandeniui ir šviesai, pK_a, K_{ow}, garų slėgis ir biologinis skaidumas. Tirpumas vandenyje ir garų slėgis gali būti naudojamas Henrio dėsnio konstantai apskaičiuoti, kuri rodytų, ar atliekant bandymą yra tikimybė prarasti didelį bandomosios medžiagos kiekį. Tai padėtų nustatyti, ar reikėtų imtis konkrečių priemonių tokiems nuostoliams kontroliuoti. Jei duomenys apie bandomosios medžiagos tirpumą ir patvarumą yra abejotini, šias savybes rekomenduojama įvertinti bandymo sąlygomis, t. y. bandymui naudotos auginimo terpės, temperatūros, apšvietimo režimo sąlygomis.

Jei yra ypač svarbu kontroliuoti bandymo terpės pH vertę, pvz., kai bandomi metalai arba vandenyje nepatvarios medžiagos, į auginimo terpę rekomenduojama įpilti buferinio tirpalo (žr. 1.7.4 skirsnio pirmąją pastraipą). Papildomi nurodymai, kaip bandyti medžiagas, kurių fizikinės cheminės savybės apsunkina jų bandymus, yra pateikti (11) nuorodoje.

1.5. ETALONINĖ MEDŽIAGA

Kaip priemonė bandymo procedūrai patikrinti gali būti bandoma (-os) etaloninė (-ės) medžiaga (-os), pvz., 3,5-dichlorfenolis, naudotas tarptautiniame tarplaboratoriniame bandyme (10). Patartina etaloninę medžiagą bandyti bent du kartus per metus arba lygiagrečiai bandomosios medžiagos toksiškumo nustatymui, jei bandymai atliekami rečiau.

1.6. BANDYMO TINKAMUMAS

Kad bandymas būtų tinkamas, gniužulų skaičiaus kontroliniuose ėminiuose dvigubėjimo trukmė turi būti trumpesnė kaip 2,5 paros (60 h), atitinkanti padidėjimą maždaug septynis kartus per septynias paras ir vidutinį savitąjį augimo greitį 0,275 d^{-1}. Šiame bandymo metode aprašytomis terpių ir bandymo sąlygomis šį kriterijų galima pasiekti atliekant stacionarųjį bandymą (8). Be to, tikimasi, kad šį kriterijų bus galima pasiekti pusiau stacionariojo ir pratekamojo srauto bandymo sąlygomis. Dvigubėjimo trukmės apskaičiavimas pateiktas 2.1 skirsnyje.

1.7. METODO APRAŠYMAS

1.7.1. **Aparatūra**

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 platūs, kad skirtingų kolonijų gniužulai kontrolinių ėminių induose galėtų augti nesant sanklotos bandymo pabaigoje. Neturi reikšmės, jei šaknys liečia bandymo indų dugną, bet patartina naudoti ne mažesnio kaip 20 mm gylio ir 100 ml tūrio indus. Nesvarbu kokio tipo bandymo indai pasirenkami, jei jie atitinka šiuos reikalavimus. Tinka atitinkamų matmenų cheminės stiklinės, kristalizatoriai arba stiklinės *Petri* lėkštelės. Bandymo indai turi būti uždengti garavimui ir atsitiktiniam užteršimui sumažinti, bet tuo pat metu turi užtikrinti būtinus oro mainus. Tinkami bandymo indai ir ypač dangčiai neturi mesti šešėlių arba pakeisti šviesos spektrines charakteristikas.

▼M1

Kultūros ir bandymo indai neturėtų būti laikomi kartu. Geriausia tai būtų pasiekti naudojant atskiras klimatines auginimo kameras, inkubatorius arba patalpas. Turi būti įmanoma kontroliuoti ir užtikrinti pastovaus lygio apšvietimą ir temperatūrą (žr. 1.7.8 skirsnį).

1.7.2. **Bandymo organizmas**

Šiam bandymui naudojamas organizmas yra *Lemna gibba* arba *Lemna minor*. Toksiškumo bandymui naudojamų plūdenų rūšių trumpas aprašymas pateiktas 1 priedėlyje. Augalinė medžiaga gali būti gauta iš kultūros rinkinio, kitos laboratorijos arba iš lauko. Jei kultūra renkama lauke, kultūrai auginami augalai bent aštuonias savaites prieš bandymą turėtų būti laikomi toje pačioje terpėje, kuri naudojama bandymams. Pradinėms kultūroms rinkti naudojamose lauko vietose neturi būti akivaizdžių užkrėtimo šaltinių. Jei kultūros gaunamos iš kitos laboratorijos arba iš kultūros rinkinio, jos turėtų būti panašiai laikomos bent tris savaites. Ataskaitoje turėtų būti visuomet nurodytas bandymui naudojamos augalinės medžiagos šaltinis, rūšis ir klonas (jei žinomas).

Turėtų būti naudojamos monokultūros, kurios neturėtų aiškiai matomų užkrėtimo kitais organizmais, pvz., dumbliais ir pirmuonimis, požymių. Sveikus *L. minor* augalus sudaro kolonijos, turinčios nuo dviejų iki penkių gniužulų, tuo tarpu sveikas *L. gibba* kolonijas gali sudaryti iki septynių gniužulų.

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). Geros kokybės kultūros požymis – didelis skaičius kolonijų, kurias sudarytų bent du gniužulai. Didelis vieno gniužulo kolonijų skaičius rodo aplinkos sukeltą stresą, pvz., dėl riboto mitybinių medžiagų kiekio, ir tokių kultūrų augalinė medžiaga bandymams neturėtų būti naudojama.

1.7.3. **Auginimas**

Norint sumažinti kultūros priežiūros dažnumą (pvz., kai tam tikrą laikotarpį nesiruošiama atlikti bandymų su *Lemna*), kultūras galima laikyti sumažinto apšvietimo ir temperatūros (4–10 °C) sąlygomis. Kultūros auginimo detalės pateiktos 2 priedėlyje. Esant akivaizdiems užkrėtimo dumbliais arba kitais organizmais požymiams, turėtų būti atliekamas *Lemna* gniužulų dalinių ėminių paviršinis sterilizavimas, juos vėliau pernešant į naujai paruoštą terpę (žr. 2 priedėlį). Jei taip atsitinka, likusi užkrėsta kultūra turėtų būti pašalinta.

Bent septynios paros prieš bandymą pakankamas skaičius kolonijų steriliu būdu pernešamas į naują sterilią terpę, kurioje kultūra 7–10 parų auginama bandymo sąlygomis.

1.7.4. **Bandymo terpė**

Lemna minor ir *Lemna gibba* rekomenduojamos skirtingos terpės, kaip aprašyta toliau. Reikėtų labai kruopščiai išnagrinėti pH reguliuoti skirto buferinio tirpalo (MOPS (4-morfolinpropansulfonrūgšties, CAS Nr. 1132–61–2; EINECS Nr. 214–478–5) *L. minor* terpėje ir $NaHCO_3$ *L. gibba* terpėje) naudojimą bandymo terpėje, jei kyla įtarimų, kad jis gali reaguoti su bandomąja medžiaga ir gali veikti jos toksiškumo pasireiškimą. Be to, priimtina *Steinbergo* terpė (12), jei ji atitinka bandymo tinkamumo kriterijus.

▼M1

L. minor auginti ir bandyti rekomenduojama modifikuota Švedijos standarto (SIS) *Lemna* auginimo terpė. Šios terpės sudėtis pateikta 3 priedėlyje.

L. gibba auginti ir bandyti rekomenduojama auginimo terpė 20X – AAP, aprašyta 3 priedėlyje.

Be to, *L. minor* tinka *Steinbergo* terpė, aprašyta 3 priedėlyje, bet ji gali būti naudojama ir *L. gibba* auginti, jei atitinka bandymo tinkamumo kriterijus.

1.7.5. **Bandymo tirpalai**

Bandymo tirpalai paprastai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Bandomosios medžiagos pradiniai tirpalai dažniausiai ruošiami tirpinant medžiagą auginimo terpėje.

Didžiausia bandyta bandomosios medžiagos koncentracija paprastai neturėtų būti didesnė nei medžiagos tirpumą bandymo sąlygomis atitinkanti koncentracija. Tačiau reikėtų pažymėti, kad *Lemna* spp. plaukia paviršiumi ir gali būti veikiama medžiagų, kurios kaupiasi vandens ir oro sąlyčio paviršiuje (pvz., mažai vandenyje tirpių, hidrofobinių arba paviršinio aktyvumo medžiagų). Tokiomis aplinkybėmis veikia kitos nei tirpale esančios medžiagos ir bandymo koncentracijos vertės, atsižvelgiant į bandomosios medžiagos charakteristikas, gali būti didesnės nei tirpumo vandenyje vertė. Jei bandomosios medžiagos mažai tirpsta vandenyje, koncentruotą pradinį tirpalą arba medžiagos dispersiją gali tekti ruošti naudojant organinį tirpiklį arba dispergentą, kad būtų lengviau įdėti tikslius bandomosios 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., įprastų tirpiklių, kurie nesukelia fitotoksiškumo, kai jų koncentracija ne didesnė nei 100 $\mu l \cdot l^{-1}$, sąraše yra acetonas ir dimetilformamidas. Jei naudojamas tirpiklis arba dispergentas, jo galutinė koncentracija turėtų būti nurodyta ataskaitoje ir būti kiek įmanoma mažesnė ($\leq$ 100 $\mu l \cdot l^{-1}$), be to, visuose apdorotuose ir kontroliniuose ėminiuose turėtų būti vienoda tirpiklio arba dispergento koncentracija. Papildomi nurodymai dėl dispergentų naudojimo pateikti (11).

1.7.6. **Bandymo ir kontrolinių ėminių grupės**

Išankstiniai bandomosios medžiagos toksiškumo *Lemna* duomenys, pvz., intervalo nustatymo bandymo, padėtų pasirinkti tinkamas bandymo koncentracijos vertes. Atliekant galutinį toksiškumo nustatymo bandymą, turėtų būti pasirinktos bent penkios koncentracijos vertės, išdėstytos pagal geometrinę progresiją. Pageidautina, kad gretimų bandymo koncentracijos verčių santykis būtų ne didesnis kaip 3,2, bet ši vertė gali būti didesnė, jei koncentracijos ir atsako santykio kreivė yra gulsčia. Reikėtų pagrįsti mažesnio nei penkių koncentracijos verčių skaičiaus naudojimą. Kiekvienai koncentracijai turėtų būti naudojami bent trys kartotiniai ėminiai.

Nustatant bandymo koncentracijos verčių intervalą (intervalo nustatymo ir (arba) galutinio toksiškumo bandymo), reikėtų atsižvelgti į šias aplinkybes:

▼M1

— Norint nustatyti EC_x vertę, ji turėtų būti tarp bandymo koncentracijos verčių reikiamam pasikliautinumo lygmeniui 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, atitinkami pasikliautinieji intervalai bus dideli ir gali būti neįmanomas tinkamas statistinio modelio atitikimo įvertinimas.

— Jei reikia įvertinti LOEC/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, 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 $mg \cdot l^{-1}$).

Atliekant kiekvieną bandymą turėtų būti kontroliniai ėminiai, kuriuos sudarytų ta pati kaip ir bandymo induose mitybinė terpė, tas pats gniužulų ir kolonijų skaičius, tos pačios aplinkos sąlygos ir procedūros, tik nebūtų bandomosios medžiagos. Jei naudojamas pagalbinis tirpiklis arba dispergentas, turėtų būti įtrauktas papildomas kontrolinis ėminys, turintis tirpiklio (dispergento), kurio koncentracija atitiktų naudojamą induose su bandomąja medžiaga. Būtų gerai, jei kartotinių kontrolinių ėminių indų skaičius (ir tirpiklio indų, jei naudojamas) būtų bent du kartus didesnis nei kiekvienai bandymo koncentracijai naudojamų indų skaičius.

Jei nereikia nustatyti NOEC, bandymo schema gali būti pakeista padidinant koncentracijos verčių skaičių ir sumažinant kiekvienos bandymo koncentracijos kartotinių ėminių skaičių. Tačiau kartotinių kontrolinių ėminių skaičius turi būti ne mažesnis kaip trys.

1.7.7. **Veikimas**

Kolonijos, sudarytos iš 2–4 matomų gniužulų paimamos iš sėjimo kultūros indo ir steriliomis sąlygomis atsitiktinai paskirstomos tarp bandymo indų. Kiekviename inde turėtų būti iš viso 9–12 gniužulų. Kiekviename bandymo inde turėtų būti vienodas gniužulų ir kolonijų skaičius. Patyrimas, sukauptas taikant šį metodą, ir tarplaboratorinio tyrimo duomenys parodė, kad naudojant tris kartotinius vienos koncentracijos ėminius, kurių kiekviename iš pradžių būtų 9–12 gniužulų, pakanka aptikti skirtumus tarp apdorotų ėminių augimo, esant 4–7 % inhibavimui, apskaičiuotam pagal augimo greitį (10–15 %, apskaičiuotam pagal išeigą) (10).

Reikia taikyti atsitiktinio bandymo indų išdėstymo inkubatoriuje schemą, siekiant kiek įmanoma sumažinti padėties erdvėje, šviesos intensyvumo arba temperatūros skirtumų įtaką. Be to, atliekant stebėjimus reikia taikyti blokinę schemą arba atsitiktinį indų padėties keitimą (arba dažniau keisti padėtį).

▼M1

Jei išankstinis patvarumo bandymas rodo, kad neįmanoma užtikrinti bandomosios medžiagos koncentracijos (t. y. išmatuotoji koncentracija sumažėja iki mažiau kaip 80 % išmatuotos pradinės koncentracijos) visą bandymo trukmę (7 paras), rekomenduojamas pusiau stacionarusis bandymo režimas. Šiuo atveju kolonijoms veikti naudojami bandymo ir kontrolinių ėminių tirpalai turėtų būti keičiami naujais bent du kartus per bandymą (pvz., 3 ir 5 parą). Dažnis, kuriuo terpė keičiama į naują, priklausys nuo bandomosios medžiagos patvarumo; dažniau gali tekti keisti labai nepatvarių arba lakių medžiagų tirpalus, siekiant užtikrinti beveik pastovias koncentracijos vertes. Kai kuriomis aplinkybėmis gali tekti taikyti pratekamojo srauto procedūrą (11)(13).

Veikimo per lapus (purškiant) scenarijus pagal šį bandymo metodą netaikomas, vietoj to žr. (14).

1.7.8. **Inkubavimo sąlygos**

Siekiant užtikrinti šviesos intensyvumą, pasirenkamą 85–135 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (atitinka 6 500–10 000 liuksų) intervale, kai optimalų fotosintezės diapazoną atitinkanti spinduliuotė (400–700 nm) matuojama tokiu pat atstumu nuo šviesos šaltinio, kaip ir *Lemna* gniužulai, turėtų būti naudojama nuolatinė šiltai arba šaltai balta liuminescencinių lempų šviesa. Šviesos intensyvumas virš bandymo vietos neturi kisti daugiau kaip ± 15 % pasirinkto šviesos intensyvumo. Išmatuotą vertę veiks šviesos aptikimo ir matavimo metodas, ypač jutiklio tipas. Sferiniai jutikliai (kurie reaguoja į šviesą, krintančią visais kampais virš ir žemiau matavimo plokštumos) ir „kosinusiniai“ jutikliai (kurie reaguoja į šviesą, krintančią visais kampais virš matavimo plokštumos) yra geresni nei vienos krypties jutikliai, ir šiame bandyme aprašytam daugiataškio šviesos šaltinio tipui bus gaunami didesni rodmenys.

Temperatūra bandymo induose turėtų būti 24 ± 2 °C. Bandymo metu kontrolinių ėminių terpės pH neturėtų padidėti daugiau kaip 1,5 vieneto. Tačiau didesnis nei 1,5 vieneto nuokrypis nepaneigtų bandymo tinkamumo, jei būtų galima įrodyti, kai tinkamumo kriterijai yra vykdomi. Reikia imtis papildomų atsargumo priemonių dėl pH kitimo specialiais atvejais, pvz., bandant nepatvarias medžiagas arba metalus. Papildomi nurodymai pateikti (11).

1.7.9. **Trukmė**

Bandymas baigiamas praėjus 7 paroms nuo augalų pernešimo į bandymo indus.

1.7.10. **Matavimai ir analiziniai nustatymai**

Bandymo pradžioje suskaičiuojamas ir užrašomas gniužulų skaičius bandymo induose, imantis priemonių užtikrinti, kad būtų įskaityti atsikišę, aiškiai matomi gniužulai. Gniužulų skaičius, ar jis būtų normalus arba nenormalus, turi būti nustatytas bandymo pradžioje, bent kartą kas 3 paras veikimo laikotarpiu (t. y. bent 2 kartus 7 parų laikotarpiu) ir bandymo pabaigoje. Turėtų būti pažymėti augalų vystymosi pokyčiai, pvz., gniužulų dydžio, išvaizdos, nekrozės požymiai, chlorozė arba gumbuotumas, kolonijų smulkėjimas arba plūdrumo netekimas, šaknų ilgis ir išvaizda. Be to, reikėtų pažymėti reikšmingas bandymo terpės savybes (pvz., neištirpusios medžiagos buvimą, dumblių augimą bandymo inde).

▼M1

Be gniužulų skaičiaus nustatymo bandymo eigoje, dar įvertinamas bandomosios medžiagos poveikis vienam (arba daugiau) iš šių matuojamų kintamųjų:

(i) suminiam gniužulų plotui;

(ii) sausos medžiagos masei;

(iii) šviežios medžiagos masei.

Suminio gniužulų ploto pranašumas – jį galima nustatyti kiekviename bandymo ir kontrolinio ėminio inde bandymo pradžioje, jo eigoje ir pabaigoje. Sausos arba šviežios medžiagos masė turėtų būti nustatyta bandymo pradžioje, imant sėjimo kultūros ėminį, atitinkantį bandymo pradžioje naudojamą kultūrą, ir bandymo pabaigoje, imant augalinę medžiagą iš kiekvieno bandymo ir kontrolinio ėminio indo. Jei gniužulų plotas nematuojamas, geriau matuoti sausos medžiagos masę, bet ne šviežios medžiagos masę.

Suminis gniužulų plotas, sausos medžiagos masė ir šviežios medžiagos masė gali būti nustatyta taip:

i) *Suminis gniužulų plotas*: Visų kolonijų suminis gniužulų plotas gali būti nustatytas atliekant vaizdų analizę. Bandymo indo ir augalų siluetas gali būti fiksuojamas vaizdo kamera (t. y. pastačius indą ant šviesos dėžės) ir gautas vaizdas apdorojamas skaitmeniniu būdu. Vėliau kalibruojant pagal plokščius žinomo ploto vaizdus, gali būti nustatytas suminis gniužulų plotas. Reikėtų imtis priemonių indo krašto sukeltiems trukdžiams pašalinti. Taikant kitą daugiau darbo reikalaujantį metodą, daroma bandymo indų ir augalų fotokopija, išpjaunamas gautas kolonijų siluetas ir jų plotas nustatomas lapų ploto analizatoriumi arba naudojant milimetrinį popierių. Be to, gali tikti kiti metodai (pvz., kolonijų silueto ploto ir vienetinio ploto popieriaus masės santykis).

(ii) *Sausos medžiagos masė*: Visų bandymo indų visos kolonijos surenkamos ir plaunamos distiliuotu arba dejonizuotu vandeniu. Sausinamos sugeriamuoju popieriumi vandens pertekliui pašalinti ir džiovinamos 60 °C temperatūroje iki pastovios masės. Turėtų būti įskaityti visi šaknų likučiai. Sausos medžiagos masė turėtų būti išreikšta bent 0,1 mg tikslumu.

(iii) *Šviežios medžiagos masė*: Visos kolonijos surenkamos į iš anksto pasvertus polistireno (arba kitos inertinės medžiagos) mėgintuvėlius su mažomis (1 mm) skylutėmis užapvalintuose dugnuose. Mėgintuvėliai 10 min centrifuguojami 3 000 min^{-1} apsisukimų dažniu, esant kambario temperatūrai. Mėgintuvėliai su sausomis kolonijomis sveriami iš naujo ir šviežios medžiagos masė apskaičiuojama atimant tuščio mėgintuvėlio masę.

1.7.10.1. *Matavimų ir analizinių nustatymų dažnis*

Jei taikoma stacionariojo bandymo schema, kiekvieno apdoroto ėminio pH vertė turėtų būti matuojama bandymo pradžioje ir pabaigoje. Jei taikoma pusiau stacionariojo bandymo schema, turėtų būti matuojama kiekvienos naujos bandymo tirpalo dalies pH vertė prieš kiekvieną atnaujinimą ir dar atitinkamo panaudoto tirpalo pH vertė.

▼M1

Šviesos intensyvumas turėtų būti matuojamas tose auginimo kameros, inkubatoriaus arba patalpos vietose, kurios nuo šviesos šaltinio nutolusios tokiu pat atstumu kaip ir *Lemna* gniužulai. Matuojama bent vieną kartą bandymo laikotarpiu. Terpės temperatūra pakaitiniame inde, kuris laikomas tokioms pačiomis auginimo kameros, inkubatoriaus arba patalpos sąlygomis, turėtų būti užrašoma bent kartą per dieną.

Bandomosios medžiagos koncentracijos vertės yra nustatomos bandymo eigoje atitinkamais laiko tarpais. Mažiausias reikalavimas atliekant stacionariuosius bandymus yra koncentracijos matavimas bandymo pradžioje ir pabaigoje.

Atliekant pusiau stacionariuosius bandymus, kai nelaukiama, kad bandomosios medžiagos koncentracija nesikeis daugiau kaip ± 20 % palyginti su vardine koncentracija, būtina analizuoti visus naujai paruoštus bandymo tirpalus ir pačius atnaujintus tirpalus kiekvieno atnaujinimo momentu (žr. 1.7.7 skirsnio trečiąją pastraipą). Tačiau atliekant tuos bandymus, kurių išmatuota pradinė bandomosios medžiagos koncentracija neatitinka vardinės ± 20 % tikslumu, bet apie kuriuos 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. Visais atvejais bandomosios medžiagos koncentraciją reikia nustatyti tik viename kiekvienos bandymo koncentracijos kartotinio ėminio inde (arba analizuoti sujungtų kartotinių ėminių turinį).

Jei atliekamas pratekamojo srauto bandymas, tinka ėminių ėmimo režimas, taikomas aprašytiems pusiau stacionariesiems bandymams, įskaitant analizę bandymo pradžioje, pusiaukelėje ir bandymo pabaigoje, bet šiuo atveju nereikia matuoti panaudotų tirpalų koncentracijos. Atliekant šio tipo bandymus, skiediklio ir bandomosios medžiagos tirpalo arba bandomosios medžiagos pradinio tirpalo srautas turėtų būti tikrinamas kasdien.

Jei yra duomenų, kad visą bandymą bandomosios medžiagos koncentracijos kitimas buvo patenkinamas ir ne didesnis kaip ± 20 % vardinės arba išmatuotos pradinės koncentracijos vertės, rezultatų analizę galima atlikti pagal vardinę arba išmatuotą pradinę vertę. Jei nuokrypis nuo vardinės arba išmatuotos pradinės koncentracijos yra didesnis kaip ± 20 %, rezultatų analizė turėtų būti atliekama pagal veikimo laikotarpio geometrinio vidurkio koncentraciją arba taikant modelius, aprašančius bandomosios medžiagos koncentracijos mažėjimą (11).

1.7.11. **Ribinis bandymas**

Kai kuriomis aplinkybėmis, pvz., kai pradinis bandymas rodo, kad bandomosios medžiagos toksinis poveikis nepasireiškia esant mažesnei kai 100 $mg \cdot l^{-1}$ arba tirpumą bandymo terpėje atitinkančiai koncentracijai (kuri būtų mažesnė), galima atlikti ribinį bandymą, kuriame būtų lyginami kontrolinės grupės ir vienos apdorotų ėminių grupės (100 $mg \cdot l^{-1}$ arba tirpumo vertei lygi koncentracija) atsakai. Labai rekomenduojama, kad jis būtų patvirtintas atliekant veikimo koncentracijos analizę. Labai rekomenduojama, kad jis būtų patvirtintas analizuojant veikiančios medžiagos koncentraciją. Ribiniam bandymui taikomos visos anksčiau aprašytos bandymo sąlygos ir tinkamumo kriterijai, išskyrus tai, kad kartotinių apdorotų ėminių turėtų būti du kartus daugiau. Vidurkiams palyginti augimas kontrolinių ir apdorotų ėminių grupėse gali būti analizuojamas taikant statistinį kriterijų, pvz., Stjudento *t* kriterijų.

▼M1

2. **DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS**

2.1. DVIGUBĖJIMO TRUKMĖ

Norint nustatyti gniužulų skaičiaus dvigubėjimo trukmę (T_d) ir tyrimo atitiktį šiam tinkamumo kriterijui (1.6 skirsnis), gautiems kontrolinių ėminių duomenims taikoma ši formulė:

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

kurioje μ yra vidutinis savitasis augimo greitis, nustatytas kaip aprašyta 2.2.1 skirsnio pirmojoje ir antrojoje pastraipoje.

2.2. ATSAKO KINTAMIEJI

Bandymo tikslas – nustatyti bandomosios medžiagos poveikį *Lemna* vegetatyviniam augimui. Šiame bandymo metode aprašyti du atsako kintamieji, nes valstybės narės juos skirtingai vertina ir skiriasi norminiai reikalavimai. Siekiant užtikrinti rezultatų priimtinumą visose valstybėse narėse, poveikis turėtų būti įvertintas taikant abu toliau aprašytus atsako kintamuosius a ir b.

a) Vidutinis savitasis augimo greitis: šis atsako kintamasis yra apskaičiuojamas pagal kontrolinių ėminių ir kiekvienos apdorotų ėminių grupės gniužulų skaičiaus logaritmo ir papildomai kitų matuojamų parametrų (suminio gniužulų ploto, sausos medžiagos masės arba šviežios medžiagos masės) logaritmo pokytį per laiką (išreiškiamą para). Jis kartais vadinamas santykiniu augimo greičiu (15).

b) Išeiga: šis atsako kintamasis yra apskaičiuojamas pagal kontrolinių ėminių ir kiekvienos apdorotų ėminių grupės gniužulų skaičiaus ir papildomai kitų matuojamų parametrų (suminio gniužulų ploto, sausos arba šviežios medžiagos masės) pokytį bandymo laikotarpiu.

Reikėtų pažymėti, kad nėra lygintinos toksiškumo vertės, apskaičiuotos taikant šiuos du kintamuosius, ir šis skirtumas turi būti suvoktas naudojant bandymo rezultatus. Dėl atitinkamų metodų matematinio pagrindo, savitojo augimo greičio vidurkiu pagrįstos EC_x vertės (E_rC_x), paprastai bus didesnės nei išeiga pagrįsti rezultatai (E_yC_x), jei laikomasi šio bandymo metodo sąlygų. Tai neturėtų būti interpretuojama kaip dviejų atsako kintamųjų jautrio skirtumas, tiesiog vertės skiriasi matematiškai. Vidutinio savitojo augimo greičio sąvoka pagrįsta bendrąja plūdenų eksponentinio augimo neribojamose kultūrose schema, kurią taikant toksiškumas įvertinamas pagal poveikį augimo greičiui, kuris nepriklauso nuo kontroliniams ėminiams gauto absoliutaus savitojo augimo greičio lygio, koncentracijos ir atsako kreivės krypties koeficiento arba nuo bandymo trukmės. Priešingai, rezultatai, pagrįsti išeiga kaip atsako kintamuoju, priklauso nuo visų šių kitų kintamųjų. E_yC_x priklauso nuo kiekviename bandyme naudojamų plūdenų rūšių savitojo augimo greičio ir nuo didžiausio savitojo augimo greičio, kuris gali būti skirtingas plūdenų rūšims ir netgi klonams. Šis atsako kintamasis neturėtų būti taikomas lyginant plūdenų rūšių arba net skirtingų klonų jautrį toksinėms medžiagoms. Nors toksiškumui įvertinti moksliniu požiūriu būtų geriau taikyti vidutinį savitąjį augimo greitį, išeiga pagrįsti toksiškumo įverčiai irgi yra įtraukti į šį bandymo metodą, siekiant atitikti kai kurių šalių galiojančių norminių teisės aktų reikalavimus.

▼M1

Toksiškumo įverčiai turėtų būti pagrįsti gniužulų skaičiumi ir vienu papildomu matuojamu kintamuoju (suminiu gniužulų plotu, sausos medžiagos mase arba šviežios medžiagos mase), nes kai kurios medžiagos gali veikti kitą matuojamą kintamąjį gerokai stipriau nei gniužulų skaičių. Šis poveikis nebūtų nustatytas apskaičiuojant vien tik gniužulų skaičių.

Gniužulų skaičius ir visi kiti užrašyti matuojami kintamieji, t. y. suminis gniužulų plotas, sausos medžiagos masė arba šviežios medžiagos masė, surašomi į lenteles kartu su kiekvieną matavimą atitinkančiomis bandomosios medžiagos koncentracijos vertėmis. Vėlesnė duomenų analizė, pvz., LOEC, NOEC arba EC_x įvertinti, turėtų būti pagrįsta atskirų kartotinių ėminių vertėmis, bet ne apskaičiuota kiekvienos apdorotų ėminių grupės vidurkiu.

2.2.1. **Vidutinis savitasis augimo greitis**

Vidutinis savitasis augimo greitis tam tikru laikotarpiu apskaičiuojamas kiekvienam kontroliniam ir apdorotam kartotiniam ėminiui kaip augimo kintamųjų: gniužulų skaičiaus ir vieno kito matuojamo kintamojo (suminio gniužulų ploto, sausos arba šviežios medžiagos masės), 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 $i - j$

— 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

Kiekvienai apdorotų ir kontrolinių ėminių grupei apskaičiuojama augimo greičio vidutinė vertė ir dispersijos įverčiai.

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 medžiagos poveikius veikimo laikotarpiu (pvz., nagrinėjant logaritmines augimo kreives). Dideli atskiriems laikotarpiams gautų augimo greičių ir vidutinio augimo greičio skirtumai rodo, kad yra nuokrypis nuo pastovaus eksponentinio augimo ir kad reikia atlikti nuodugnų augimo kreivių tyrimą. Šiuo atveju apskaičiavimas su atsarga būtų apdorotų kultūrų savitojo augimo greičio didžiausiu inhibavimo laikotarpiu ir kontrolinių ėminių augimo greičio tuo pačiu laikotarpiu lyginimas.

▼M1

Kiekvieno apdoroto kartotinio ėminio augimo greičio mažėjimas procentais (I_r) gali būti apskaičiuotas kiekvienai koncentracijai (apdorotų ėminių grupei) 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 : kontrolinių ėminių μ vidutinė vertė;

— μ_T : apdorotų ėminių grupės μ vidutinė vertė.

2.2.2. **Išeiga**

Poveikis išeigai nustatomas kiekvienam bandymo indui pagal du bandymo pradžioje ir pabaigoje matuojamus kintamuosius: gniužulų skaičių ir vieną kitą matuojamą kintamąjį (suminį gniužulų plotą, sausos medžiagos masę arba šviežios medžiagos masę). Sausos arba šviežios medžiagos pradinė biomasė nustatoma pagal gniužulų ėminį, imamą iš tos pačios kultūros, kuri sėjama į bandymo indus (žr. 1.7.3 skirsnio antrąją pastraipą). 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:

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

čia:

— % I_y : išeigos mažėjimas procentais

— b_C : kontrolinių ėminių grupės galutinės ir pradinės masių skirtumas

— b_T : apdorotų ėminių grupės galutinės ir pradinės masių skirtumas

2.2.3. **Koncentracijos ir atsako santykio kreivių brėžimas**

Turėtų būti braižomos koncentracijos ir atsako santykio kreivės, kurios susieja atsako kintamojo (I_r arba I_y, apskaičiuoto kaip parodyta 2.2.1 skirsnio paskutinėje pastraipoje arba 2.2.2 skirsnyje) vidutinį mažėjimo laipsnį procentais ir bandomosios medžiagos koncentracijos logaritmą.

2.2.4. **EC_x įvertinimas**

EC_x įverčiai (pvz., EC_{50}) turėtų būti pagrįsti vidutiniu savituoju augimo greičiu (E_rC_x) ir išeiga (E_yC_x), kurių kiekvienas savo ruožtu turėtų būti pagrįstas gniužulų skaičiumi ir vienu papildomu matuojamu kintamuoju (suminiu gniužulų plotu, sausos medžiagos mase arba šviežios medžiagos mase). Tai daroma dėl tos priežasties, kad yra bandomųjų medžiagų, kurios skirtingai veikia gniužulų skaičių ir kitus matuojamus kintamuosius. Taigi reikiami toksiškumo parametrai yra kiekvienam inhibavimo laipsniui x apskaičiuotos keturios EC_x vertės: E_rC_x (gniužulų skaičius); E_rC_x (suminis gniužulų plotas, sausos medžiagos masė arba šviežios medžiagos masė); E_yC_x (gniužulų skaičius) ir E_yC_x (suminis gniužulų plotas, sausos medžiagos masė arba šviežios medžiagos masė).

▼M1

2.3. STATISTINĖS PROCEDŪROS

Tikslas – gauti kiekybinį koncentracijos ir atsako santykį, taikant regresinę analizę. Galima taikyti svertinę tiesinę regresiją, atlikus atsako duomenų tiesinamąjį transformavimą, pvz., į probito, logito arba *Weibullo* vienetus (16), bet geresnės yra netiesinės regresijos metodų procedūros, kurias taikant geriau apdorojami neišvengiami duomenų netolygumai ir nukrypimai nuo glodžiųjų skirstinių. Artėjant į nulinį arba visišką inhibavimą, tokie netolygumai dėl transformavimo gali padidėti ir trukdyti analizei (16). Reikėtų pažymėti, kad tipiniai analizės metodai, taikant probito, logito arba *Weibullo* transformuotus dydžius, yra skirti dichotominiams (pvz., mirtingumas arba išlikimas) duomenims ir turi būti modifikuojami, norint juos pritaikyti augimo arba biomasės duomenims. Specifinės EC_x verčių nustatymo pagal tolydžiuosius duomenis procedūros yra pateiktos (17), (18) ir (19).

Kiekvienam analizuojamam atsako kintamajam naudojamas koncentracijos ir atsako santykis EC_x verčių taškiniams įverčiams apskaičiuoti. Kai įmanoma, turėtų būti nustatyti kiekvieno įverčio 95 % pasikliautinieji rėžiai. Atsako duomenų atitiktis regresijos modeliui turėtų būti įvertinta grafiškai arba statistiškai. Regresinė analizė turėtų būti atliekama naudojant atskirus kartotinių ėminių atsakus, bet ne apdorotų ėminių grupių vidurkius.

Be to, jei turimi regresijos modeliai (metodai) netinka duomenims, EC_{50} įverčiai ir pasikliautinieji rėžiai gali būti gauti taikant tiesinį interpoliavimą ir savaiminio gerinimo metodus (*anglų k.* bootstrapping) (20).

Norint įvertinti LOEC, taigi ir NOEC, yra būtina palyginti apdorotų ėminių vidutines vertes, taikant dispersinės analizės (ANOVA) metodus. Tuomet kiekvienai koncentracijai gautas vidurkis turi būti lyginamas su kontrolinio ėminio vidurkiu, taikant atitinkamą kartotinių palyginimų arba trendo kriterijaus metodą. Gali būti naudingas *Dunnetto* arba *Williamso* kriterijus (21)(22)(23)(24).. Yra būtina įvertinti, ar galioja ANOVA dispersijos vienalytiškumo prielaida. Šį įvertinimą galima atlikti grafiškai arba taikant formalųjį kriterijų (25). Tinkami kriterijai yra *Levene* arba *Bartletto* kriterijai. Neatitiktį prielaidai dėl dispersijų vienalytiškumo kartais galima pataisyti atliekant duomenų logaritminį transformavimą. Jei dispersijos nevienalytiškumas yra labai didelis ir jo neįmanoma pataisyti transformavimo keliu, reikėtų nagrinėti galimybę taikyti kitus analizės metodus, pvz., žingsnio mažinimo *Jonkheere* trendo kriterijus. Papildomus nurodymus dėl NOEC nustatymo galima rasti (19).

Atsižvelgiant į naujus mokslo pasiekimus rekomenduojama atsisakyti NOEC sąvokos ir ją pakeisti regresija pagrįstais EC_x taškiniais įverčiais. Atitinkama šio *Lemna* bandymo x vertė nėra nustatyta. Tačiau atrodo, kad tiktų į 10–20 % intervalą patenkanti vertė (pagal pasirinktą atsako kintamąjį), ir pageidautina ataskaitoje pateikti abi EC_{10} ir EC_{20} vertės.

3. ATASKAITOS RENGIMAS

3.1. BANDYMŲ ATASKAITA

Bandymų ataskaitą turi sudaryti ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

— fizikinė būsena ir atitinkamos fizikocheminės savybės, įskaitant ribinę tirpumo vandenyje koncentraciją,

▼M1

— cheminio identifikavimo duomenys (pvz., CAS numeris), įskaitant grynumą.

Bandymo rūšys:

— mokslinis pavadinimas, klonas (jei žinomas) ir šaltinis.

Bandymo sąlygos:

— taikyta bandymo procedūra (stacionarusis, pusiau stacionarusis arba pratekamojo srauto bandymas),

— bandymo pradžios data ir jo trukmė,

— bandymo terpė,

— bandymo schemos aprašymas: bandymo indai ir dangčiai, tirpalų tūriai, kolonijų ir gniužulų skaičius bandymo inde bandymo pradžioje,

— bandymo koncentracijos vertės (vardinės ir išmatuotos, jei tinka) vienos koncentracijos kartotinių ėminių skaičius,

— pradinių ir bandymo tirpalų ruošimo metodai, įskaitant tirpiklių arba dispergentų naudojimą,

— bandymo temperatūra,

— šviesos šaltinis, šviesos intensyvumas ir vienalytiškumas,

— apdorotų ir kontrolinių ėminių terpės pH vertės,

— bandomosios medžiagos koncentracijos vertės, analizės metodas ir atitinkami kokybės įvertinimo duomenys (tinkamumo patvirtinimo tyrimai, analizės rezultatų standartiniai nuokrypiai arba pasikliautinieji rėžiai),

— gniužulų skaičiaus ir kitų matuojamų kintamųjų, pvz., sausos medžiagos masės, šviežios medžiagos masės arba gniužulų ploto, nustatymas,

— visi nukrypimai nuo šio bandymo metodo.

Rezultatai:

— neapdoroti duomenys: gniužulų skaičius kiekviename bandymo ir kontroliniame inde ir kiti matuojami kintamieji kiekvienu stebėjimo ir analizės atveju,

— kiekvieno matuojamo kintamojo vidurkis ir standartinis nuokrypis,

— kiekvieną koncentraciją atitinkančios augimo kreivės (rekomenduojama matuojamą kintamąjį logaritmuoti, žr. 2.2.1 skirsnio antrąją pastraipą),

— kontrolinio ėminio dvigubėjimo trukmė (augimo greitis) pagal gniužulų skaičių,

— apskaičiuoti kiekvieno apdoroto kartotinio ėminio atsako kintamieji, jų vidutinės vertės ir kartotinių ėminių variacijos koeficientas,

— grafinis koncentracijos ir poveikio santykio pateikimas,

— toksiškumo įverčiai pagal atsako kintamuosius, pvz., EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, ir atitinkami pasikliautinieji intervalai. Jei buvo apskaičiuotos, LOEC ir NOEC vertės ir jų nustatymo statistiniai metodai,

▼M1

— jei buvo taikytas dispersinės analizės metodas ANOVA, poveikio, kurį galima aptikti, dydis (pvz., mažiausiais reikšminis skirtumas),

— bet koks augimo skatinimas, nustatytas kuriam nors apdorojimo atvejui,

— visi stebimi fitotoksiškumo požymiai ir bandymo tirpalų stebėjimai,

— rezultatų aptarimas, įskaitant nukrypimų nuo šio bandymo metodo įtaką bandymo rezultatams.

4. **LITERATŪRA**

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

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

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

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

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

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

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

(7) SSI – Swedish Standards Institute. (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

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

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

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

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

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

▼**M1**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼M1

1 Priedėlis

***Lemna* SPP Aprašymas.**

Vandens augalas, kurio įprastas pavadinimas plūdena, *Lemna* spp., priklauso *Lemnaceae* šeimai, kurią sudaro kelios pasaulyje paplitusios keturių genčių rūšys. Jų skirtinga išvaizda ir klasifikavimas yra išsamiai aprašytas (1)(2). *Lemna gibba* ir *L. minor* rūšis atitinka vidutinio klimato zonų rūšis ir paprastai naudojamos toksiškumo bandymams atlikti. Abi rūšis turi plaukiojantį arba panardintą disko formos kamieną (gniužulą) ir iš apatinio kiekvieno gniužulo vidurio skleidžiasi labai plona šaknis. *Lemna* spp. retai žydi ir augalai dauginasi vegetatyviniu būdu susidarant naujiems gniužulams (3). Palyginti su senais augalais jaunesni augalai yra šviesesni, turi trumpesnes šaknis ir yra sudaryti iš dviejų arba trijų skirtingo dydžio gniužulų. Mažo dydžio *Lemna* yra paprastos struktūros augalai, kurie dauginasi nelytiniu būdu, ir dėl trumpos vienos kartos trukmės šios genties augalai labai tinka laboratoriniams bandymams (4)(5).

Kadangi gali skirtis rūšių jautris, tinka tik vienos rūšies jautrio tarpusavio lyginimas.

Bandymams atlikti naudotų *Lemna* rūšių pavyzdžiai. Rūšių naudojimo 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 (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96–156. 8pp.

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

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

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

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

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

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

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

▼M1

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
Fax:+1–416–978–5878
e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca
http://www.botany.utoronto.ca/utcc

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695–8002
United States
phone 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
Fax +46 8 674 7636

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

Literatūra

(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.

▼M1

2 priedėlis

Pradinės kultūros priežiūra

Pradines kultūras galima laikyti ilgesnį laiką žemesnėje temperatūroje (4–10 °C) ir nereikia rekultivuoti. *Lemna* auginimo terpė gali būti tokia pat, kaip ir bandymo terpė, bet pradinėms kultūroms galima naudoti kitų mitybinių medžiagų turinčias terpes.

Periodiškai tam tikras skaičius jaunų, šviesiai žalių augalų steriliai pernešami į naujos kultūros indus su nauja terpe. Esant šiame metode siūlomoms vėsesnėms sąlygoms, persėti galima ne rečiau kaip kas tris mėnesius.

Kultūroms auginti turėtų būti naudojami chemiškai švarūs (rūgštimi išplauti) ir sterilūs stikliniai indai ir taikomi sterilaus apdorojimo metodai. Jei pradinė kultūra užkrečiama, pvz., dumbliais arba grybeliais, reikia imtis būtinų žingsnių užkrato organizmams pašalinti. Dumblių ir daugumos kitų užkrečiančių organizmų atveju tai galima pasiekti, atliekant paviršinį sterilizavimą. Imamas užkrėstos augalinės medžiagos ėminys ir nupjaunamos šaknys. Medžiaga iš pradžių stipriai purtoma švariame vandenyje ir nuo 30 s iki 5 minučių įmerkiama į 0,5 % (V/V) natrio hipochlorito tirpalą. Vėliau augalinė medžiaga skalaujama steriliu vandeniu ir pernešama kelių atskirų ėminių pavidalu į kultūros auginimo indus su nauja auginimo terpe. Po tokio apdorojimo daug gniužulų žūsta, ypač ilgiau apdorojant, bet tam tikra likusių augalų dalis paprastai nebeturi užkrato. Jie gali būti naudojami naujoms kultūroms sėti.

▼M1

3 Priedėlis

Terpės

L. minor ir *L. gibba* auginti rekomenduojamos skirtingos terpės. *L. minor* rekomenduojama Švedijos standarto (SIS) terpė, o *L. gibba* rekomenduojama 20X AAP terpė. Toliau pateikta abiejų terpių sudėtis. Šioms terpėms ruošti turėtų būti naudojamos analiziškai grynos cheminės medžiagos ir dejonizuotas vanduo.

Švedijos standarto (SIS) *Lemna* auginimo terpė

— Pradiniai tirpalai I–V sterilizuojami autoklave (120 °C, 15 min) arba filtravimu per membraną (vidutinis akučių skersmuo 0,2 μm).

— VI (ir papildomai VII) pradiniai tirpalai sterilizuojami tik filtravimu per membraną; jų negalima apdoroti autoklave.

— Sterilūs pradiniai tirpalai turėtų būti laikomi šaltai ir tamsoje. I–V pradiniai tirpalai turėtų būti pašalinti po šešių mėnesių, o VI (ir papildomo VII) tirpalų laikymo trukmė vienas mėnuo.

Pradinis tirpalas Nr.	Medžiaga	Pradinio tirpalo koncentracija ($g \cdot l^{-1}$)	Paruoštos terpės koncentracija ($mg \cdot l^{-1}$)	Paruošta terpė	
				Elementas	Koncentracija ($mg \cdot l^{-1}$)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO4	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	—	—

— 1 litrui SIS terpės paruošti į 900 ml dejonizuoto vandens įpilama:

— 10 ml I pradinio tirpalo

— 5 ml II pradinio tirpalo

— 5 ml III pradinio tirpalo

— 5 ml IV pradinio tirpalo

▼M1

— 1 ml V pradinio tirpalo

— 5 ml VI pradinio tirpalo

— 1 ml VII pradinio tirpalo (papildomai)

Pastaba.: Papildomo VII pradinio tirpalo (MOPS buferio) gali prireikti tam tikroms bandomosioms medžiagoms (žr. 1.4 skirsnio paskutinę pastraipą).

— 0,1 mol/l arba 1 mol/l HCl arba NaOH nustatoma pH vertė 6,5 ± 0,2 ir dejonizuotu vandeniu skiedžiama iki vieno litro tūrio.

20X AAP auginimo terpė

Pradiniam tirpalams ruošti naudojamas sterilus distiliuotas arba dejonizuotas vanduo.

Sterilūs pradiniai tirpalai turėtų būti laikomi šaltai ir tamsoje. Pradinių tirpalų laikymo trukmė tokiomis sąlygomis yra bent 6–8 savaitės.

20X – AAP terpei ruošiami penki pradiniai mitybinių medžiagų tirpalai (A1, A2, A3, B ir C), naudojant analiziškai grynas medžiagas. Auginimo terpei gauti 20 ml kiekvieno pradinio mitybinių medžiagų tirpalo įpilama į maždaug 850 ml dejonizuoto vandens. 0,1 mol/l arba 1 mol/l HCl arba NaOH nustatoma pH vertė 7,5 ± 0,1 ir dejonizuotu vandeniu skiedžiama iki vieno litro tūrio. Terpė filtruojama į sterilų indą per 0,2 μm (maždaug) membraninį filtrą.

Bandymams skirtą auginimo terpę reikėtų ruošti 1–2 paros prieš naudojimą, kad galėtų nusistovėti pH vertė. Auginimo terpės pH vertė turėtų būti patikrinta prieš naudojimą ir prireikus reguliuojama, įpilant 0,1 mol/l arba 1 mol/l NaOH arba HCl, kaip aprašyta pirmiau.

Pradinis tirpalas Nr.	Medžiaga	Pradinio tirpalo koncentracija ($g \cdot l^{-1}$) (*)	Paruoštos terpės koncentracija ($mg \cdot l^{-1}$) (*)	Paruošta terpė	
				Elementas	Koncentracija ($mg \cdot l^{-1}$) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 $mg \cdot l^{-1}$	66 $\mu g \cdot l^{-1}$	Zn	31 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 $mg \cdot l^{-1}$	29 $\mu g \cdot l^{-1}$	Co	7,1 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 $mg \cdot l^{-1}$	145 $\mu g \cdot l^{-1}$	Mo	58 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 $mg \cdot l^{-1}$	0,24 $\mu g \cdot l^{-1}$	Cu	0,080 $\mu g \cdot l^{-1}$
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Jei nenurodyta kitaip.

▼M1

Išnaša: Teoriškai tinkama galutinė hidrokarbonato koncentracija (kuri leistų išvengti didesnio pH reguliavimo) yra lygi 15 mg/l, bet ne 300 mg/l. Tačiau anksčiau 20X-AAP terpei ruošti, įskaitant tarplaboratorinį šio metodo tyrimą, buvo naudojama 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency).

STEINBERGO terpė (pagal ISO 20079)

Koncentracijos vertės ir pradiniai tirpalai

— Modifikuota *Steinbergo* terpė naudojama standarte ISO 20079 tik *Lemna minor* (nes pagal jį leidžiama naudoti tik *Lemna minor*), bet 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, kuri yra didžiausia terpės koncentracija, kai dar nesusidaro nuosėdos.

1 lentelė.

Pastovios pH vertės STEINBERGO terpė (modifikuota pagal Altenburgerį)

Medžiaga		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
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

▼M1

2 lentelė.

Pradiniai tirpalai (makroelementų)

1. **Makroelementai (50 kartų koncentruoti)**	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 tirpalai (mikroelementų)

2. **Mikroelementai (1 000 kartų koncentruoti)**	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 pradiniai tirpalai ir atskirai 4–7 pradiniai tirpalai gali būti supilti kartu (atsižvelgiant į reikiamą koncentraciją).

— Siekiant užtikrinti ilgesnę laikymo trukmę, pradiniai tirpalai 20 min apdorojami autoklave, esant 121 °C, arba atliekamas jų sterilus filtravimas (0,2 μm). Labai rekomenduojama steriliai filtruoti (0,2 μm) 8 pradinį tirpalą.

Galutinės koncentracijos STEINBERGO terpės (modifikuotos) ruošimas

— 20 ml 1, 2 ir 3 pradinių tirpalų (žr. 2 lentelę) įpilama į maždaug 900 ml dejonizuoto vandens, kad būtų išvengta nuosėdų susidarymo.

— Įpilama po 1,0 ml 4, 5, 6, 7 ir 8 pradinių tirpalų (žr. 3 lentelę).

— pH vertė turėtų būti 5,5 ± 0,2 (reguliuojama įpilant kiek įmanoma mažesnį NaOH arba HCl tirpalo tūrį).

▼M1

— Skiedžiama vandeniu iki 1 000 ml.

— Jei pradiniai tirpalai yra sterilizuoti ir naudojamas tinkamas vanduo, papildomai sterilizuoti nebūtina. Jei sterilizuojama galutinė terpė, 8 pradinis tirpalas turėtų būti įpilamas po terpės apdorojimo autoklave (20 min, esant 121 °C).

10 kartų didesnės koncentracijos tarpinės STEINBERGO terpės (modifikuotos) ruošimas

— 20 ml 1, 2 ir 3 pradinių tirpalų (žr. 2 lentelę) įpilama į maždaug 30 ml vandens, kad būtų išvengta nuosėdų susidarymo.

— Įpilama po 1,0 ml 4, 5, 6, 7 ir 8 pradinių tirpalų (žr. 3 lentelę). Skiedžiama vandeniu iki 100 ml.

— Jei pradiniai tirpalai yra sterilizuoti ir naudojamas tinkamas vanduo, papildomai sterilizuoti nebūtina. Jei sterilizuojama galutinė terpė, 8 pradinis tirpalas turėtų būti įpilamas po terpės apdorojimo autoklave (20 min, esant 121 °C).

— Terpės pH vertė (galutinės koncentracijos) 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, užterštо 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:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼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

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{diena}_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

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 išsinėrusių mašalų patinų ir patelių skaičius,

— lervų, kurios inde 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., 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

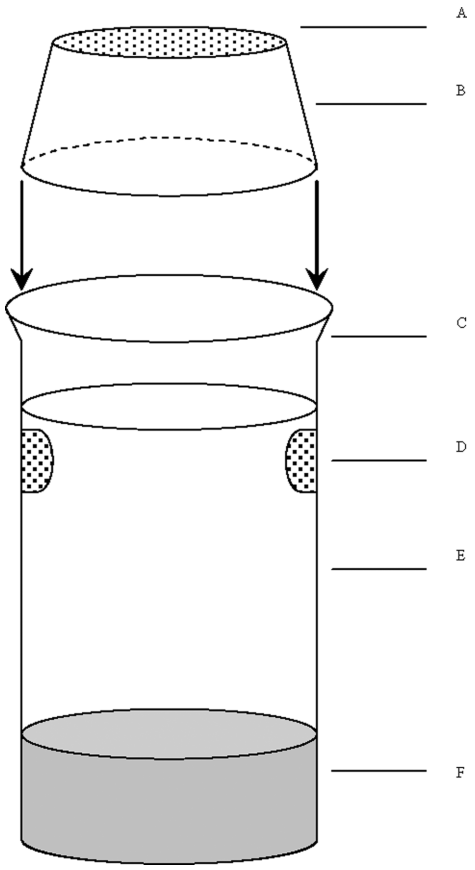
(*) Tačiau jeigu galima daryti prielaidą, kad vandens kietumo jonai gali sąveikauti su bandomąja chemine medžiaga, turėtų būti naudojamas mažesnio kietumo vanduo (vadinasi, šiuo atveju neleidžiama rinktis Elendt Medium M4).

▼**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,

▼M4

jeigu poveikio koncentracijos vertės atitinka bandymo 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).

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 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 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

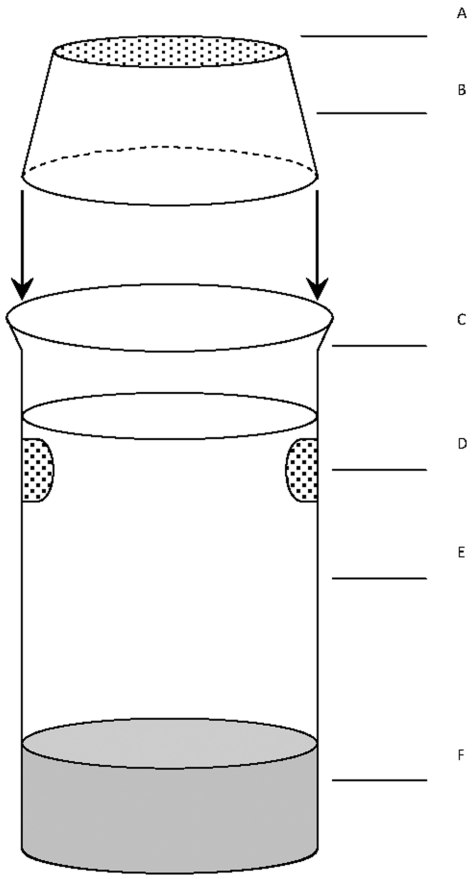
(*) Tačiau jeigu galima daryti prielaidą, kad vandens kietumo jonai gali sąveikauti su bandomąja chemine medžiaga, turėtų būti naudojamas mažesnio kietumo vanduo (vadinasi, šiuo atveju neleidžiama rinktis Elendt Medium M4).

▼**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:

$$\begin{aligned} TIC &= (\text{mg C skystyje} + \text{mg C viršutinėje erdvėje}) \\ &= (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \end{aligned} \qquad \text{1 lygtis}$$

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

66. Bandymas laikomas validuotu, jeigu:

a) vidutinė skaidymo procentinė dalis induose F_C su etaloninėmis cheminėmis medžiagomis yra > 60 % iki 14 inkubacijos dienos ir

b) tuščiuose kontroliniuose bandiniuose F_B esantis vidutinis TIC kiekis bandymo pabaigoje yra > 3 mg C/l.

Jeigu šios ribinės vertės nėra užtikrinamos, bandymas turėtų būti kartojamas naudojant iš kito šaltinio paimtą sėjimo kultūrą ir (arba) turėtų būti persvarstytos procedūros. Pvz., jeigu tuščiuosiuose bandiniuose susidaro didelis IC kiekis, 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.

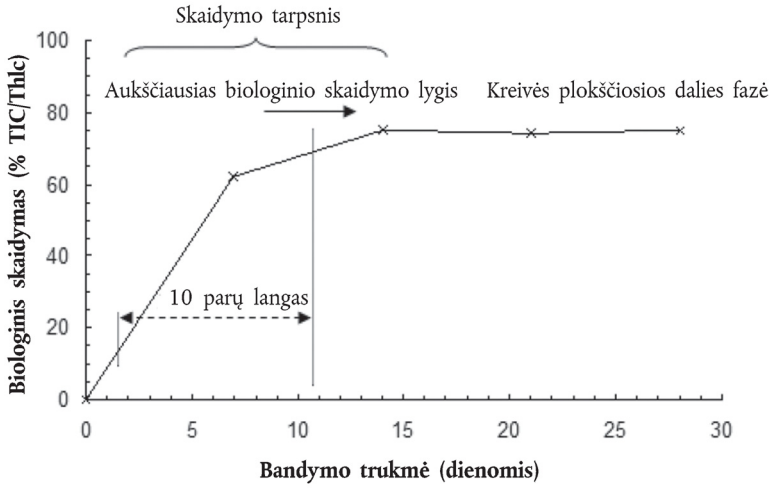
▼M4

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

▼M4

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 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

▼M4

10 % per ilgesnį laikotarpį negu pusė sugerties tarpsnio), vadinasi, bandymo sąlygos nėra tinkamos ar bandomieji organizmai nėra sveiki. Šiuo atveju bandymas 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:

$$\frac{C_a \text{nuostoviojebūsenojearbasugertiestarpsniopabaigoje(vidutinis)}}{C_s \text{nuostoviojebūsenojearbasugertiestarpsniopabaigoje(vidutinis)}}$$

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 praryjamą 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

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \quad t > t_c \qquad \text{[2 lygtis]}$$

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:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \quad 0 < t < t_c \qquad \text{[3 lygtis]}$$

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).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \qquad [11 \text{ lygtis}]$$

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 nitro-heterocyclic 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.