

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

► **B**

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
► <u>M1</u>	Komisijos Reglamentas (EB) Nr. 761/2009 2009 m. liepos 23 d.	L 220	1	2009 8 24
► <u>M2</u>	Komisijos reglamentas (ES) Nr. 1152/2010 2010 m. gruodžio 8 d.	L 324	13	2010 12 9



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 fizinių 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 kitus bandymų metodus 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 L 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*.

▼B

- (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

Igyvendinant 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.

▼B*PRIEDAS***A DALIS. FIZINIŲ 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 ĮTEMPIS
- A.6. TIRPUMAS VANDENYJE
- A.8. PASISKIRSTYMO KOEFICIENTAS
- A.9. PLIŪPSNIO TEMPERATŪRA
- A.10. DEGUMAS (KIETOSIOS MEDŽIAGOS)
- A.11. DEGUMAS (DUJOS)
- A.12. DEGUMAS (SĄLYTIS SU VANDENIU)
- A.13. PIROFORINĖS KIETŲJŲ MEDŽIAGŲ IR SKYSČIŲ SAVYBĖS
- A.14. SPROGSTAMOSIOS SAVYBĖS
- A.15. UŽSIDEGIMO TEMPERATŪRA (SKYSČIAI IR DUJOS)
- A.16. KIETŲJŲ MEDŽIAGŲ SANTYKINĖ UŽSIDEGIMO TEMPERATŪRA
- A.17. OKSIDACINĖS SAVYBĖS (KIETOSIOS MEDŽIAGOS)
- A.18. POLIMERŲ SKAITINĖS VIDUTINĖS MOLEKULINĖS MASĖS IR MOLEKULINĖS MASĖS PASISKIRSTYMAS
- A.19. MAŽOS MOLEKULINĖS MASĖS MEDŽIAGŲ KIEKIS POLIMERUOSE
- A.20. POLIMERŲ TIRPIMAS (EKSTRAHAVIMAS) VANDENYJE
- A.21. OKSIDUOJAMOSIOS SAVYBĖS (SKYSČIAI)
- A.22. PLAUSĖLIŲ SKERSMENS ILGIO SVORINIS GEOMETRINIS VIDURKIS

▼B**A.1. LYDYMOSI/UŽŠALIMO TEMPERATŪRA.****1. METODAS**

Dauguma apibūdintų metodų yra pagrįsti OECD Test Guidelines (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 svarbiausių tiriamos medžiagos savybių. Todėl ribinis koeficientas priklausys nuo to, ar galima, ar negalima tą medžiagą lengvai, sunkiai pulverizuoti, 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 tikti skystėjimo temperatūra.

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

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

Kadangi daugumos medžiagų fazinis virsmas vyksta virš temperatūrų ribos, ji dažnai apibūdinama kaip lydymosi riba.

Vienetų atitikmenys (iš K į °C)

$$t = T - 273,15$$

t: Celsijaus temperatūra, Celsijaus laipsniai (°C).

T: termodinaminė temperatūra, kelvinai (K).

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nebūtina naudoti etalonines medžiagas visais tais atvejais, kai tirama 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).

▼B

1.4. TYRIMO METODO ESMĖ

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

Tam tikrais atvejais vietoje lydymosi temperatūros yra patogiau 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 nustatomas mažesnis nei apytikriai 1 K/min. temperatūros pakitimas. Nustatoma pradinė ir galutinė lydymosi temperatūra.

1.4.1.2. *Lydymosi temperatūros imitavimo 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 vamzdele esantis mėginys yra automatiškai šildomas metaliniame cilindre. Šviesos spindulys nukreipiamas pro medžiagą per cilindre esančią skylutę į tiksliai kalibruotą fotoelementą. Daugumos besilydančių medžiagų optinės savybės keičiasi nuo matinių iki skaidrių. Į fotoelementą patenkančios šviesos intensyvumas didėja ir siunčia sustabdymo signalą į skaitmeninį indikatorius, kuris rodo kaitinimo kameroje esančio platininio varžinio termometro temperatūrą. Šis metodas netinka kai kurioms ryškiai spalvą turinčioms medžiagoms.

1.4.2. **Lydymosi pakopos**1.4.2.1. *Kofler karštasis strypas*

Kofler 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 prietaisu temperatūrai parodyti, 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 skiriamosioje linijoje yra užrašoma rodyklę nustatant taip, kad ji būtų ant linijos.

▼B1.4.2.2. *Lydimosi 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 šliaužiklio yra dedamas mėginys. Metalinės plokštelės centre yra skylė, per kurią patenka šviesa nuo mikroskopo apšvietimo veidrodėlio. Naudojimo metu kamera uždengiama stiklo plokšte, kad į erdvę, kurioje yra mėginys, nepatektų oro.

Mėginio kaitinimą reguliuoja reostatas. Atliekant labai tikslius matavimus optinėmis anizotropinėmis medžiagomis, gali būti naudojama poliarizuota šviesa.

1.4.2.3. *Menisko metodas*

Šis metodas yra visų pirma naudojamas poliamidams.

Temperatūra, kurioje išnyksta silikoninės alyvos meniskas, esantis taip karštosios pakopos ir uždengiančiojo stiklo, prie kurio pridėtas poliamidinis pavyzdys, yra nustatoma vizualiai.

1.4.3. **Užšalimo temperatūros nustatymo metodas**

Mėginys dedamas į specialų mėgintuvėlį, kuris įdedamas į aparatą užšalimo temperatūrai nustatyti. Aušinimo metu mėginys atsargiai ir nuolatos 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 norint išlaikyti 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 mėginyje įvyksta virsmas, kurio metu pakinta entalpija, tokį pasikeitimą parodo endoterminis (lydymosi) arba egzoterminis (užšalimo) nukrypimas nuo užrašytos temperatūros pagrindinės linijos.

▼ **B**

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 mėginyje įvyksta virsmas, kurio metu pakinta entalpija, tokį pasikeitimą parodo endoterminis (lydymosi) arba egzoterminis (užšalimo) nukrypimas nuo užrašyto šilumos srauto pagrindinės linijos.

1.4.5. **Skystėjimo temperatūra**

Šis metodas buvo sukurtas naudoti naftos alyvoms, jis taip pat tinka aliejinėms medžiagoms, kurių lydymosi temperatūra yra žema.

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

1.5. **KOKYBES KRITERIJAI**

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

METODŲ TAIKOMUMO LENTELĖ

A. Kapiliarinis metodas

Matavimo metodas	Medžiagos, kurias galima pulverizuoti	Medžiagos, kurių negalima pulverizuoti	Temperatūrų intervalas	Apskaičiuotas tikslumas ⁽¹⁾	Galiojantis standartas
Lydymosi temperatūros prietaisai su skysčių vonia	Taip	Tik keletas	273–573 K	±0,3 K	JIS K 0064
Lydymosi temperatūros priemonės su metaliniu bloku	Taip	Tik keletas	293– >573 K	+0,5 K	ISO 1218(E)
Detekcija fotoelementu	Taip	Keletas, naudojant prietaisus	253–573 K	+0,5 K	

⁽¹⁾ Priklauso nuo prietaiso rūšies ir medžiagos grynumo.

▼ B

B. Karštosios stadijos ir užšalimo metodai

Matavimo metodas	Medžiagos, kurias galima pulverizuoti	Medžiagos, kurių negalima lengvai pulverizuoti	Temperatūrų intervalas	Apskaičiuotas tikslumas ⁽¹⁾	Galiojantis standartas
Kofler karšta-sis strypas	Taip	Ne	283→573 K	±1 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Lydymosi temperatūros mikroskopas	Taip	Tik keletas	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 pulverizuoti	Medžiagos, kurių negalima lengvai pulverizuoti	Temperatūrų intervalas	Apskaičiuotas tikslumas ⁽¹⁾	Galiojantis standartas
Diferencinė terminė analizė	Taip	Taip	173–1 273 K	Iki 600K±0,5Kiki 1 273 K ±2,0 K	ASTM E 537-76
Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija	Taip	Taip	173–1 273 K	Iki 600K±0,5Kiki 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

⁽¹⁾ Priklauso nuo prietaiso rūšies ir medžiagos grynumo.

D. Skystėjimo temperatūra

Matavimo metodas	Medžiagos, kurias galima pulverizuoti	Medžiagos, kurių negalima lengvai pulverizuoti	Temperatūrų intervalas	Apskaičiuotas tikslumas ⁽¹⁾	Galiojantis standartas
Skystėjimo temperatūra	Naftos alyvoms ir alyvinėms medžiagoms	Naftos alyvoms ir alyvinėms medžiagoms	223-323 K	±3,0 K	ASTM D 97-66

⁽¹⁾ Priklauso nuo prietaiso rūšies ir medžiagos grynumo.

1.6. METODŲ APIBŪDINIMAS

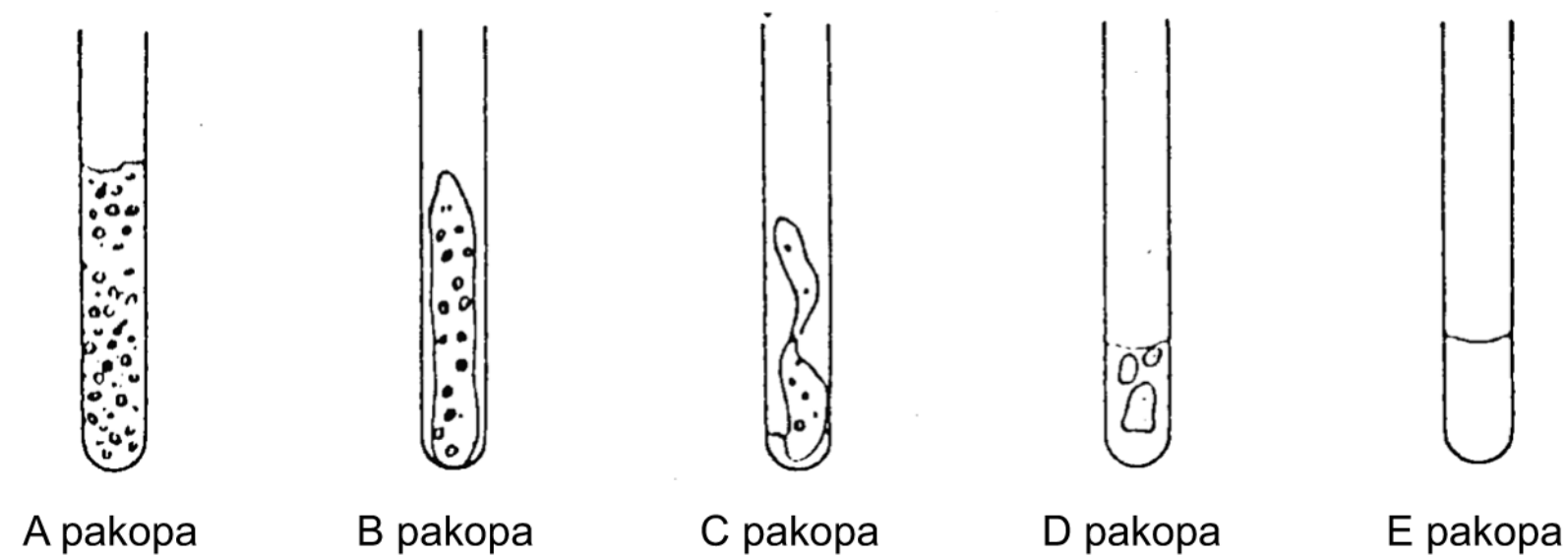
Beveik visų tyrimo metodų darbo eiga yra aprašyta tarptautiniuose ir nacionaliniuose standartuose (žr. 1 priedėlį).

1.6.1. Kapiliariniai metodai

Jeigu smulkiai pulverizuotų medžiagų temperatūra yra didinama pamažu, paprastai būna lydymosi pakopos, parodytos 1 pav.

▼ **B**

1 paveikslas



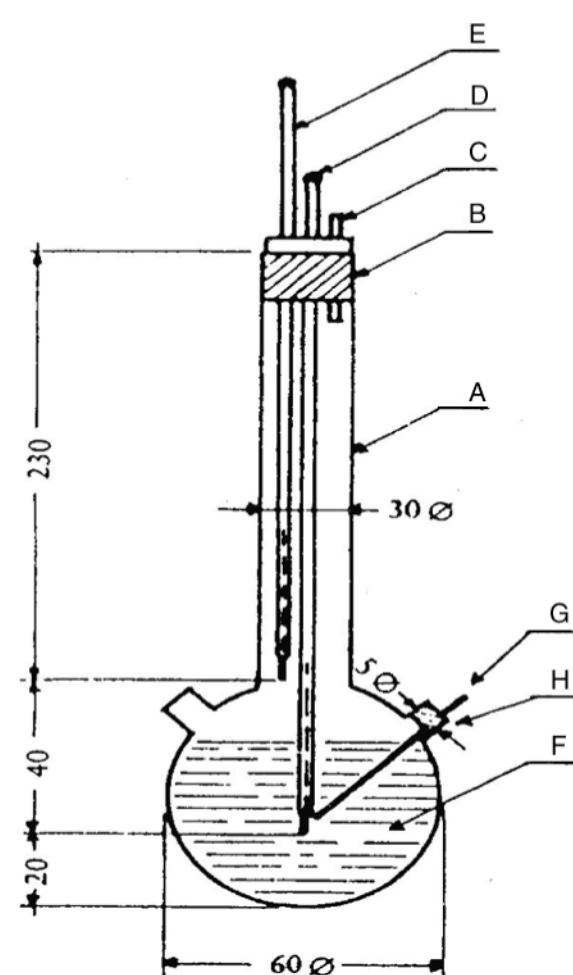
- A pakopa (lydymosi pradžia): smulkus lašeliai vienodai prilimpa prie vidinės kapiliarinio vamzdelio sienelės.
- B pakopa tarp mėginio ir vidinės sienelės atsiranda tarpas dėl lydinio suslūgimo.
- C pakopa suslūgęs mėginys pradeda smukti žemyn ir skystėti.
- D pakopa paviršiuje susidaro meniskas, bet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

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

1.6.1.1. *Lydymosi temperatūros prietaisai su skysčių vonios aparatu*

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

2 paveikslas



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

▼B*Vonios skystis*

Turi būti parenkamas atitinkamas skystis. Skysčio pasirinkimas priklauso nuo lydymosi temperatūros, kurią reikia nustatyti, pvz., parafininė alyva – temperatūra ne aukštesnė kaip 473 K, silikoninė alyva – temperatūra ne aukštesnė kaip 573 K.

Jei lydymosi temperatūra aukštesnė negu 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 žemiau toliau pateiktų arba lygiaverčių standartų reikalavimus:

ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Darbo eiga

Sausoji 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 mėginys. Paprastai kapiliarinis vamzdelis dedamas į aparatą, kurio temperatūra yra apie 10 K žemesnė negu lydymosi temperatūra.

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

Apskaičiavimas

Lydymosi temperatūra apskaičiuojama taip:

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

kai:

T = koreguota lydymosi temperatūra, K

T_D = D termometro parodymai, K

T_E = E termometro parodymai, 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,

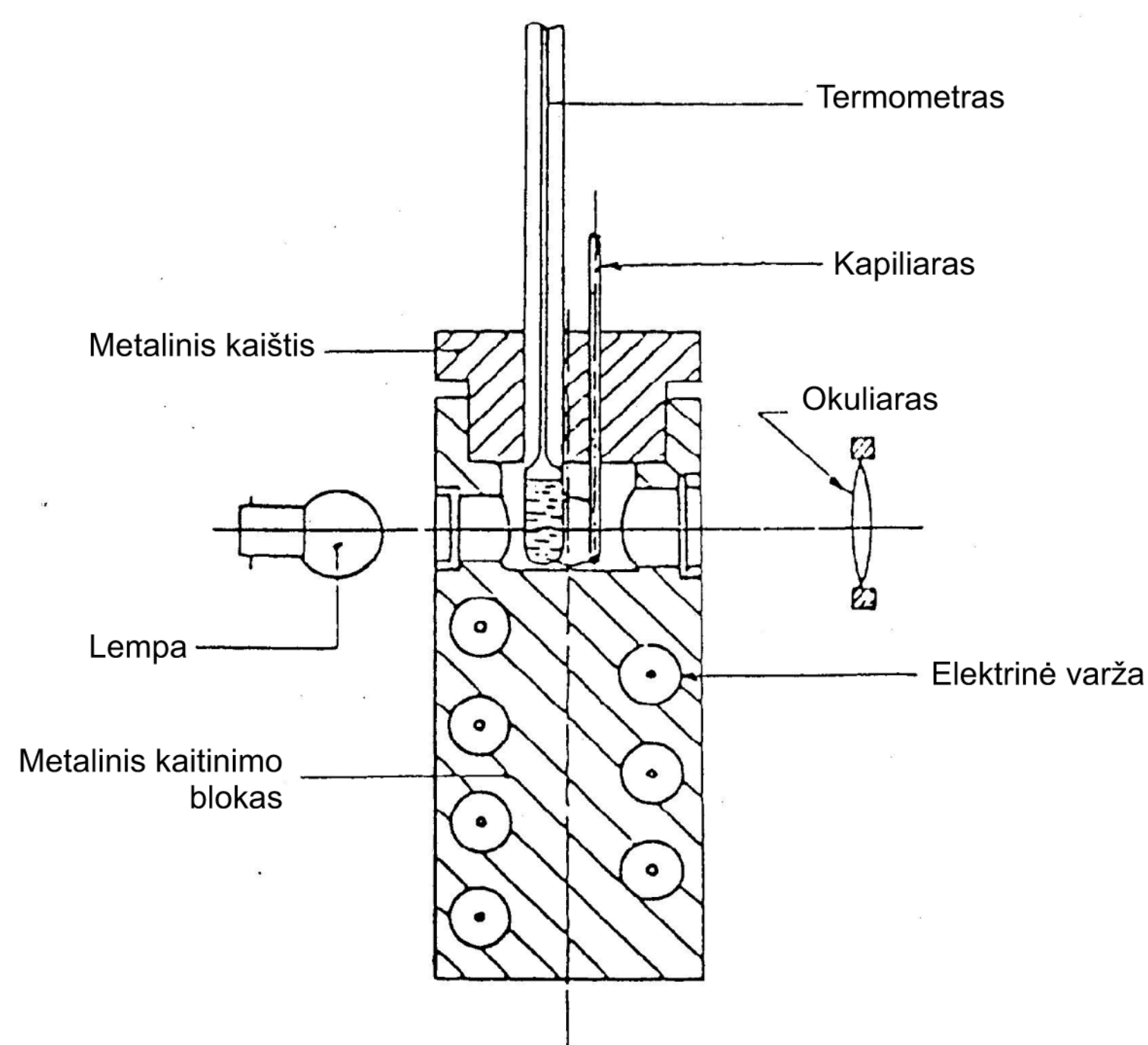
▼ **B**

- metalinio bloko kaitinimo sistema, kuri, pavyzdžiui, yra tiekama 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 vienu uždaru galu (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.

▼B

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 parodo tikrąją krosnies temperatūrą bei kapiliaruose esančios medžiagos temperatūrą.

1.6.2. **Karštosios stadijos**

1.6.2.1. *Kofler 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 ne 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. **Skystėjimo temperatūros nustatymas**

Žr. priedėlį.

2. **DUOMENYS**

Kai kuriais atvejais reikalinga termometro korekcija.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

Į mėginio ataskaitą, jeigu įmanoma, įtraukiama tokia informacija:

— naudotas metodas,

— tikslios medžiagos charakteristikos (identiškas ir priemaišos) ir išankstinio gryninimo, jeigu toks naudojamas, stadija,

— tikslumo apskaičiavimas.

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

▼B

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 imamos dvi temperatūros.

Jei medžiaga suyra ar išgaruoja prieš pasiekiant lydymosi temperatūrą, imama ta temperatūra, kuriai esant įvyko šis efektas.

Visa informacija ir pastabos, svarbios duomenų aiškinimui, turi būti pateikiamos ataskaitoje, ypač atsižvelgiant į priemaišas ir medžiagos fizinę būseną.

4. LITERATŪRA

- 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.

▼B*Priedėlis*

Papildomos techninės informacijos, pavyzdžiui, galima ieškoti šiuose standartuose.

1. Kapiliariniai metodai**1.1. Lydymosi temperatūros nustatymo prietaisai su skysčių vonia**

ASM E 324-69	Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals
BS 46-34	Method for the determination of melting point and/or melting range
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products.

1.2. Lydymosi temperatūros nustatymo prietaisai su metaliniu bloku

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics- polyamides -determination of „melting point“

2. Karštosios stadijos**2.1. Kofler karštasis strypas**

ANSI/ASTM D 3451-76	Standard recommended practices for testing polymeric powder coatings

2.2. Lydymosi temperatūros mikroskopas

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von eilkristallinen Kunststoffen.

2.3. Menisko metodas (poliamidai)

ISO 1218 (E)	Plastics – polyamides – determination of „melting point“

▼B

ANSI/ASTM D 2133-66 Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials

NF T 51-050 Resines de poliamides. Determination du „point de fusion“ metode du menisque

3. **Užšalimo temperatūros nustatymo metodai**

BS 4633 Method for determination of crystallizing point

BS 4695 Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)

DIN 51421 Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen

ISO 2207 Cires de petrole: determination de la temperature de figeage

DIN 53175 Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsauren

NF T 60-114 Point de fusion des paraffines

NF T 20-051 Methode de determination du point de cristallisation (point de congelation)

ISO 1392 Method for the determination of the freezing point

4. **Terminė analizė**

4.1. Diferencinė terminė analizė

ASTM E 537-76 Standard method for assessing the thermal

ASTM E 473-85 Standard definitions of terms relating to thermal analysis

▼B

ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

4.2. Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

5. Skystėjimo temperatūros nustatymas

ASTM D 97-66	Echantillonnage et analyse des produits du
ASTM D 97-66	Standard test methods for pour point of petroleum oils
ISO 3016	Petroleum oils – Determination of pour point

▼B**A.2. VIRIMO TEMPERATŪRA****1. METODAS**

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

1.1. ĮVADAS

Čia apibūdinti metodai ir prietaisai gali būti naudojami skystoms ir blogai besilydančioms medžiagoms, jei cheminių reakcijų, kuriose jos naudojamos, temperatūra nėra žemesnė nei virimo temperatūrą (pvz., autooksidacija, persigrupavimas, skilimas ir pan.). Šiuos metodus galima taikyti grynomis 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 svarbiausių savybių. Jeigu mėginyje yra lakiųjų priemaišų, kurios galėtų turėti įtakos rezultatams, medžiagą reikia išgryninti.

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Normali virimo temperatūra yra apibrėžiama 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 Clausius-Clapeyron lygtimi:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2,3 RT} + \text{const.}$$

kai:

p = medžiagos garų slėgis paskaliais

ΔH_v = garavimo šiluma, J mol⁻¹

R = universalioji molinė dujų konstanta = 8,314 J mol⁻¹K⁻¹

T = termodinaminė temperatūra, K

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

▼ B*Vienetų atitikmenys*

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. TYRIMO METODO ESMĖ

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

1.4.1. Nustatymas ebulioskopu

Iš pradžių ebulioskopai buvo sukurti molekuliniam svoriui nustatyti didinant 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 aplinkos sąlygomis atmosferos slėgyje, kol užverda.

1.4.2. Dinaminis metodas

Šį metodą sudaro garų pakartotino suskystinimo temperatūros matavimas atitinkamu termometru esant deflegmacijai verdant. Taikant šį metodą galima keisti slėgį.

1.4.3. Distiliacijos metodas virimo temperatūrai nustatyti

Šį metodą sudaro skysčio distiliavimas ir garų pakartotino suskystinimo temperatūros matavimas bei distiliato kiekio nustatymas.

▼ **B**

1.4.4. **„Siwoloboff“ metodas**

Mėginys 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 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 mėginyje įvyksta virsmas, kurio metu pasikeičia entalpija, tą pokytį parodo endoterminis nuokrypis (virimas) nuo pagrindinės užrašytų temperatūrų linijos.

1.4.7. **Diferencinė skenuojamoji kalorimetrija**

Šia metodika 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 temperatūrą programa. Ši energija – tai energija, reikalinga nustatyti medžiagos ir etaloninės medžiagos nulinį temperatūrų skirtumą. Jeigu mėginyje įvyksta virsmas, kurio metu pasikeičia entalpija, tą pokytį parodo endoterminis nuokrypis (virimas) nuo pagrindinės užrašytų temperatūrų linijos.

1.5. **KOKYBĖS KRITERIJAI**

Skirtingų metodų, naudojamų virimo temperatūrai/virimo intervalui nustatyti, taikymas 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	±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 grynomis medžiagoms. Naudojant kitokiomis sąlygomis, reikėtų pagrįsti.

▼ **B**

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 tyrimo metodą. Garų slėgio nustatymas.

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

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

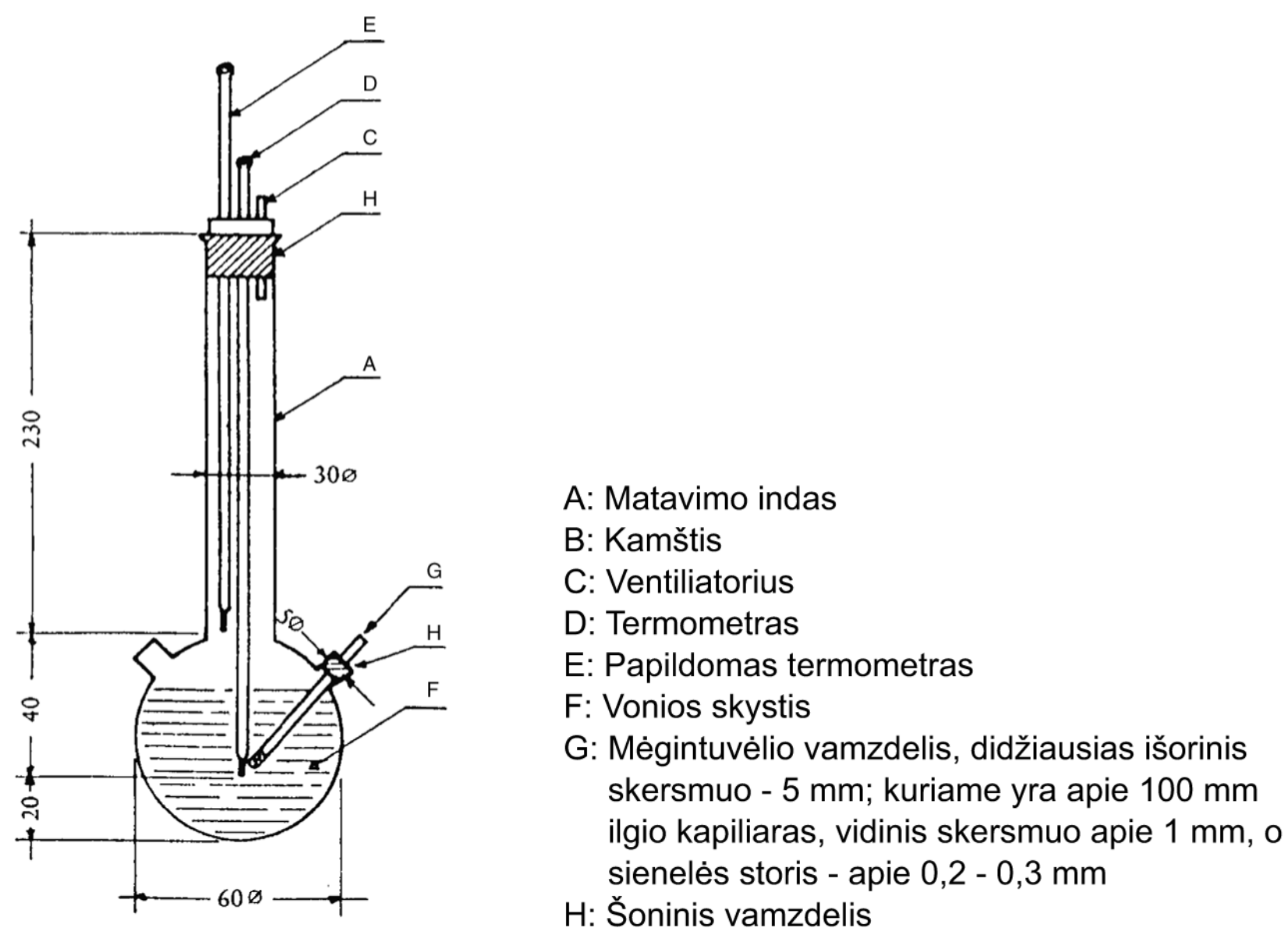
Žr. priedėlį.

1.6.4. **Siwoloboff metodas**

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

1 pav. pavaizduotas standartizuotas lydymosi ir virimo temperatūros nustatymo aparatas (JIS K 0064) (stiklinis, visi duomenys nurodyti milimetrais).

1 paveikslas



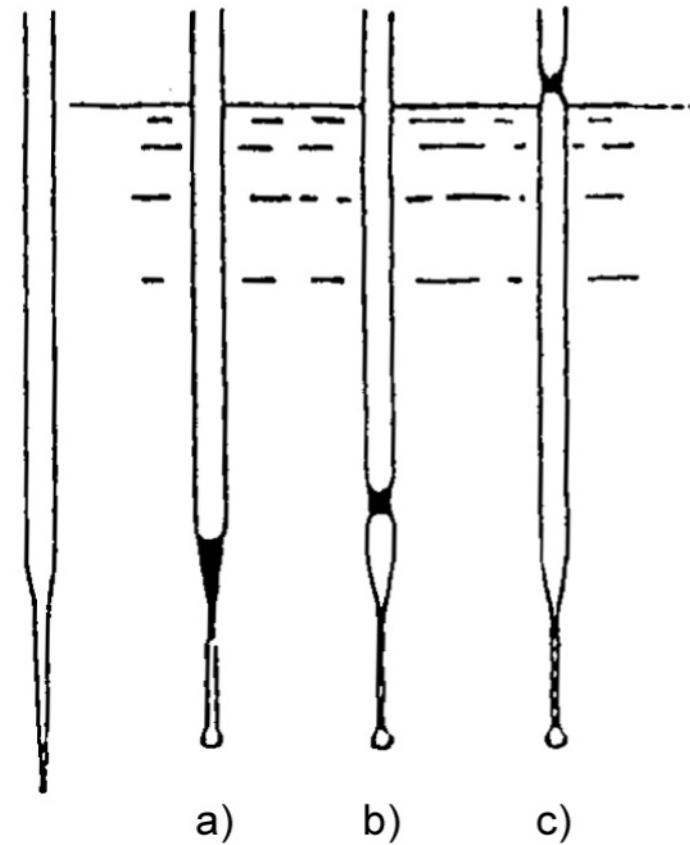
Kapiliarinis vamzdelis (virinimo kapiliarinis vamzdelis), kuris užlydytas 1 cm virš apatinio galo, dedamas į mėgintuvėlio vamzdelį. Mėginio yra dedama tiek, kad užlydytoji kapiliarinio vamzdelio dalis būtų žemiau skysčio paviršiaus. Mėgintuvėlio vamzdelis su virinimo kapiliariniu vamzdeliu yra pritaishomas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

▼ **B**

2 pav.

Pagal Siwoloboff

3 pav.

Modifikuotas variantas

Vonios skystis parenkamas pagal virimo temperatūrą. Kai temperatūra siekia 573 K, gali būti naudojama silikoninė alyva. Parafininė alyva gali būti naudojama 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. Pasiekus virimo temperatūrą, iš virinimo kapiliarinio vamzdelio 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 mėginio. Atvirasis plonojo vamzdelio galiukas yra užlydomas taip, kad jo gale liktų mažas oro burbuliukas. Kaitinant aparatą lydimosi temperatūroje (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 mėginys kaitinamas 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 indikatorius, parodantį bloke esančio platininio varžinio termometro parodymus.

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

▼ B

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 lygties vidutinėmis vertėmis:

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

kai:

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

$$P = \text{slėgio matavimas, kPa}$$

$$f_T = \text{virimo temperatūros pokyčio greitis, slėgis K/kPa}$$

$$T = \text{išmatuota virimo temperatūra, K}$$

$$T_n = \text{virimo temperatūra, koreguota iki normalaus slėgio, K}$$

Daugumos medžiagų temperatūros korekcijos koeficientai f_T ir jų aproksimavimo lygtys yra įtrauktos į pirmiau 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

▼B**3. ATASKAITOS PATEIKIMAS**

Į mėginio ataskaitą, jeigu įmanoma, įtraukiama tokia informacija:

- naudotas metodas,
- tikslios medžiagos charakteristikos (identiškas ir priemaišos) ir išankstinio gryninimo, jeigu toks naudojamas, stadija,
- 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.

Visa informacija ir pastabos, svarbios duomenų aiškinimui, turi būti pateikiamos ataskaitoje, ypač atsižvelgiant į priemaišas ir medžiagos fizinę būseną.

4. LITERATŪRA

- 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.

▼B*Priedėlis*

Papildomos techninės informacijos, pavyzdžiui, galima ieškoti šiuose standartuose.

1. Ebulioskopas

ASTM D 1120-72	Standard test method for boiling point of engine anti-freezes

2. Distiliavimo procesas (virimo intervalas)

ISO/R 918	Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/71	Method for determination of distillation characteristics
DIN 53171	Losungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. Diferencinė terminė analizė ir diferencinė skenuojamoji kalorimetrija

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-8	Standard practice for reporting thermaanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse: Begriffe

▼B**A.3. SANTYKINIS TANKIS****1. METODAS**

Apibūdintieji metodai yra pagrįsti OECD Test Guideline (1). Pagrindiniai principai yra pateikti 2 nuorodoje.

1.1. ĮVADAS

Apibūdintieji santykinio drėgnumo nustatymo metodai yra be apribojimų taikomi kietosioms ir skystosioms medžiagoms atsižvelgiant į jų grynumo laipsnį. Naudojami metodai pateikti 1 lentelėje.

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Kietųjų kūnų arba skysčių santykinis tankis D_4^{20} yra tikrinamos medžiagos tūrio masės, nustatytos 20 °C temperatūroje, santykis su tokio paties tūrio vandens mase, nustatyta 4 °C temperatūroje. Santykinis tankis dimensijos neturi.

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

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

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS (1) (3)

Nebūtina etalonines medžiagas naudoti visais atvejais, kai tyrinėjama nauja medžiaga. Pirmiausia jos turėtų būti naudojamos kartkartėmis tikrinant metodo veikimą ir lyginant gautus rezultatus su kitais metodais gautais rezultatais.

1.4. METODŲ ESME

Naudojamos keturios metodų klasės.

1.4.1. Plūdrumo metodai**1.4.1.1. *Areometras* (skystosioms medžiagoms)**

Tankis gali būti pakankamai tiksliai ir greitai nustatomas plūduriuojančiu areometru, kuriuo įmanoma nustatyti skysčio tankį pagal imersijos gylį remiantis graduotos skalės parodymais.

1.4.1.2. *Hidrostatinė pusiausvyra* (skystosioms ir kietosioms medžiagoms)

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

Kietiesiems kūnams matuojamas tankis – tai vienintelis naudoto konkretaus mėginio pavyzdys. 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.

▼B**1.4.2. Piknometro 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 palyginimo piknometras (kietiesiems kūnams)

Bet kokios formos kietojo kūno tankį galima išmatuoti kambario temperatūroje su dujų palyginimo piknometru. Medžiagos tūris matuojamas įvairiai kalibruotame tūrio cilindre ore arba inertinėse dujose. Užbaigus tūrio matavimą, tankio apskaičiavimams vieną kartą matuojama masė.

1.4.4. Virpesių densitometras (5) (6) (7)

Skysčio tankis gali būti matuojamas virpesių densitometru. U raidės formos mechaninis osciliatorius vibruojamas osciliatoriaus rezonanso dažniu, kuris priklauso nuo jo masės. Dedant mėginio, keičiasi osciliatoriaus rezonanso 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. METODŲ 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,

— tikslios medžiagos charakteristikos (identiškas ir priemaišos) bei išankstinio gryninimo, jeigu toks naudojamas, stadija.

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

Pateikiama visa informacija ir pastabos, svarbios aiškinant rezultatus, kuriuos reikia pateikti ataskaitoje, ypač atsižvelgiant į priemaišas ir medžiagos fizinę būseną.

▼ B

Lentelė

Metodų pritaikymas

Matavimo metodas	Tankis		Didžiausia galima dinaminė klampa	Galiojantis standartas
	Kietieji kūnai	Skysčiai		
1.4.1.1. Areometras	Taip	Taip	5 Pa s	ISO 387 ISO 649-2 NF T 20-050
1.4.1.2. Hidrostatinė pusiausvyra		Taip	5 Pa s	ISO 1183 (A)
a) kietieji kūnai				ISO 901 ir 758
b) skysčiai		Taip	20 Pa s	DIN 53217
1.4.1.3. Panardintų kūnų metodas	Taip	Taip	500 Pa s	ISO 3507 ISO 1183(B) NF T 20-053
1.4.2. Piknometras		Taip	500 Pa s	ISO 758
a) kietieji kūnai				DIN 55990 Teil 3 DIN 53243
b) skysčiai		Taip	5 Pa s	
1.4.3. Oro palyginamasis piknometras	Taip			
1.4.4. Virpesių densitometras		Taip	5 Pa s	

4. **LITERATŪRA**

- 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.II, 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 Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, p. 253–255.

▼ B

Priedėlis

Papildomos techninės informacijos, pavyzdžiui, galima ieškoti šiuose standartuose:

1. **Klumpumo metodai**

1.1. Areometras

DIN 12790, ISO 387	Areometras; bendrosios instrukcijos
DIN 12791	I dalis. Tankio areometrai; konstrukcija II dalis. Tankio areometrai; standartizuoti matmenys, paskirtis III dalis. Naudojimas ir tyrimas
ISO 649-2	Laboratoriniai stikliniai indai. Bendros paskirties tankio areometrai
NF T 20-050	Cheminiai produktai pramoniniam naudojimui. Skysčių tankio Nustatymas. Areometrinis metodas
DIN 12793	Laboratoriniai stikliniai indai: intervalo nustatymo areometrai

1.2. Hidrostatinė pusiausvyra

Kietosioms medžiagoms

ISO 1183	A metodas. Plastikų tankio ir santykinio tankio nustatymo metodai, išskyrus aktyvų plastiką
NF T 20-049	Cheminiai produktai pramoniniam naudojimui. Kietųjų kūnų, išskyrus miltelių ir aktyvų medžiagų, tankio nustatymas. Hidrostatinės pusiausvyros metodas
ASTM-D-792	Plastmasių savitasis sunkis ir tankis
DIN 53479	Plastmasių ir elastinių medžiagų tyrimas; tankio nustatymas

Skystosioms medžiagoms

ISO 901	ISO 758

▼B

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 Nevalytos naftos ir skystų naftos produktų tankio, savitojo sunkio arba API sunkio nustatymas areometrijos metodu

BS 4714 Nevalytos naftos ir skystų naftos produktų tankio, savitojo sunkio arba API sunkio nustatymas areometrijos 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 skysčiams, kurie nėra per klampūs)

DIN 12798 *Lipkin* piknometras (skysčiams, kurių kinematinė klampa mažesnė kaip $100 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ 15 °C temperatūroje)

DIN 12800 *Sprengel* piknometras (skysčiams kaip DIN 12798)

DIN 12801 *Reischauer* piknometras (skysčiams, kurių kinematinė klampa mažesnė kaip $100 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ 20 °C temperatūroje, taip pat taikoma angliavandeniams ir vandens tirpalams su aukštesniu garų slėgiu, apytiksliai 1 baras 90 °C temperatūroje)

▼B

DIN 12806	<i>Hubbard</i> piknometras (visų rūšių klampiems skysčiams, kurių slėgis nėra per aukštas, ypač dažams, lakui ir bitumui)
DIN 12807	<i>Bingham</i> piknometras (skysčiams, kaip DIN 12801)
DIN 12808	<i>Jaulmes</i> piknometras (ypač etanoliui ir vandens tirpalui)
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. Halogenizuoti organiniai junginiai
BS 4699	Naftos produktų savitojo sunkio ir tankio nustatymo metodas (graduoto bikapiliarinio 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

▼B

2.2. Kietosioms medžiagoms

ISO 1183	B metodas. Plastikų, išskyrus aktytųjų, tankio ir santykinio tankionustatymo metodai
NF T 20-053	Cheminiai produktai pramoniniam naudojimui. Milteliuose ir skysčiuose esančių kietųjų dalelių tankio nustatymas. Piknometro metodas
DIN 19683	Dirvožemių tankio nustatymas

3. **Oro palyginimo piknometras**

DIN 55990	3 dalis: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
DIN 53243	Anstrichstoffe; chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼ **M1****A.4. GARŲ SLĖGIS****1. METODAS**

Šis metodas atitinka OECD TG 104 (2004).

1.1. ĮVADAS

Į pataisytą 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 %	$10^3 \text{ Pa} - 2 \times 10^3 \text{ Pa}$ $2 \times 10^3 \text{ Pa} - 10^5 \text{ Pa}$
Statinis metodas	Taip	Taip	5–10 %	5–10 %	$10 \text{ Pa} - 10^5 \text{ Pa}$ $10^{-2} \text{ Pa} - 10^5 \text{ Pa}^{(1)}$
Izoteniskopo metodas	Taip	Taip	5–10 %	5–10 %	$10^2 \text{ Pa} - 10^5 \text{ Pa}$
Efuzijos metodas: garų slėgio pu- siausvyra	Taip	Taip	5–20 %	iki 50 %	$10^{-3} - 1 \text{ Pa}$
Efuzijos metodas: <i>Knudseno</i> kamera	Taip	Taip	10–30 %	—	$10^{-10} - 1 \text{ P}$
Efuzijos metodas: izoterminė termo- gravimetrija	Taip	Taip	5–30 %	iki 50 %	$10^{-10} - 1 \text{ Pa}$
Dujų soties metodas	Taip	Taip	10–30 %	iki 50 %	$10^{-10} - 10^3 \text{ Pa}$
Sukamojo rotoriaus metodas	Taip	Taip	10–20 %	—	$10^{-4} - 0,5 \text{ Pa}$

(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:

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

čia:

p = garų slėgis Paskaliais

ΔH_v = garavimo šiluma J mol⁻¹

R = universalioji dujų konstanta, 8,314 J mol⁻¹ K⁻¹

T = temperatūra K.

▼ **M1**

1.4. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

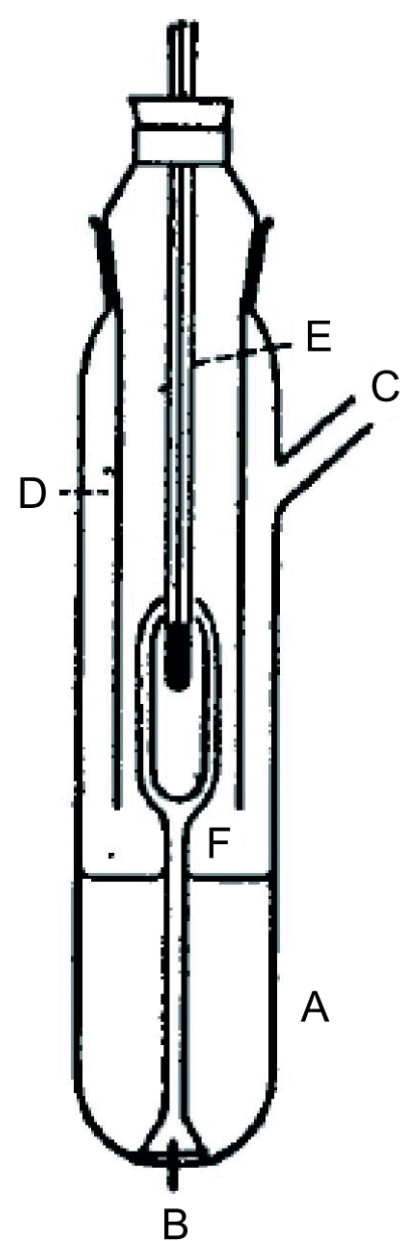
Etaloninių medžiagų naudoti nebūtina. Visų pirma, jos skirtos kartkarčiais patikrinti metodo taikomąsias savybes ir lyginti skirtingais metodais gautus rezultatus.

1.5. METODŲ APRAŠYMAS

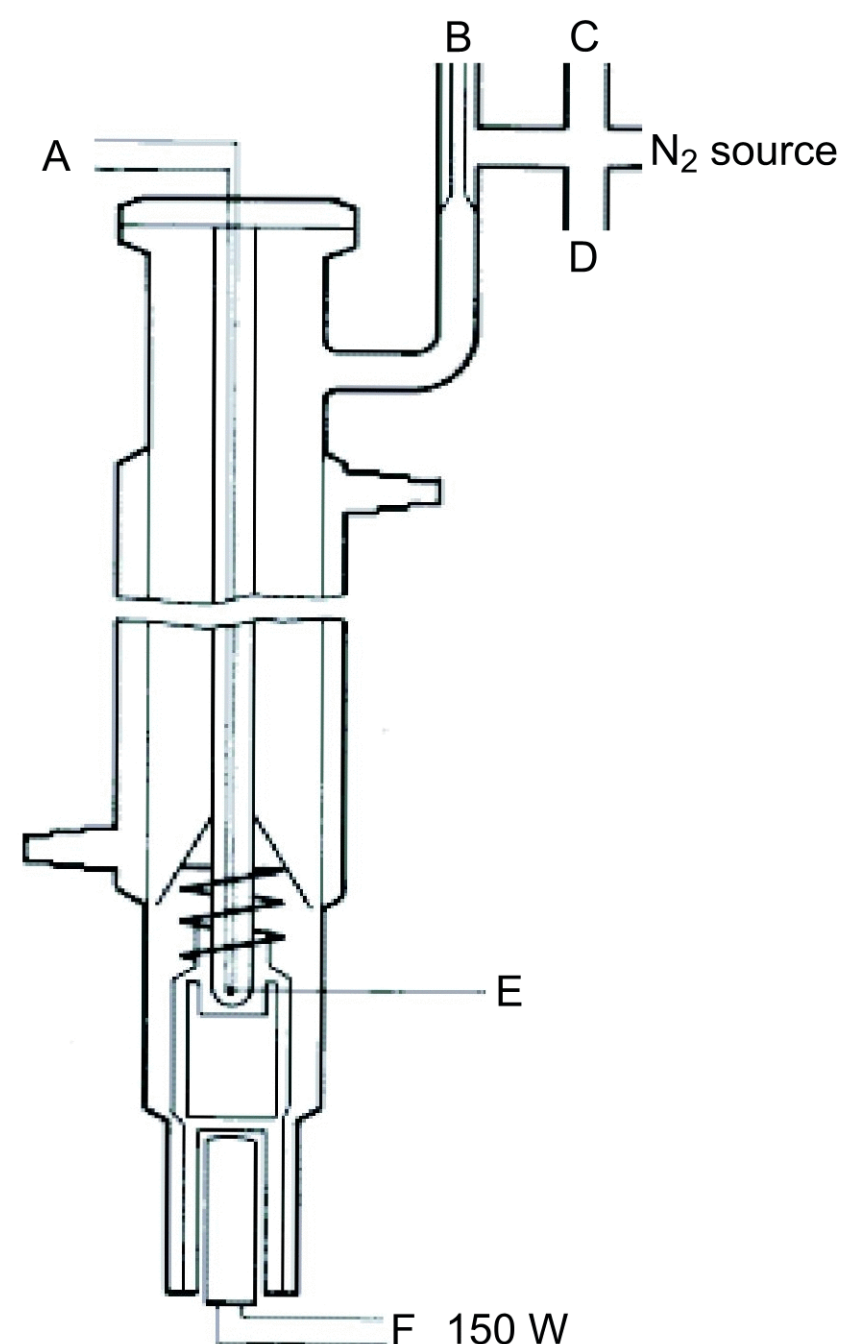
1.5.1. **Dinaminis metodas (Cottrell'o metodas)**1.5.1.1. *Metodo esmė*

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 $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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: Vakuomo 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 jungė 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 nудujinama. 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 pasiekama, kai pastoviam 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.

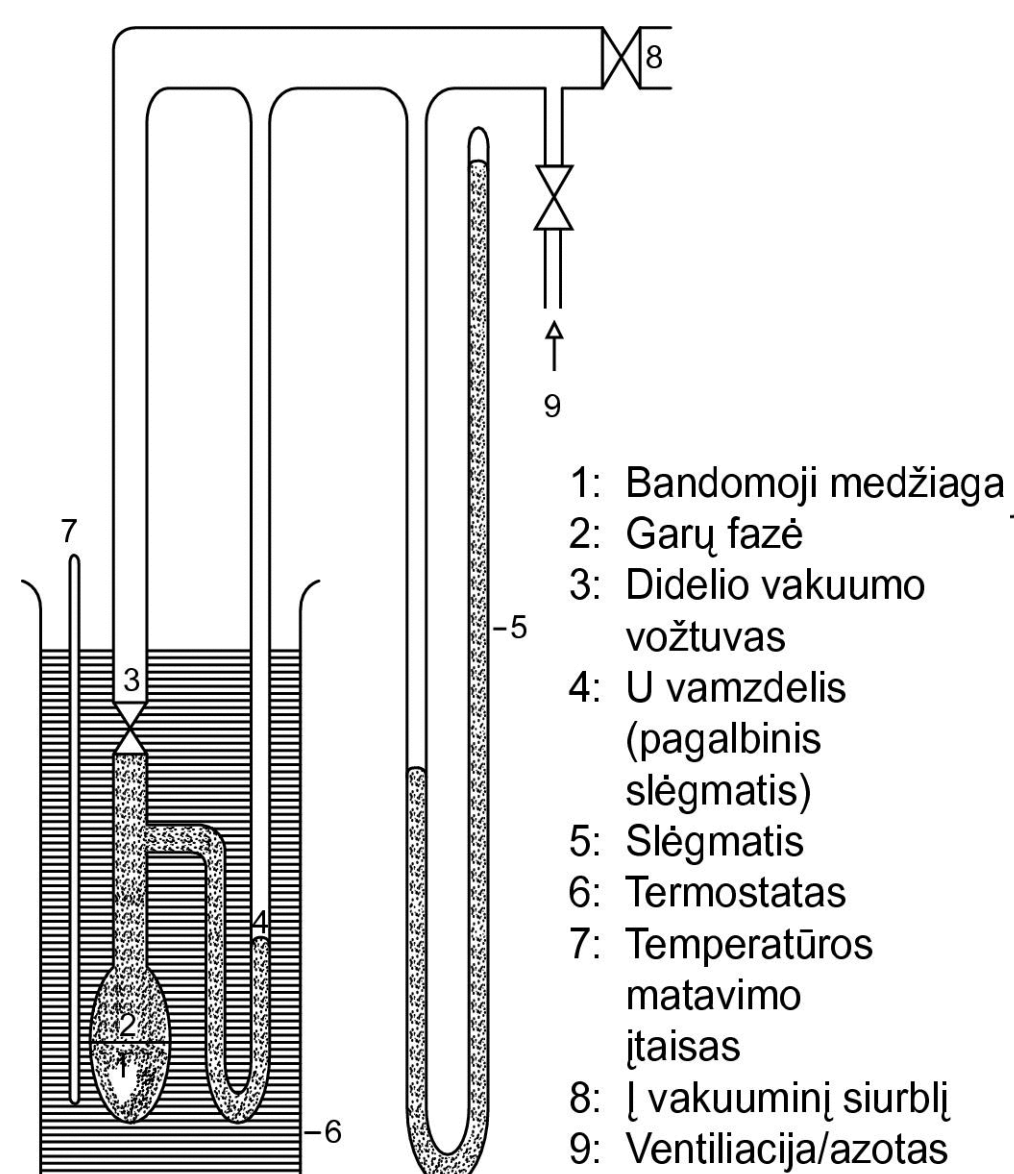
▼ **M1**1.5.2.2. *Aparatūra*

Įrangą sudaro pastovios temperatūros vonia (preciziškumas $\pm 0,2$ 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 mažesniai kaip 10^2 Pa slėgiui matuoti ir kaitinamos membranos talpiniai manometrai tinka matuoti net mažesnę kaip 10^{-1} Pa slėgį. Matuojama indo su ėminiu išorinės sienelės temperatūra arba temperatūra pačiame inde.

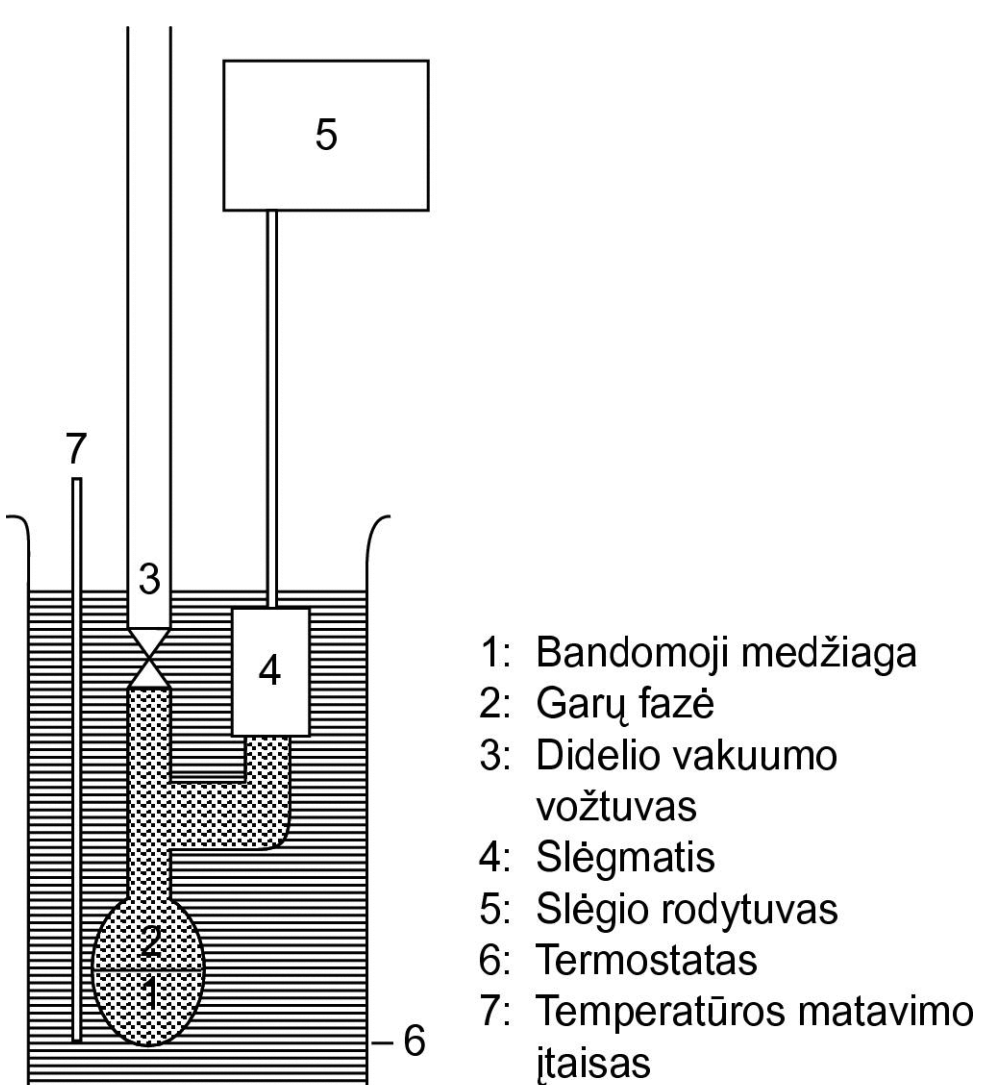
1.5.2.3. *Darbo eiga*

Naudodami 3a paveiksle pavaizduotą aparatą, pripildykite U vamzdelį pasirinktu skysčiu, kuris turi būti nудujintas aukštesnėje temperatūroje prieš užrašant rodmenis. Bandomoji medžiaga dedama į aparatą ir nудujinama žemesnėje temperatūroje. Jei ėminys daugia-komponentis, temperatūra turėtų būti pakankamai žema, kad negalėtų pakisti medžiagos sudėtis. Pusiausvyra greičiau pasiekama 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 siurbiamas orui pašalinti. Prireikus nудujinimas 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 nudojinant 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.

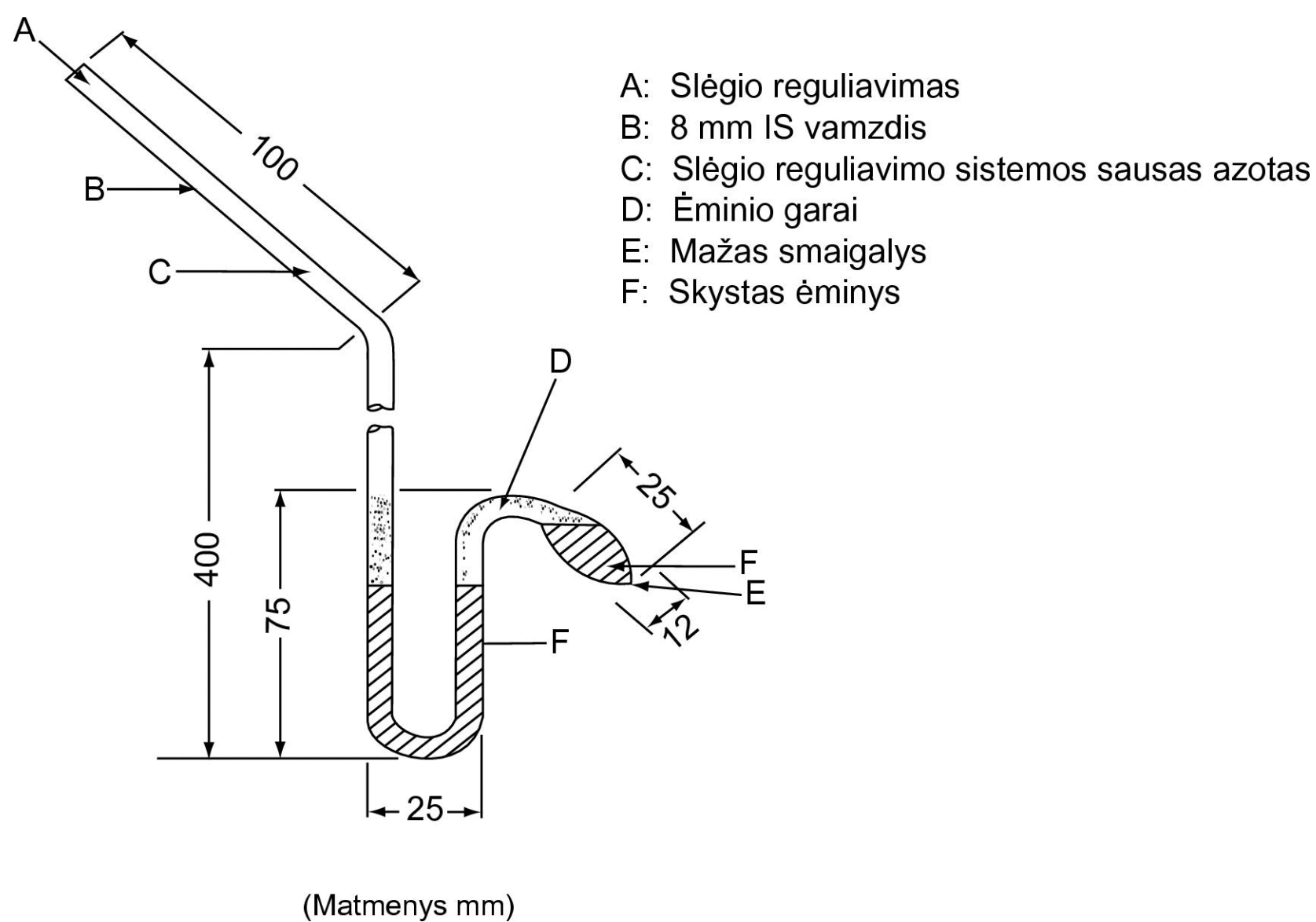
1.5.3.2. *Aparatūra*

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 subęgtų 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., polisi-loksaniniai 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 skylių išeinantys medžiagos garai nukreipiami į svarstyklį, kurios irgi yra po išsiurbtu gaubtu, lėkštę. Pagal kai kurias schemas svarstyklį lėkštę 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 svarstyklį 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 ($\text{kg s}^{-1} \text{ m}^{-2}$)

M = molinė masė (g mol^{-1})

T = temperatūra (K)

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

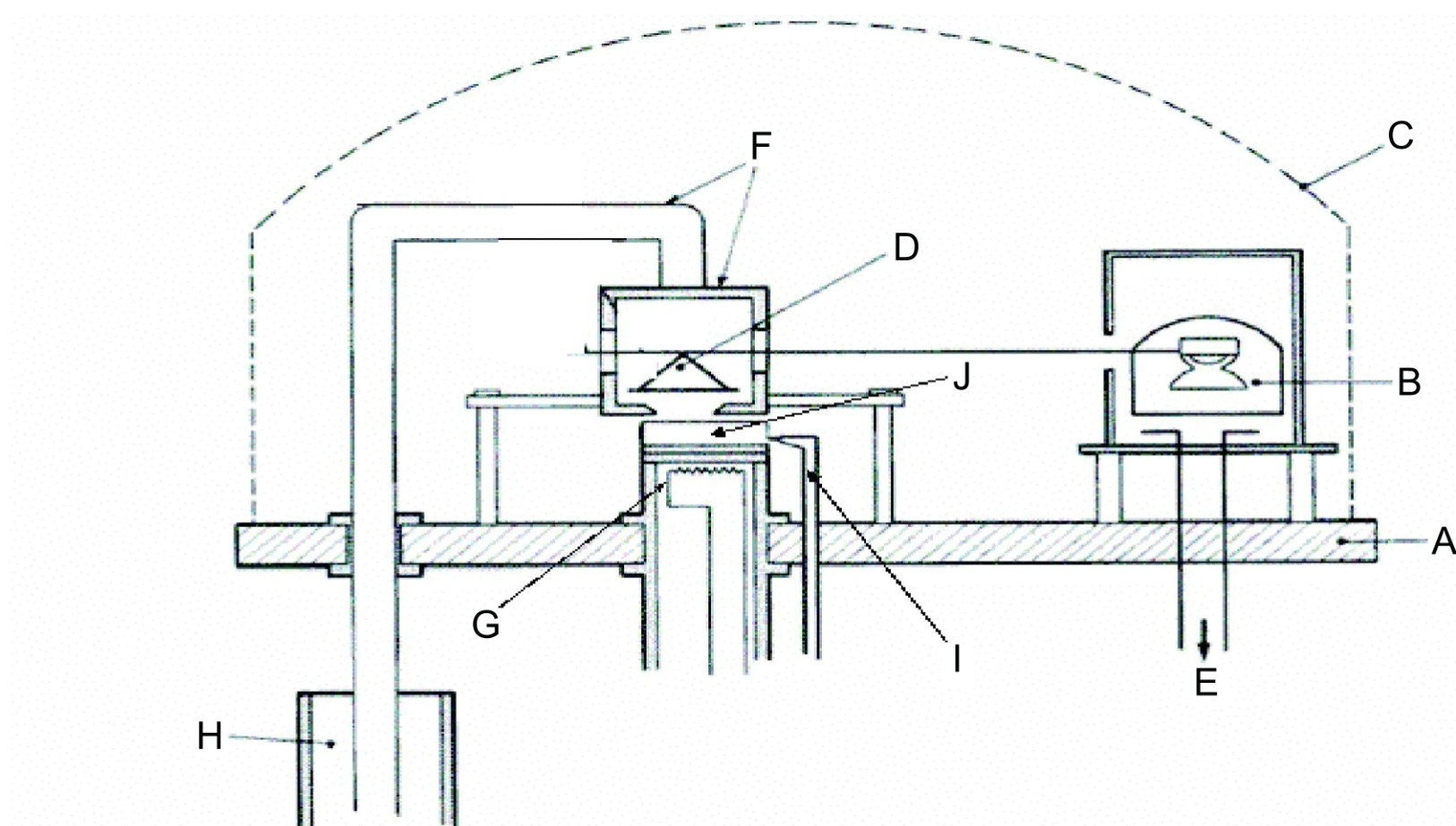
P = garų slėgis (Pa)

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	F:	Šaldymo kamera ir šaldymo strypas
B:	Judamosios ritės prietaisas	G:	Garavimo krosnis
C:	Gaubtas	H:	Diuro indas su skystu azotu
D:	Svarstyklės ir jų lėkštė	I:	Ėminio temperatūros matuoklis
E:	Vakuometras	J:	Bandomoji medžiaga

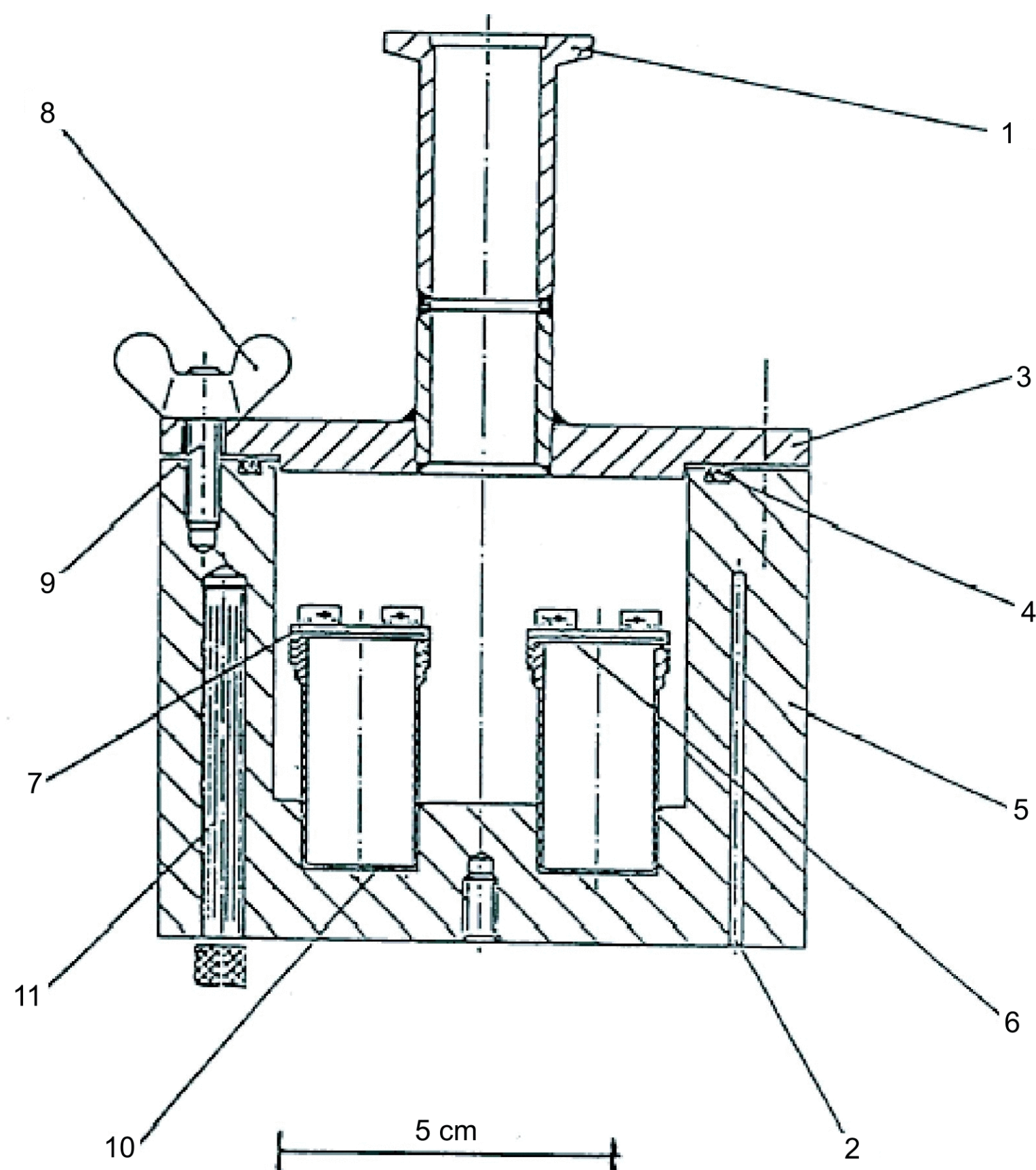
▼ **M1****1.5.5. Efuzijos metodas: Knudseno kamera****1.5.5.1. Metodo esmė**

Taikant metodą, įvertinama bandomosios medžiagos masė, per laiko vienetą ištekanti garų pavidalu iš *Knudseno* kameros (8) per mažą angą ypač didelio vakuumo sąlygomis. Ištekantių 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	7: Užsukamas dangtelis
2: Lizdai platinos varžiniam termometrai arba temperatūrai matuoti ir reguliuoti	8: Sparnuotosios veržlės
3: Vakuuminio indo dangtis	9: Varžtai
4: Žiedinis tarpiklis	10: Efuzijos kameros iš nerūdijančiojo plieno
5: Vakuuminis indas iš aliuminio	11: Kaitinimo elementas
6: Įtaisas efuzijos kameroms įdėti ir išimti	

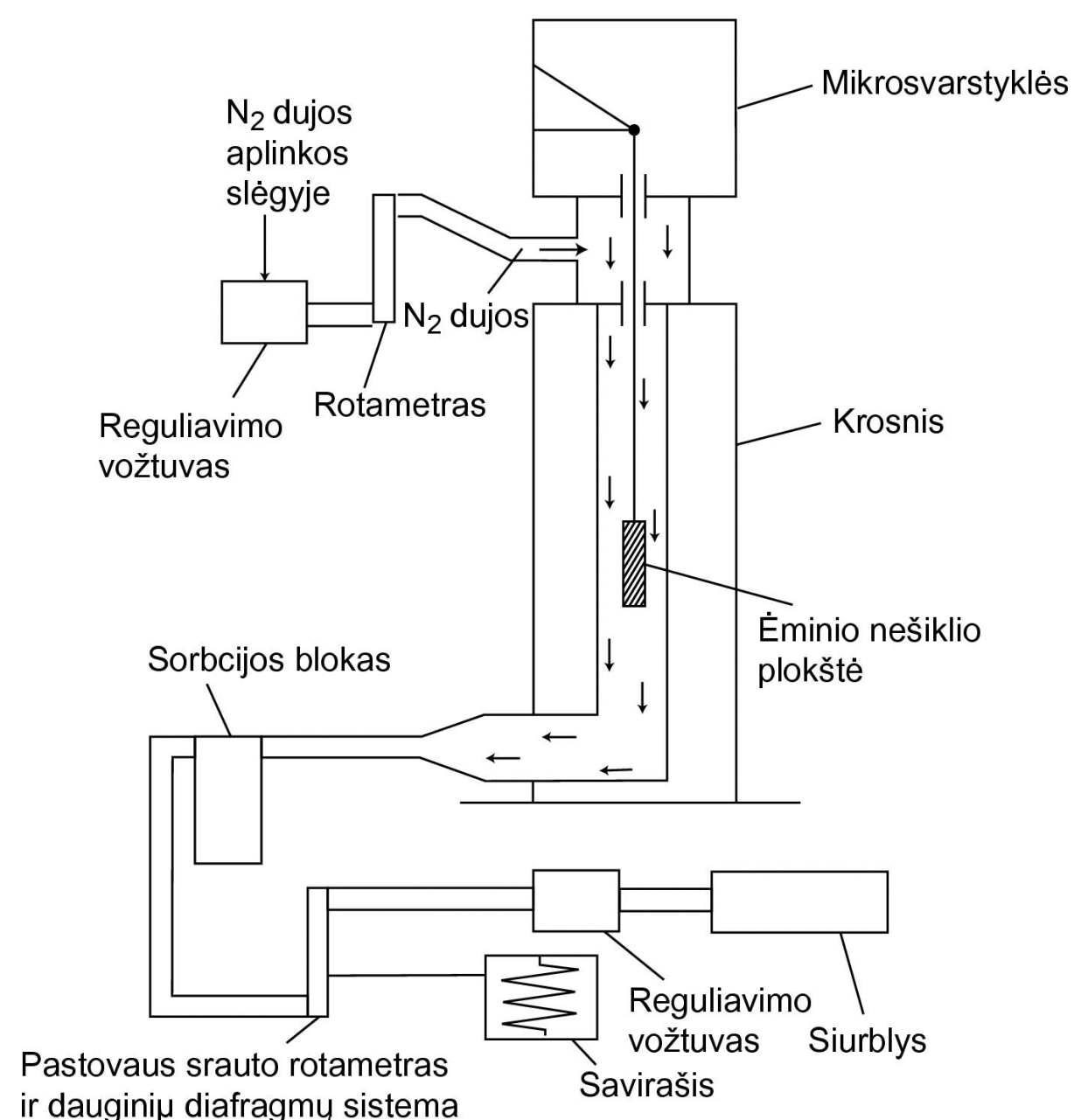
▼ **M1**1.5.6. **Efuzijos metodas: izoterminė termogravimetrija**1.5.6.1. *Metodo esmė*

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 mikrovarstyklių reguliuojamos temperatūros kameroje, nupučiama sauso azoto srove, kuri išneša bandomąją medžiagą. Iš kameros išėjus 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:

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

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.

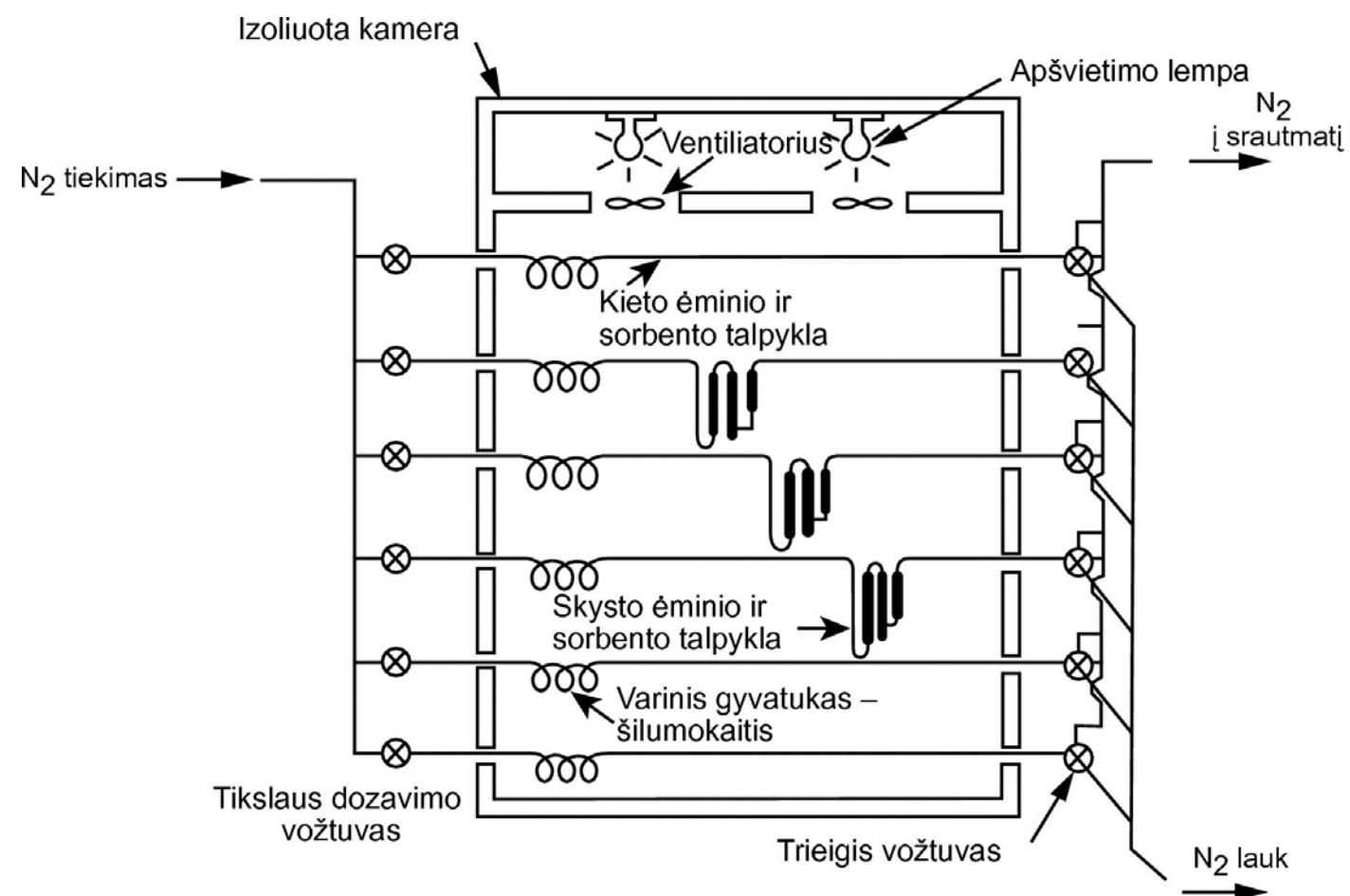
Dujų soties metodas tinka kietosioms arba skystosioms cheminėms medžiagoms. Jis gali būti taikomas garų slėgiui iki 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). Metodo patikimumas didžiausias, kai garų slėgis yra mažesnis kaip 10^3 Pa. Kai jis yra didesnis kaip 10^3 Pa, paprastai gaunamos padidintos garų slėgio 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 $\pm 0,5$ °C arba geresniu tikslumu.

▼ **M1**

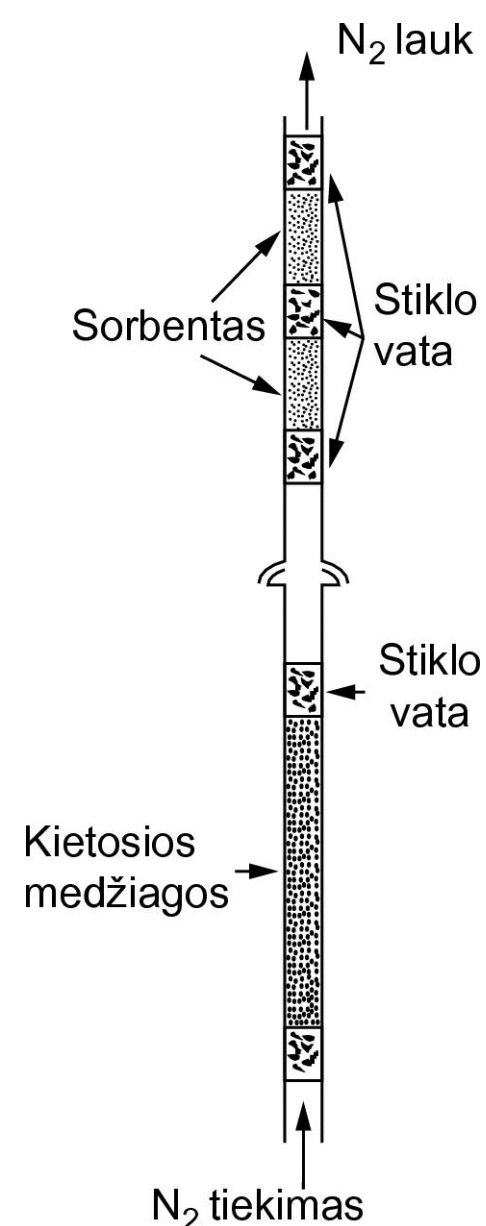
8 paveikslas



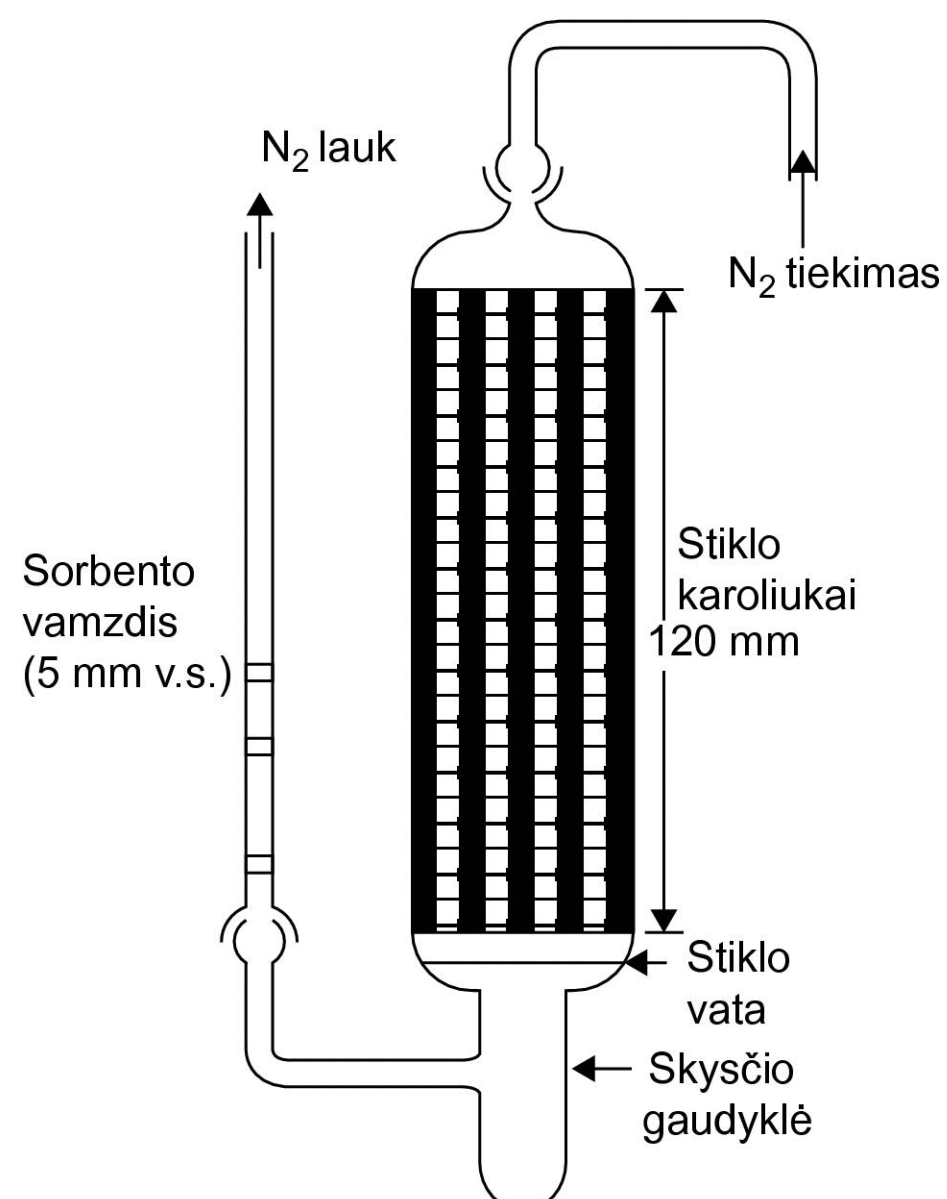
Dažniausiai kaip inertinis nešiklis naudojamos azoto dujos, bet kartais gali tekti naudoti kitas dujas (24). Nešiklio dujos turi būti sausas. Dujų srautas dalijamas į 6 srautus, reguliuojamus adatiniais vožtuvais (anga maždaug 0,79 mm), ir teka į kamerą per 3,8 mm v. s. varinius vamzdžius. Pasiekus temperatūros 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 talpykla. Pagal kitą būdą nešiklio dujos gali būti leidžiamos per didelio aktytumo 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 CO₂ 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 (m³)

R = universalioji dujų konstanta 8,314 (J mol⁻¹ K⁻¹)

T = temperatūra (K)

M = bandomosios medžiagos molinė masė (g mol⁻¹)

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

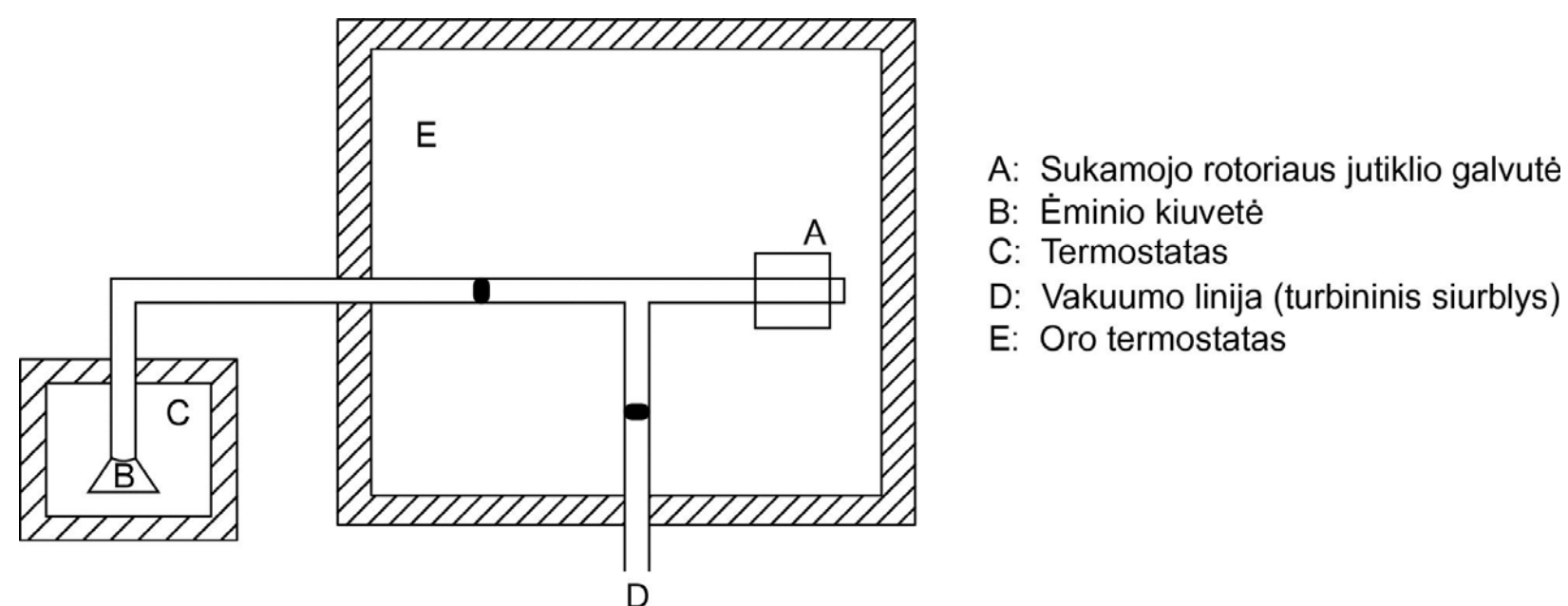
▼ **M1**1.5.8. **Sukamasis rotorius**1.5.8.1. *Metodo esmė*

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

1.5.8.2. *Aparatūra*

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

11 paveikslas

2. **DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS**2.1. **DUOMENYS**

Garų slėgis, gautas taikant bet kurį iš pirmiau pateiktų metodų, turėtų būti nustatytas bent dviem temperatūros vertėms. Siekiant patikrinti garų slėgio kreivės tiesiškumą, pageidautina slėgį nustatyti trimis 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 būti 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., Stambach, 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****IVADAS**

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).

▼ B**A.5. PAVIRŠIAUS ĮTEMPIS****1. METODAS**

Apibūdintieji metodai yra pagrįsti OECD Test Guideline (1). Pagrindiniai principai pateikti 2 nuorodoje.

1.1. ĮVADAS

Apibūdintieji metodai turi būti taikomi vandeninių tirpalų paviršiaus įtempties matavimuose.

Naudinga prieš atliekant šiuos bandymus 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 cikliniu tenzometru apsiribojama vandeniniais tirpalais, kurių dinaminis klampumas mažesnis negu apytikriai 200 mPa s.

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Gibso paviršiaus energija vienam paviršiaus vienetui laikoma 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 nebevartojamose cgs sistemoje

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

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

Etaloninės medžiagos, kurios įeina į didelę grupę paviršiaus įtempčių, pateiktos 1 ir 3 nuorodose.

1.4. METODŲ ESMĖ

Šie metodai yra pagrįsti matavimais didžiausios jėgos, reikalingos vertikaliai įtempti ant ašelės 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 pavienei koncentracijai.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

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

▼B

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. **Anodinis metodas**

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

1.6.2. **Ąselės metodas**

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

1.6.3. **Žiedo metodas**

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

1.6.4. **OECD suderintas cirkuliarinis metodas**1.6.4.1. *Aparatūra*

Parduodami tenzometrai tinka šiems matavimams. Juos sudaro šie elementai:

— kilnojamasis mėginio stalelis,

— matavimo sistema,

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 mėginio stalelio. Jėgos matavimo paklaida neturi viršyti $\pm 10^{-6}$ N, atitinkančią paklaidos ribą $\pm 0,1$ 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.

▼ **B**

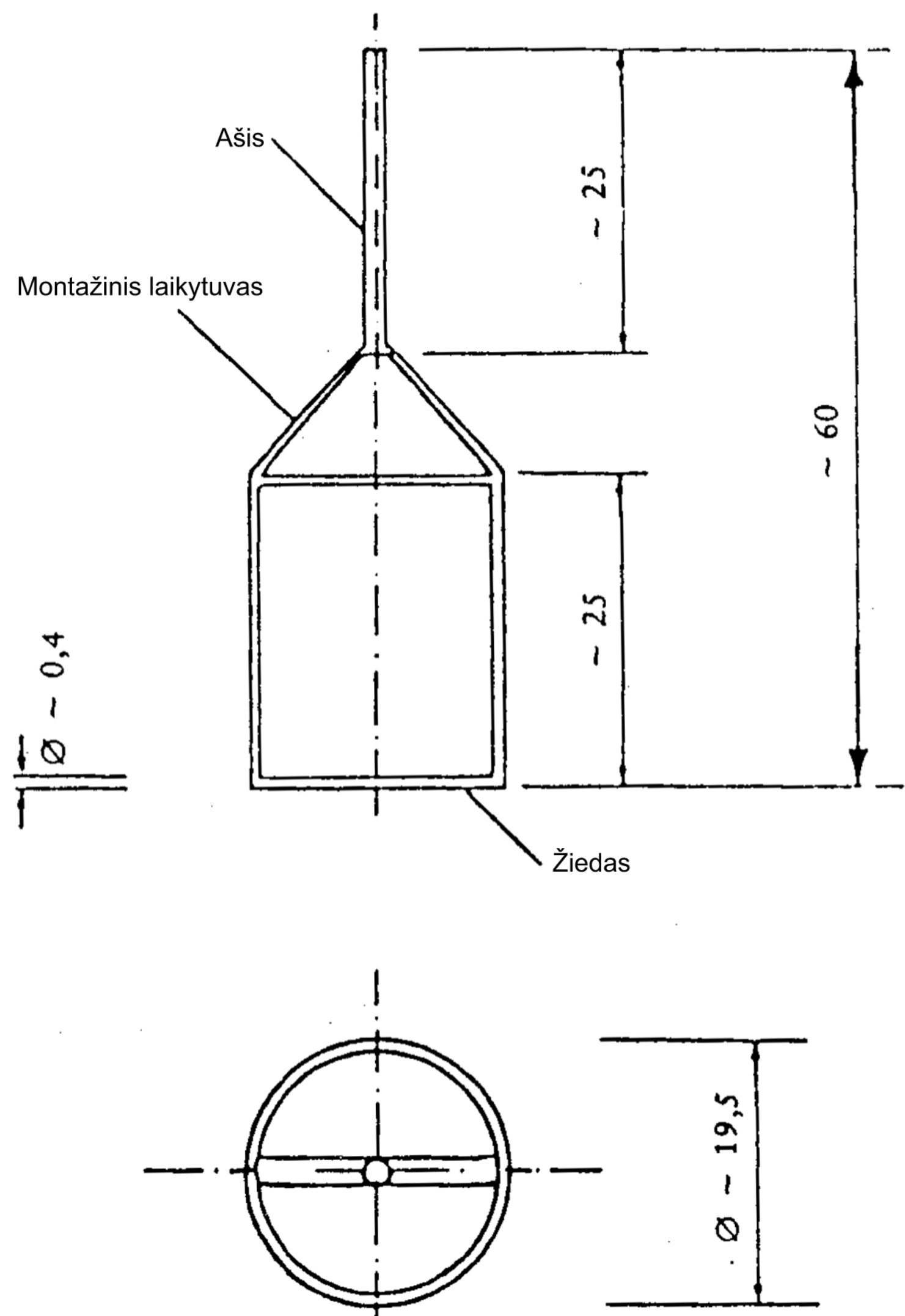
1.6.4.1.3. Matavimo kūnas (žiedas)

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 mėginys negaruotų. Tinka cilindriniai stikliniai indai, kurių vidinis skersmuo ne mažesnis kaip 45 mm.

▼B1.6.4.2. *Aparatūros paruošimas*1.6.4.2.1. *Valymas*

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

Žiedas iš pradžių turi būti gerai nuskalaujamas vandeniu, kad būtų pašalinamos bet kokios vandenyje tirpios medžiagos, trumpam pamerkiamas į chromo sieros rūgštį, nuplaunamas du kartus distiliuotu vandeniu, kol bus gaunama neutrali reakcija, ir galiausiai lengvai pašildomas virš metanolio liepsnos.

Pastaba

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

1.6.4.2.2. *Aparato kalibravimas*

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

Montažas

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 naudojant dvi darbo eigas:

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

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a}$$

kai:

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

m = pasvarėlio masė (g)

g = sunkio greitėjimas (981 cm s⁻² jūros lygyje)

b = vidutinis žiedo perimetras (cm)

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

▼ B

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

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

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g}$$

kai:

σ_o = nuorodoje apie vandens paviršiaus įtęptį nurodyta vertė (mN/m)

σ_g = nuorodoje apie vandens paviršiaus įtęptį nurodyta vertė (mN/m) Abi tokioje pat temperatūroje

1.6.4.3. *Mėginių paruošimas*

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

Tirpalas turi būti laikomas pastovioje temperatūroje ($\pm 0,5$ °C). Kadangi tirpalo, esančio matavimo inde, paviršiaus įtęptis kinta laike, atliekami keli matavimai skirtingu laiku ir brėžiama kreivė, parodanti paviršiaus įtęptį kaip laiko funkciją. Jeigu niekas toliau nesikeičia, tai pusiausvyros būseną 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 $\pm 0,5^\circ$ C ribose.

1.6.6. **Bandymo vykdymas**

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 aukštin, 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 įtępties vertė. Kiekvienam nustatymui užrašomas tirpalo perpylimo į matavimo indą laikas. Matavimai užrašomi esant maksimaliai jėgai, reikalingai atskirti žiedą nuo skysčio paviršiaus.

▼ B

2. **DUOMENYS**

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

Harkins ir Jordan (4) paviršiaus įtempties vertėms, matuotoms žiedo metodu, empiriškai nustatė 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, $\rho \equiv 1 \text{ g/cm}^3$

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

Eksperimentinė vertė (mN/m)	Koreguotoji vertė (mN/m)	
	Svorio kalibravimas (žr. 1.6.4.2.2 (a))	Vandens kalibravimas (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

▼ B

Eksperimentinė vertė (mN/m)	Koreguotoji vertė (mN/m)	
	Svorio kalibravimas (žr. 1.6.4.2.2 (a))	Vandens kalibravimas (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 $p = 1 \text{ g/cm}$) DIN standartą (DIN 53914) ir taikoma pardavinėjamam žiedui, kurio dimensijos $R = 9,55 \text{ mm}$ (vidutinis žiedo spindulys) ir $r = 0,185 \text{ mm}$ (žiedo laido spindulys). Lentelėje yra pateiktos koreguotos paviršiaus įtempties matavimų vertės, paimitos po kalibravimo su svoriais arba kalibravimo su vandeniu.

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

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

kai:

F = jėga, matuota dinamometru plėvelės nutrūkimo taške

R = žiedo spindulys

f = korekcijos koeficientas (1)

3. ATASKAITOS PATEIKIMAS

3.1. BANDYMO ATASKAITA

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

- naudotas metodas,
- naudoto vandens arba tirpalo rūšis,
- tikslus ir išsamus medžiagos apibūdinimas (identiškas ir priešingas),
- matavimo rezultatai: paviršiaus įtemptis (parodymai), nurodant tiek atskirus parodymus ir jų aritmetinį vidurkį, tiek koreguotą vidurkį (atsižvelgiant į įrangą ir korekcijos lentelę),

▼B

- tirpalo koncentracija,
- bandymo temperatūra,
- naudoto tirpalo amžius; ypač laikas nuo paruošimo iki tirpalo matavimo,
- paviršiaus įtempties priklausomybės nuo laiko perpylus tirpalą į matavimo indą apibūdinimas,
- visa informacija ir pastabos, svarbios rezultatų, apie kuriuos reikia pranešti, 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. LITERATŪRA

- 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.

▼B**A.6. TIRPUMAS VANDENYJE****1. METODAS**

Apibūdintasis metodas yra pagrįstas OECD Test Guideline (1).

1.1. ĮVADAS

Šiam bandymui atlikti naudinga turėti išankstinių duomenų apie medžiagos struktūrinę formulę, garų slėgį, disociacijos konstantą ir hidrolizę (pH funkciją).

Nėra atskiro metodo, apimančio visą tirpumo vandenyje intervalą.

Du toliau apibūdinti bandymų metodai apima visą tirpumo intervalą bet nėra taikytini lakiosioms medžiagoms:

— vienas, taikomas iš tikrųjų grynomis mažo tirpumo medžiagoms (< 10 gramų viename litre), ir kurios stabilios vandenyje, nurodytas kaip „kolonėlės eliuavimo metodas“,

— kitas, kuris taikomas iš tikrųjų grynomis didesnio tirpumo medžiagoms (> 10 gramų viename litre) ir kurios yra pastovios vandenyje, nurodytas kaip „kolbos metodas“.

Tiriamosios medžiagos tirpumą vandenyje gali stipriai paveikti joje esančios priemaišos.

1.2. APIBRĖŽIMAS IR VIENETAI

Medžiagos tirpumas vandenyje yra apibrėžiamas medžiagos soties masės koncentracija vandenyje tam tikroje temperatūroje. Tirpumas vandenyje yra apibrėžiamas masės vienetais tirpalo tūryje. SI vienetai – tai kg/m (taip pat gali būti naudojama gramai litre).

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

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

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Apytikris bandinio kiekis ir laikas, reikalingas soties masės koncentracijai gauti, turėtų būti nustatomas paprastu išankstiniu bandymu.

▼B

1.4.1. Kolonėlės reliuavimo metodas

Šis metodas pagrįstas bandomosios medžiagos eliuavimu su vandeniu iš mikrokolonėlės, pakrautos inertine indiferentine medžiaga, pavyzdžiui, stiklo rutuliukais arba smėliu, padengta bandomosios medžiagos pertekliumi. Tirpumas vandenyje yra nustatomas tada, kai eliuato masės koncentracija yra pastovi. Tai parodoma koncentracijos kreivės plokščiąja dalimi kaip laiko funkcija.

1.4.2. Kolbos metodas

Šiuo metodu medžiaga (kietosios medžiagos turi būti pulverizuojamos) ištirpinama vandenyje, kurio temperatūra šiek tiek aukštesnė negu bandymo temperatūra. Pasiekus sotį, mišinys ataušinamas ir laikomas bandymo temperatūroje, maišant tiek, kiek to reikia pusiausvyrai pasiekti. Matavimas gali būti atliekamas ir tiesiogiai bandymo temperatūroje, jeigu tinkamu bandinių parinkimu užtikrinama, kad bus pasiekta soties pusiausvyra. Po to medžiagos masės koncentracija vandeniniame tirpale, kuriame neturi būti jokių neištirpusių dalelių, yra nustatoma atitinkamu analitiniu metodu.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

1.5.1. Pakartojamumas

Kolonėlės eliuavimo metodu pakartojamumas gali būti < 30 %; kolbos metodu turėtų būti nustatoma < 15 %.

1.5.2. Jautrumas

Tai priklauso nuo analizės metodo, bet masės koncentracija gali būti nustatoma iki 10^{-6} gramų viename litre.

1.6. METODO APIBŪDINIMAS

1.6.1. Bandymo sąlygos

Bandymą geriau atlikti $20 \pm 0,5$ °C temperatūroje. Jeigu manoma, kad tirpumas priklauso nuo temperatūros (> 3 % vienam °C), turėtų būti taip pat naudojamos dar dvi temperatūros vertės, ne mažiau kaip 10 °C didesnė ir mažesnė už iš pradžių pasirinktą temperatūrą. Tokiu atveju temperatūra turėtų būti kontroliuojama $\pm 0,1$ °C ribose. Pasirinktoji temperatūra turėtų būti išlaikoma pastovi visose svarbiose įrangos dalyse.

1.6.2. Išankstinis bandymas

Į apytikriai 0,1 g bandinio (kietosios medžiagos turi būti pulverizuojamos), esančio stikliniu kamščiu užkimštame 10 ml graduotame cilindre kambario temperatūroje, palaipsniui pilami vis didesni distiliuoto vandens tūriai, nurodyti žemiau pateiktoje lentelėje:

0,1 g, ištirpstantis „x“ ml vandens	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Apytikris tirpumas (gramai litre)	> 1 000	1 000–200	200–100	100–50	50–10	10–1	< 1

▼B

Kiekvieną kartą įpylus nurodytą kiekį vandens, mišinys stipriai kratomas 10 minučių ir vizualiai tikrinama, ar nėra neištirpusių mėginio dalelių. Jeigu, pridėjus 10 ml vandens, mėginys arba jo dalys neištirpsta, eksperimentas turi būti pakartojamas 100 ml matavimo cilindre su didesniais tūriais vandens. Jeigu tirpumas mažesnis, laikas, reikalingas medžiagai ištirpinti, gali būti žymiai ilgesnis (turėtų būti skiriamos ne mažiau kaip 24 valandos). Apytikris tirpumas lentelėje yra pateiktas tokiaame įdedamo vandens tūryje, kuriame mėginys visiškai ištirpsta. Jeigu medžiaga vis tiek yra akivaizdžiai netirpi, turėtų būti skiriama daugiau negu 24 valandos (daugiausiai 96 val.), arba reikėtų toliau skiesti, išsiaiškinant, ar turėtų būti naudojamas kolonėlės eliuavimo arba tirpumo kolboje metodas.

1.6.3. **Kolonėlės eliuavimo metodas**

1.6.3.1. *Pagalbinė medžiaga, tirpiklis ir eliuatas*

Kolonėlės eliuavimo metode pagalbinė medžiaga turėtų būti inertiška. Medžiagos, kurias galima naudoti – tai stiklo rutuliukai ir smėlis. Atitinkamas lakus tirpiklis, atitinkantis analizinio reagento kokybę, turėtų būti naudojamas bandomajai medžiagai uždėti ant pagalbinės medžiagos. Du kartus distiliuotas stikliniame arba kvarciniame aparate destiliuotas vanduo, turėtų būti naudojamas kaip eliuatas.

Pastaba

Vanduo tiesiai iš organinio jonitinio filtro neturi būti naudojamas.

1.6.3.2. *Pagalbinės medžiagos pakrovimas*

Pasveriama apie 600 mg pagalbinės medžiagos ir perpilama į 50 ml apvaliadugnę kolbą.

Tinkamas, pasvertas bandomos medžiagos kiekis ištirpinamas pasirinktame tirpiklyje. Atitinkamas šio tirpalo kiekis dedamas į pagalbinę medžiagą. Tirpiklis turi būti visiškai išgarinamas, pavyzdžiui, sukamajame garintuve; priešingu atveju pagalbinės medžiagos soties nebus pasiekta dėl pasiskirstymo reiškinių ant pagalbinės medžiagos paviršiaus.

Pagalbinės medžiagos pakrovimas gali sukelti problemų (klaidingi rezultatai), jeigu tiriamoji medžiaga yra nusodinama kaip alyva arba skirtinga kristalo fazė. Problemą reikėtų spręsti eksperimentiniu būdu ir apie tai pateikti išsamią informaciją.

Pakrauta pagalbinė medžiaga paliekama įmirkti apie dvi valandas apytikriai 5 ml vandens, po to suspensija dedama į mikrokolonėlę. Kitais atvejais pakraunama sausa pagalbinė medžiaga gali būti supilama į vandens pripildytą mikrokolonėlę, po to apie dvi valandas leidžiama nusistovėti pusiausvyrai.

Bandymo eiga

Medžiagos eliuavimas iš pagalbinės medžiagos gali būti atliekamas dviem skirtingais būdais:

— recirkuliaciniu siurbliu (žr. 1 paveikslą),

— lyginančiuoju indu (žr. 4 paveikslą).

▼B1.6.3.3. *Kolonėlės eliuavimo metodas su recirkuliaciniu siurbliu**Aparatūra*

Tipinės sistemos schema pateikta 1 paveiksle. Tinkanti mikrokolonėlė parodyta 2 paveiksle, nors tinka ir bet kokio kito dydžio, jeigu atitinka atkuriamumo ir jautrumo kriterijus. Kolonėlėje turėtų būti tiek laisvos erdvės, kad tilptų ne mažiau kaip penki vandens sluoksnio tūriai ir mažiausiai penki mėginiai. Kitais atvejais dydį galima sumažinti, jeigu naudojamas užkraunamasis tirpiklis, naudojamas pakeisti pradinius su priemaisomis pašalinamus penkis sluoksnio tūrius.

Kolonėlė turėtų būti sujungta su recirkuliaciniu siurbliu, kuriuo galima kontroliuoti apytikriai 25 ml/h srautus. Siurblys sujungiamas su politetrafluoretileno (P.T.F.E) ir(arba) stiklinėmis jungtimis. Kolonėlė ir siurblys, juos sumontavus, turėtų paimti išmetamą kiekį ir nustatyti sluoksnio tūrio pusiausvyrą atmosferos slėgyje. Į kolonėlėje esančią medžiagą papildomai dedamas nedidelis (5 mm) stiklo vatos kaištis, kuris taip pat naudojamas dalelytėms filtruoti. Recirkuliacinis siurblys, pavyzdžiui, gali būti peristaltiniu siurbliu arba membraniniu siurbliu (reikia imtis atsargumo priemonių, kad vamzdyje esanti medžiaga nebūtų užteršiama ir(arba) neįvyktų absorbcija).

Matavimo eiga

Srautas leidžiamas per kolonėlę. Rekomenduojama, kad būtų naudojamas apytikriai 25 ml/val. debitas (apibūdintai kolonėlei tai – 10 sluoksnio tūrių/val.). Pirmieji penki sluoksnio tūriai (mažiausiai) yra išpilami, kad būtų pašalinamos vandenyje tirpios priemaišos. Po to recirkuliacinis siurblys dirba tol, kol pasiekiamą pusiausvyrą, kaip nustatyta penkiais vienas po kito dedamais mėginiais, kurių koncentracijos skiriasi ne daugiau kaip $\pm 30 \%$ juos atsitiktinai parenkant. Šie mėginiai turėtų būti vienas nuo kito atskiriami laiko intervalais, kurio metu pasikeičia ne mažiau kaip 10 eliuato sluoksnio tūrių.

1.6.3.4. *Kolonėlės eliuavimo metodas su išlyginančiuoju indu**Aparatūra (žr. 3 ir 4 pav.)*

Išlyginantysis indas: išlyginančiojo indo jungtis yra padaroma iš matinio stiklo jungties, kuri sujungta PTFE vamzdeliais. Rekomenduojamas apie 25 ml/val. debitas. Viena po kitos sekančios eliuato frakcijos turėtų būti surenkamos ir analizuojamos pasirinktu metodu.

Matavimo eiga

Tos vidurinio eliuato intervalo frakcijos, kurių koncentracijos yra pastovios ($\pm 30 \%$) ne mažiau kaip penkiose iš eilės einančiose frakcijose, yra naudojamos nustatyti tirpumą vandenyje.

▼B

Abiem atvejais (naudojant recirkuliacinį siurbį arba išlyginantį indą) viską reikia dar kartą pakartoti su puse pirmojo debito kiekio. Jeigu abu rezultatai sutampa, bandymas yra patenkinamas; jeigu esant mažesniai debitui nustatomas akivaizdžiai didesnis tirpumas, debitas turi būti dalijamas pusiau, kol dviem vienas po kito einančiais matavimais bus nustatytas toks pat tirpumas.

Abiem atvejais (naudojant recirkuliacinį siurbį arba išlyginantį indą) frakcijos turėtų būti patikrinamos, ar nėra koloidinių medžiagų, tikrinant, ar nėra Tindalio reiškinių (šviesos sklaidos). Dėl tokių dalelių rezultatai tampa negaliojančiais, o bandymas turėtų būti pakartojamas, pagerinant kolonėlės filtravimo darbo eigą.

Turėtų būti užrašomas kiekvieno bandinio pH. Darbo eiga turėtų būti kartojama tokioje pat temperatūroje.

1.6.4. **Kolbos metodas**

1.6.4.1. *Aparatūra*

Kolbos metodui reikalingos tokios medžiagos:

- paprasti laboratoriniai stikliniai indai ir prietaisai,
- prietaisas, tinkantis tirpalams suplakti kontroliuojamoje pastovioje temperatūroje,
- centrifuga (geriau su reguliuojama temperatūra), jeigu reikia, su emulsijomis, ir
- įrenginys analiziniui nustatymui.

1.6.4.2. *Matavimo eiga*

Medžiagos kiekis, reikalingas norimam vandens tūriui išotinti, yra apskaičiuojamas išankstiniu bandymu. Reikalingas vandens tūris priklauso nuo analizės metodo ir tirpumo intervalo. Apytikriai penki anksčiau nustatyti medžiagos kiekiai pasveriami į kiekvieną iš trijų stiklinių indų su stikliniais kamščiais (pvz., centrifugos vamzdžiai, kolbos). Pasirinktas vandens kiekis pilamas į kiekvieną indą, kiekvienas indas sandariai užkemšamas. Užkimšti indai kratomi 30 °C temperatūroje. (Turėtų būti naudojamas kratytuvas arba maišytuvas, galintys dirbti pastovioje temperatūroje, pvz., magnetinis maišymas termostatu kontroliuojamoje vandens vonioje). Po paros vienas indas išimamas ir pakartotinai nustatoma pusiausvyra per 24 valandas bandymo temperatūroje retsykiais pakratant. Inde esantis turinys centrifuguojamas bandymo temperatūroje, mėginio aiškioje hidratuotoje fazėje koncentracija nustatoma atitinkamu analiziniu metodu. Su kitomis dviem kolbomis elgiamasi taip pat, prieš tai nustatant pradinę pusiausvyrą 30 °C temperatūroje atitinkamai per dvi ir tris paras. Jeigu duomenys apie koncentraciją, gauti ne mažiau kaip iš paskutiniųjų dviejų indų, atitinka reikalavimus, bandymas yra patenkinamas. Visas bandymas turėtų būti pakartojamas naudojant ilgesnius pusiausvyros nustatymo laikus, jeigu 1, 2 ir 3 indo rezultatai krypta į didesnes vertes.

Matavimo eigą taip pat galima atlikti be išankstinio inkubacinio laikotarpio 30 °C temperatūroje. Kad būtų galima įvertinti soties pusiausvyros nustatymo koeficientą, mėginiai yra imami tada, kai maišymo laikas nebeturi įtakos tiriamojo tirpalo koncentracijai.

▼B

Turėtų būti užrašomas kiekvieno mėginio pH.

1.6.5. **Analizė**

Atliekant šiuos nustatymus pasirenkamas tai medžiagai tinkantis analizės metodas, kadangi nedideli tirpių medžiagų kiekiai gali būti didelių matuojamo tirpumo paklaidų priežastis. Tokių metodų pavyzdžiai: dujų arba skysčių chromatografija, titravimo metodai, fotometriniai metodai, voltamperometriniai metodai.

2. **DUOMENYS**

2.1. KOLONĖLĖS ELIUAVIMO METODAS

Vidutinė vertė, gauta iš ne mažiau kaip penkių mėginių, iš eilės paimtų iš soties kreivės plokščiosios dalies, turėtų būti apskaičiuojama kiekvienam matavimui, kaip ir standartinis nuokrypis. Duomenys turėtų būti pateikiami tokiais vienetais: masė tirpalo tūriui.

Vidurkiai, apskaičiuojami naudojant skirtingus dviejų bandymų srautus, yra palyginami, o jų pakartojamumas turėtų būti mažesnis kaip 30 %.

2.2. KOLBOS METODAS

Duomenys turėtų būti gaunami kiekvienai iš trijų kolbų, o iš tų duomenų, kurie laikomi esantys pastovūs (pakartojamumas mažesnis kaip 15 %), išvedamas vidurkis ir pateikiamas masės vienam tirpalo tūriui vienetais. Tam gali tekti masės vienetus pakartotinai paversti tūrio vienetais, naudojant tankį, jeigu tirpumas labai didelis (> 100 gramų viename litre).

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

3.1. KOLONĖLĖS ELIUAVIMO METODAS

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

- išankstinio bandymo rezultatai,
- išsamios medžiagos charakteristikos (tapatybė ir priemaišos),
- kiekvieno mėginio individualiosios koncentracijos, debitai ir pH,
- ne mažiau kaip penkių mėginių vidutinės vertės ir standartiniai nuokrypiai, paimti iš soties kreivės plokščiosios dalies,
- dviejų, vienas paskui kitą sekančių matavimų bendrasis vidurkis,
- vandens temperatūra įsisotinimo metu,
- naudotas analizės metodas,
- naudotos pagalbinės medžiagos charakteristikos,
- pagalbinės medžiagos pakrovimas,
- naudotas tirpiklis,
- bet kokio medžiagos cheminio nepastovumo įrodymai bandymo metu ir naudotas metodas
- visa informacija, svarbi rezultatų aiškinimui, ypač apie priemaišas ir medžiagos fizinę būseną.

▼B

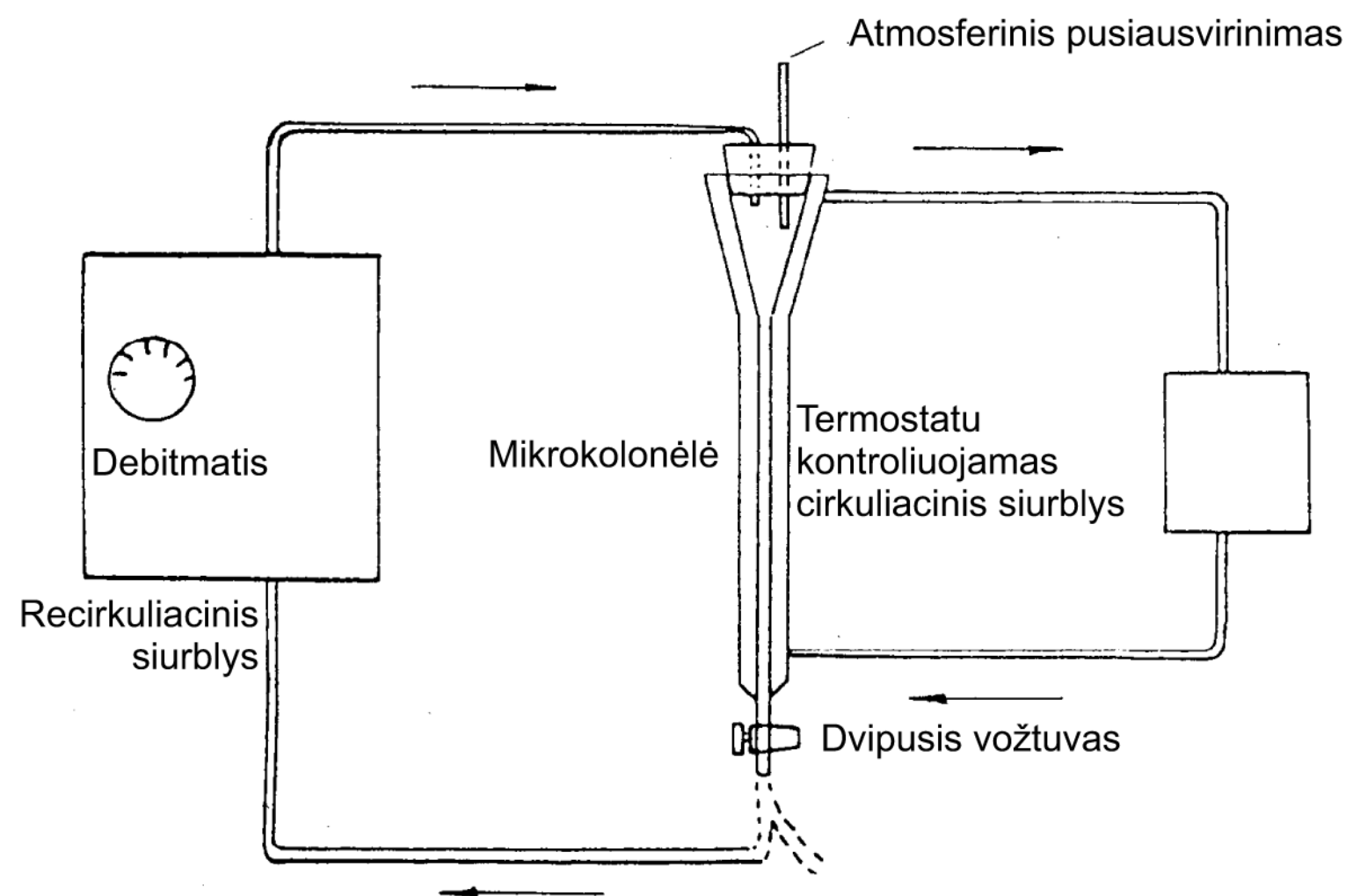
3.2. KOLBOS METODAS

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

- išankstinio bandymo rezultatai,
- išsamios medžiagos charakteristikos (identiškas ir priemaišos),
- kiekvienas individualus nustatymas ir vidurkis, jeigu kiekvienai kolbai buvo nustatoma daugiau negu viena vertė,
- kiekvieno mėginio pH,
- skirtingų kolbų, kurių duomenys sutampa, bendrasis vertės vidurkis,
- bandymo temperatūra,
- naudotas analizės metodas,
- bet kokio medžiagos cheminio nepastovumo įrodymai bandymo metu ir naudotas metodas,
- visa informacija, svarbi rezultatų aiškinimui, ypač apie priemaišas ir medžiagos fizinę būseną.

4. LITERATŪRA

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 105, Decision of the Council C(81) 30 final.
- 2) NF T 20-045 (AFNOR) (Sept. 85). 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) (Sept. 85). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility – Flask method.

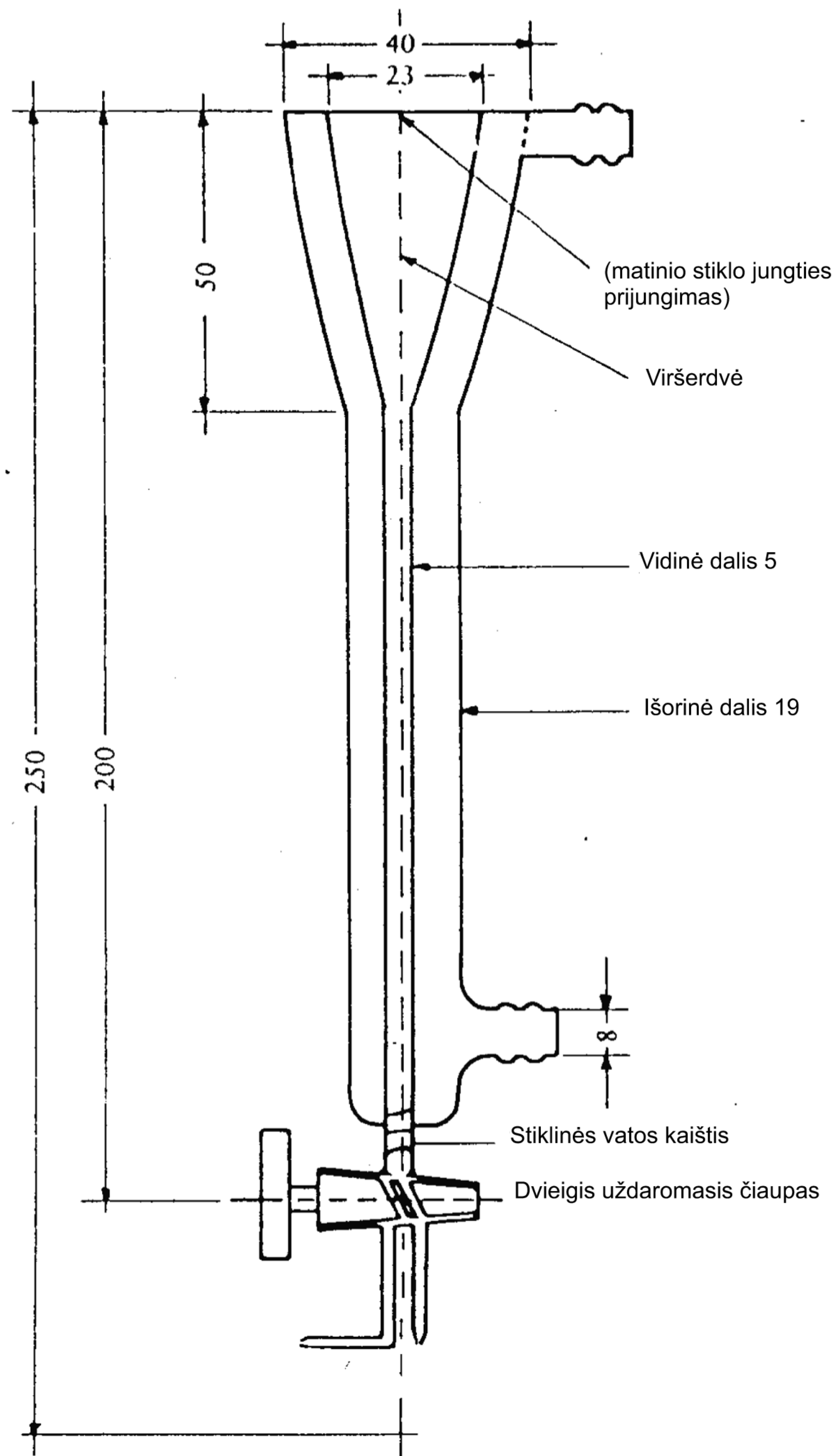
▼B*Priedėlis**1 paveikslas***Kolonėlės eliuavimo metodas su recirkuliaciniu siurbliu**

▼ B

2 paveikslas

Tipiška mikrokolonėlė

(Visi matmenys pateikti milimetrais)

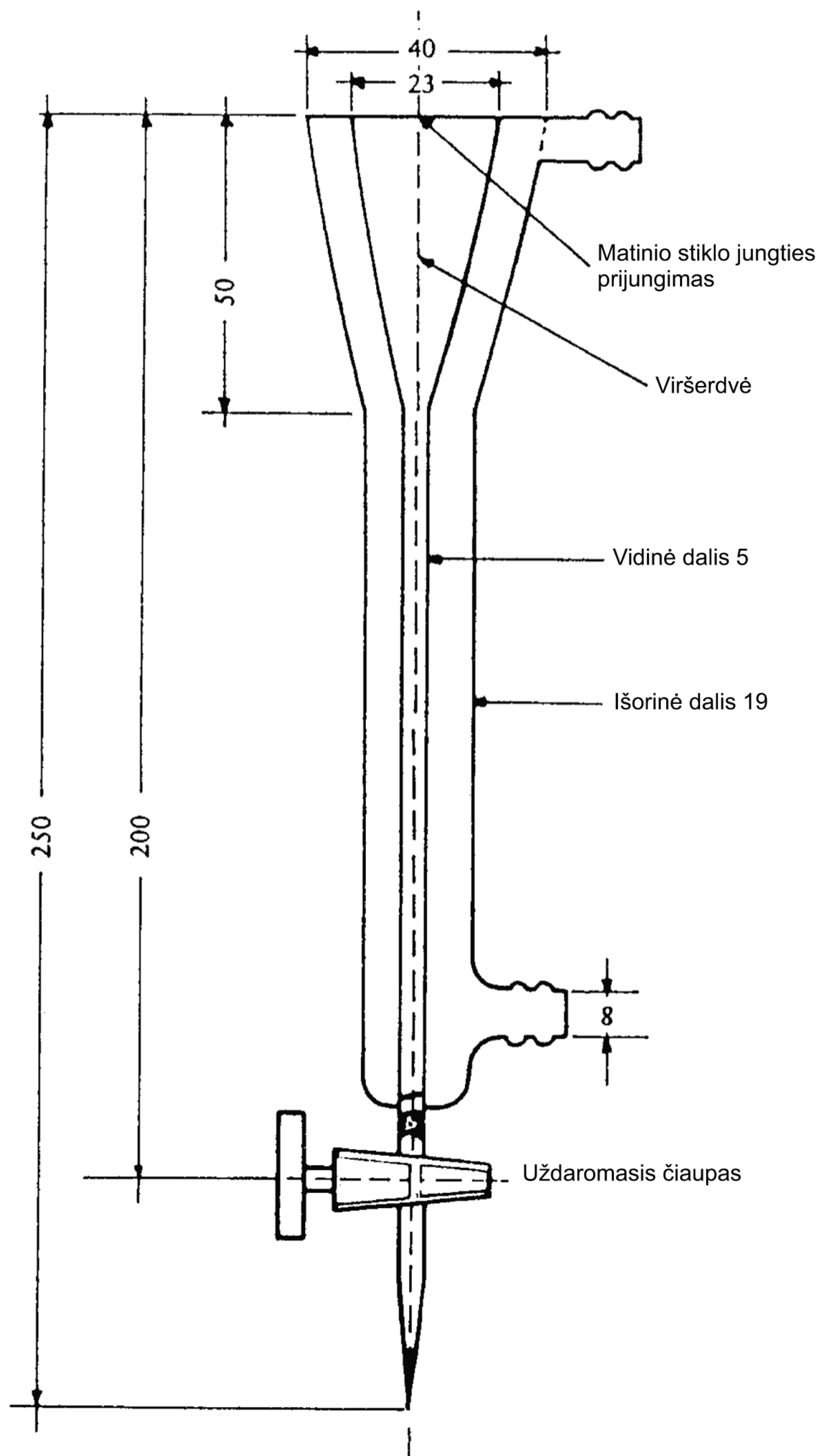


▼ B

3 paveikslas

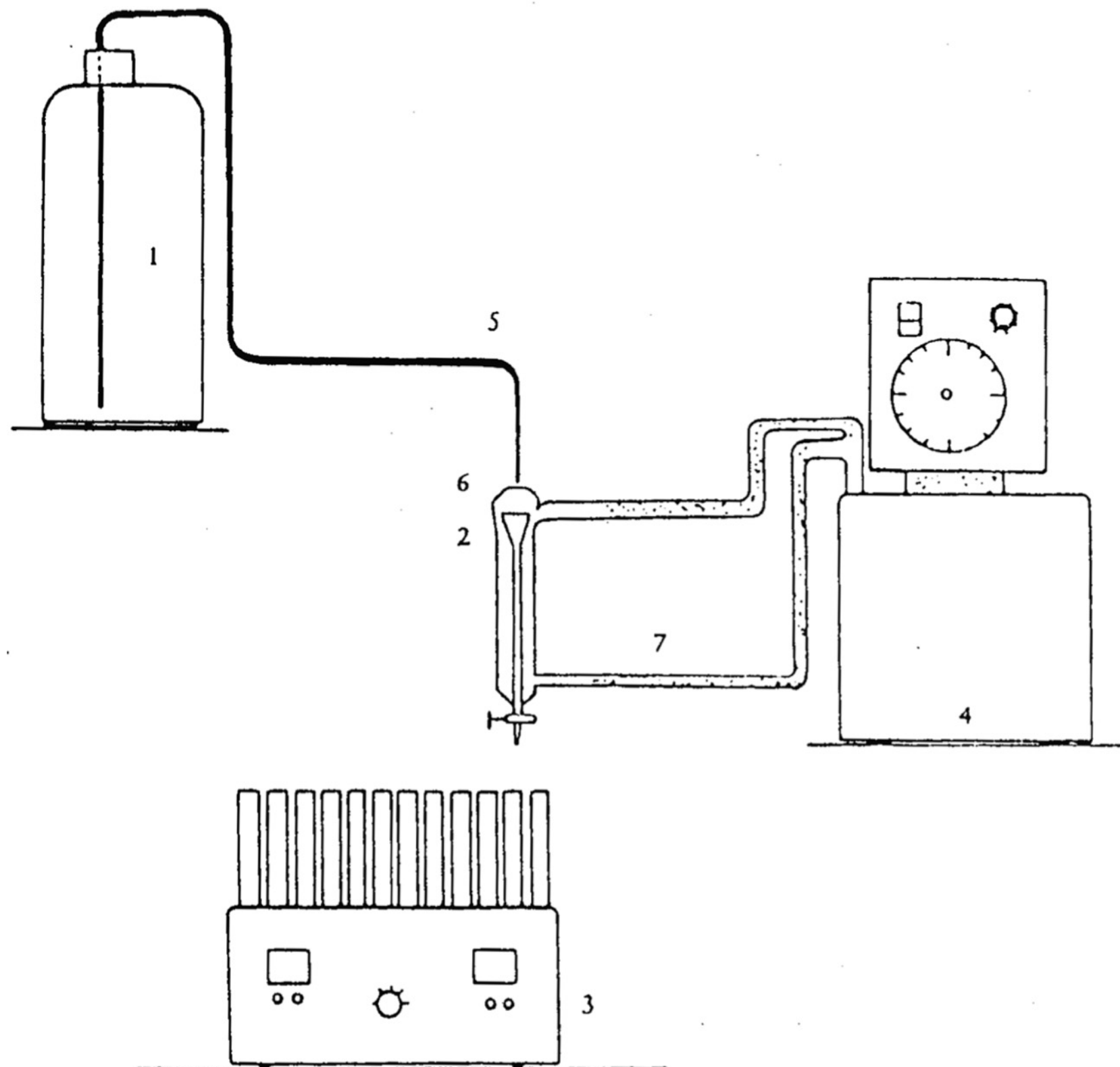
Tipiška mikrokolonėlė

(Visi matmenys pateikti milimetrais)



▼ B

4 paveikslas

Kolonėlės eliuavimo metodas su išlyginamuoju indu

- 1 = Išlyginamasis indas (pvz., 2,5 litrų kolba)
- 2 = Kolonėlė (žr. 3 pav.)
- 3 = Frakcijos rinktuvas
- 4 = Termostatas
- 5 = Teflono vamzdeliai
- 6 = Matinio stiklo jungtis
- 7 = Vamzdelis vandeniui (tarp termostato ir kolonėlės, vidinis skersmuo: apie 8 mm).

▼B**A.8. PASISKIRSTYMO KOEFICIENTAS****1. METODAS**

Apibūdintasis „kratomos kolbos“ metodas yra pagrįstas OECD Test Guideline (1).

1.1. ĮVADAS

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

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

Ši bandymo metodą sudaro dvi atskiros darbo eigos: kratomos kolbos metodas ir efektyvoji skysčių chromatografija (HPLC). Pirmoji yra taikoma, kai $\log P_{ow}$ vertė (žr. toliau esančius apibrėžimus) yra 2–4 ribose, o antroji – 0–6 ribose. Prieš atliekant bet kuri iš šių eksperimentų, pirma turėtų būti iš anksto apskaičiuojamas pasiskirstymo koeficientas.

Kratomos kolbos metodas taikomas tik visiškai grynomis, 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 eluiu. Šioms medžiagoms turėtų būti pateikiama apskaičiuotoji vertė arba apskaičiavimas, pagrįstas individualiuoju tirpumu n-oktanolyje arba vandenyje.

HPLC metodas yra mažiau jautrus priemonėms, esančioms bandomajame junginyje, negu kratomos kolbos metodas. Nepaisant to, dėl priemonių 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. APIBRĖŽIMAS IR VIENETAI

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

$$P_{ow} = \frac{c_{n\text{-octanol}}}{c_{\text{water}}}$$

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

▼B

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Kratomos kolbos metodas

Etaloninių medžiagų nereikia naudoti visais tais atvejais, kai tyrinėjama nauja medžiaga. Pirmiausiai jos turėtų būti naudojamos kartkartėmis tikrinant metodo veikimą ir palyginti 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 grafikas, 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 susiję su bandomąja medžiaga.

Išsamų daugumos chemikalų $\log P_{ow}$ 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 ESME

1.4.1. **Kratomos kolbos metodas**

Pasiskirstymo koeficientui nustatyti turi būti pasiekama pusiausvyra tarp visų sąveikaujančių sistemos sudedamųjų dalių ir turi būti nustatytos koncentracijos medžiagų, ištirpintų tose dviejose 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, išvirkšti ant tokios kolonėlės, juda išilgai skirtingais greičiais, kadangi pasiskirstymas tarp judančiosios būsenos ir angliavandens nuostoviosios būsenos yra skirtingo laipsnio. Chemikalų mišiniai dėl jų hidrofobiškumo yra pirma eliuliuojami vandenyje tirpiaisi chemikalais, po to alyvoje tirpiaisi chemikalais proporcingai jų angliavandens 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 talpinio faktoriaus k , gaunamo iš lygties:

▼B

$$k = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

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, turi būti atliekami dvigubi nustatymai esant trims skirtingoms bandymo sąlygoms, kuriomis apibrėžtas medžiagos kiekis, taip pat tirpiklio tūriai gali būti keičiami Nustatytos pasiskirstymo koeficiento vertės, išreikštos bendroju logaritmu, turėtų patekti į $\pm 0,3$ log vienetų intervalą.

HPLC metodas

Norint padidinti pasiklovimą matavimais, turi būti atliekami kartotiniai nustatymai. Log P vertės, gautos iš pavienių matavimų, turėtų patekti į $\pm 0,1$ log vienetų intervalą.

1.5.2. Jautrumas

Kratomos kolbos metodas

Metode naudojamas matavimų intervalas yra nustatomas pagal analizės darbo eigos 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 0–6.

Paprastai junginio pasiskirstymo koeficientas gali būti įvertinamas iki $\pm 0,1$ log vienetų 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).

▼B**1.5.3. Tikslumas***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 naudojamos daugkartinės pusiausvyros šis bandymo metodas neturėtų būti naudojamas jonizuojamiems junginiams, jeigu nenau-dojama korekcija. Tokiems junginiams reikėtų apsvastyti 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 aplinkai.

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. Preparatas**

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

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

Pastaba

Vanduo, paimtas tiesiogiai iš jonitinio filtro, neturėtų būti naudo-jamas.

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 anali-zinis n-oktanolis arba vanduo su pakankamu kiekiu kito tirpiklio, po to leidžiama pakankamai ilgai nusistovėti, kad atsiskirtų fazės ir nusistovėtų sotis.

▼B**1.6.2.1.2. Bandy mo paruo šimas**

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

- išankstinis pasiskirstymo koeficiento apskaičiavimas (žr. anks-tesnį punktą),
- mažiausias bandomos medžiagos kiekis, reikalingas analizei atlikti, ir
- didžiausios koncentracijos apribojimas bet kurioje fazėje 0,01 molio vienam litrui.

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. Bandy mo med ži a g a

Pagrindinis tirpalas paruošiamas iš anksto vandeniui išotintame n-oktanolioje. Šio pagrindinio tirpalo koncentracija turėtų būti tiksliai nustatoma prieš jį naudojant pasiskirstymo koeficiento nustatymui. Šis tirpalas turėtų būti laikomas pastovumą užtikrinančiomis sąlygomis.

1.6.2.2. Bandy mo 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 su būtinu pagrindinio tirpalo kiekiu.

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

1.6.2.3.2. Fazių ats sky r i m a s

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

▼B1.6.2.4. *Analizė*

Nustatant pasiskirstymo koeficientą yra būtina nustatyti bandomos medžiagos koncentracijas abiejose fazėse. Tą galima atlikti iš kiekvieno vamzdžio 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 pradžių dėtos medžiagos kiekiu.

Hidratuotos fazės mėginiai turėtų būti imami tokia tvarka, kad būtų kaip galima labiau sumažinamas pavojus įtraukti n-oktanolio pėdsakus: hidratuotos 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 hidratuotos fazės. Švirkštas greitai ištraukiamas iš tirpalo ir nuimama adata. Švirkšto turinys gali būti naudojamas kaip hidratuotas mėginys. 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 nesukeliamčiu siurbliu ir atitinkamu detektoriumi. Rekomenduojama naudoti injekcinį vožtuvą su injekcinėmis kilpomis. Tai, kad nuostoviojoje fazėje yra polinės grupės, gali smarkiai pakenkti HPLC kolonėlės darbą. Todėl nuostoviosiose 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-oktanolioje 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 atskyrimo HPLC laiką. Tada debito mažinimas ir/arba metanolio/vandens santykio mažinimas gali būti veiksminga priemonė patikimai vertei gauti.

▼B

Bandymo 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. Rekomenduojama atlikti buferinius veiksmus. 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_0 apskaičiavimas*

Nulinį laiką t_0 galima nustatyti naudojant homologinę eilę (pvz., n-alkilmetilketonus) arba nepasiskirsčiusius organinius junginius (pvz., tiokarbamidas arba formamidas). Apskaičiuojant nulinį laiką t_0 naudojant homologinę eilę, išvirkščiami 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 regresijos lygties – a ir b:

$$tr_{(n c + 1)} = a + b \cdot tr_{(n c)}$$

(n_c – anglies atomų skaičius). Po to gaunamas nulinis laikas t_0 pagal:

▼B*Kalibravimo grafikas*

Po to sudaromas log k verčių ir log P santykio koreliacijos grafikas atitinkamiems etaloniniams junginiams. Praktiškai vienu metu išvirkščiama 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.

Mėginio talpos koeficiento nustatymas

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

2. DUOMENYS*Kratomos kolbos metodas*

Nustatytų P verčių patikimumas gali būti patikrinamas palyginant dvigubo nustatymo vidurkius su suminiu vidurkiu.

3. ATASKAITOS PATEIKIMAS

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

- tikslios medžiagos charakteristikos (identiškas 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 metodei:

- išankstinio įvertinimo, jei toks buvo, rezultatai,
- temperatūros nustatymas,
- duomenys apie analizės procedūras, naudotas nustatant koncentracijas,
- centrifugavimo, jei jis buvo naudotas, laikas ir greitis,

▼B

- kiekvienam nustatymui matuotos koncentracijos abiejose fazėse (tai reiškia, kad ataskaitoje bus pateikta iš viso 12 koncentracijų),
- mėginio 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 individualių P verčių nuokrypiai nuo vidutinės vertės,
- visų nustatymų vidurkis P turėtų būti išreiškiamas logaritmu (dešimtainis logaritmas),
- teoriškai apskaičiuotas P, jei ši vertė buvo nustatyta arba jeigu matuotoji vertė $> 10^4$,
- naudoto vandens ir hidratuotos fazės pH eksperimento metu,
- jeigu naudojami buferiai, buferių naudojimo vietoje vandens pagrindimas, buferių sudėtis, koncentracija ir pH, hidratuotos fazės pH prieš eksperimentą ir po jo.

HPLC metodei:

- 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 analizes ir apsauginę kolonėlę, judančiąją fazę ir nustatymo vidurkių,
- duomenys apie kalibravimui naudotų etaloninių junginių sulaikymo ir literatūroje randamas trukmės
- išsami informacija apie regresijos tiesės sudarymą ($\log k$ santykis su $\log P$),
- vidutiniai bandomo junginio duomenys apie sulaikymo trukmės ir interpoliuotą $\log P$ vertę,
- įrenginių ir darbo sąlygų apibūdinimas,
- eliuavimo profiliai,
- į kolonėlę pakrautų mėginių ir etaloninių medžiagų kiekiai,
- nulinis laikas ir kaip jis buvo matuojamas.

▼B4. **LITERATŪRA**

- 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. Sundström and K. Sundh-Nygård, 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 Laboratoriumspraxis (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 products 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.

▼B

- 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.

▼B*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),
- galimų eksperimentinių paklaidų laboratorijos vidinės kontrolės priemonė,
- P_{ow} įverčiui 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:

$$P_{\text{estimate}} = \frac{\text{saturation } c_{n\text{-octanol}}}{\text{saturation } c_{\text{water}}}$$

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 intramolekulinės sąveikos (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.

▼ B**Apskaičiavimo metodai***Hansch π -metodas*

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

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

kai: $P_{ow} (\text{PhX})$ aromatinio darinio pasiskirstymo koeficientas ir $P_{ow} (\text{PhH})$ pradinio junginio pasiskirstymo koeficientas

$$(\text{pvz., } p_{Cl} = \log P_{ow} (\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}) - \log P_{ow} (\text{C}_6\text{H}_6) = 2,84 - 2,13 = 0,71).$$

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 atstovauja įvairių molekulės fragmentų konstantoms ir a_i – jų pasikartojimo dažnį 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:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

kai f_i atstovauja įvairių molekulės fragmentų konstantoms, F – pataisos dėmenis ir a_i , b_j – atitinkamus pasikartojimo dažnius. 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 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.

▼B

- 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.

▼ B

2 priedelis

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	Metilfenileteris	2,1	
23	Metibenzoatas	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	

▼ B

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	[zopropilbenzenas	3,7	
47	2,4,6-trichlorfenolis	3,7	pKa =6
48	Difenilas	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	

▼B**A.9. 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 tiksliai tame pliūpsnio temperatūros intervale, kuris yra tam metodui nurodytas.

Renkantis taikytiną metodą, būtina atsižvelgti į reakcijos tarp mėginio ir mėginio indo galimybę.

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Pliūpsnio temperatūra – tai mažiausia temperatūra, su pataisa 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 vienetai – °C, T vienetai – K).

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Etalonines medžiagas nebūtina naudoti kiekvienu atveju tiriant naują medžiagą. Daugiausia jos turi būti naudojamos, kai reikia kartais tikrinti metodo veikimą ir norint lyginti su rezultatais, gautais kitais metodais.

1.4. METODO ESME

Medžiaga pilama į mėginio indą ir pagal atskiram bandymo metodui naudojamą metodiką šildoma arba aušinama iki bandymo temperatūros. Užsidegimo 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).

▼B

1.6. METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Ruošimas**

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

Saugai užtikrinti rekomenduojama, kad intensyviai reaguojančių ir nuodingų medžiagų mėginys būtų mažas, maždaug 2 cm³.

1.6.2. **Bandymo sąlygos**

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

1.6.3. **Bandymo eiga**1.6.3.1 *Pusiausvirasis metodas*

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

1.6.3.2 *Nepusiausvirasis metodas*

Abel aparatas:

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

Abel-Pensky aparatas:

žr. EN 57, DIN 51755 1 dalį (temperatūra 5–65 °C), DIN 51755 2 dalį (temperatūra mažesnė 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 nepusiausviruoju 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 pusiausviruoju 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), turinčių tirpiklių, pliūpsnio temperatūrai nustatyti gali būti taikomas tik klampių medžiagų pliūpsnio temperatūrai nustatyti tinkamas metodas.

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

▼B2. **DUOMENYS**3. **ATASKAITA**

Jei įmanoma, bandymo ataskaitoje turi būti tokia informacija:

- tiksli medžiagos specifikacija (identifikavimas 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

▼B**A.10. 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.

Nenorint įtraukti visas medžiagas, kurios gali būti padegtos, tačiau tik greitai degančias 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. APIBRĖŽIMAS IR VIENETAI

Degimo laikas reiškiamas sekundėmis.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nenurodytos.

1.4. METODO ESMĖ

Formuojamas maždaug 250 mm ilgio vientisas medžiagos strypas 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.

▼ B

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 strypas 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 bandymas**1.6.2.1. *Ruošimas*

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, neakytą ir blogai šilumą leidžianti pagrindo plokštė, įtaisas apverčiamas ir forma nuimama.

Pastos pavidalo medžiagos dedamos ant nedegios, neakytos ir blogai šilumą leidžiančios pagrindo plokštės, pagaminant iš jų 250 mm ilgio juostelę, kurios skerspjūvio plotas apie 1 cm².

1.6.2.2. *Bandymų sąlygos*

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

1.6.2.3. *Bandymo eiga*

Krūvelė dedama į traukos spintą skersai traukos kryptčiai.

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

Krūvelei viename gale padegti naudojama karšta dujų degiklio liepsna (mažiausias skersmuo 5 mm). Kai krūvelė sudega 80 mm atstumu, kitoje 100 mm atkarpoje matuojamas degimo greitis.

▼B

Bandymas atliekamas šešis kartus, jei teigiamas rezultatas negaunamas anksčiau, kiekvieną kartą naudojant švarią šaltą plokštę.

2. DUOMENYS

Vertinant rezultatus, reikalinga degimo trukmė, nustatyta išankstiniame atrankos bandyme (1.6.1.) ir trumpiausia degimo trukmė, gauta ne daugiau kaip šešiuose bandymuose (1.6.2.3.).

3. ATASKAITA**3.1. BANDYMŲ ATASKAITA**

Jei įmanoma, bandymų ataskaitoje turi būti tokia informacija:

- tiksli medžiagos specifikacija (identifikavimas ir priemonės),
- bandomosios medžiagos apibūdinimas, jos fizinė būseną, 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

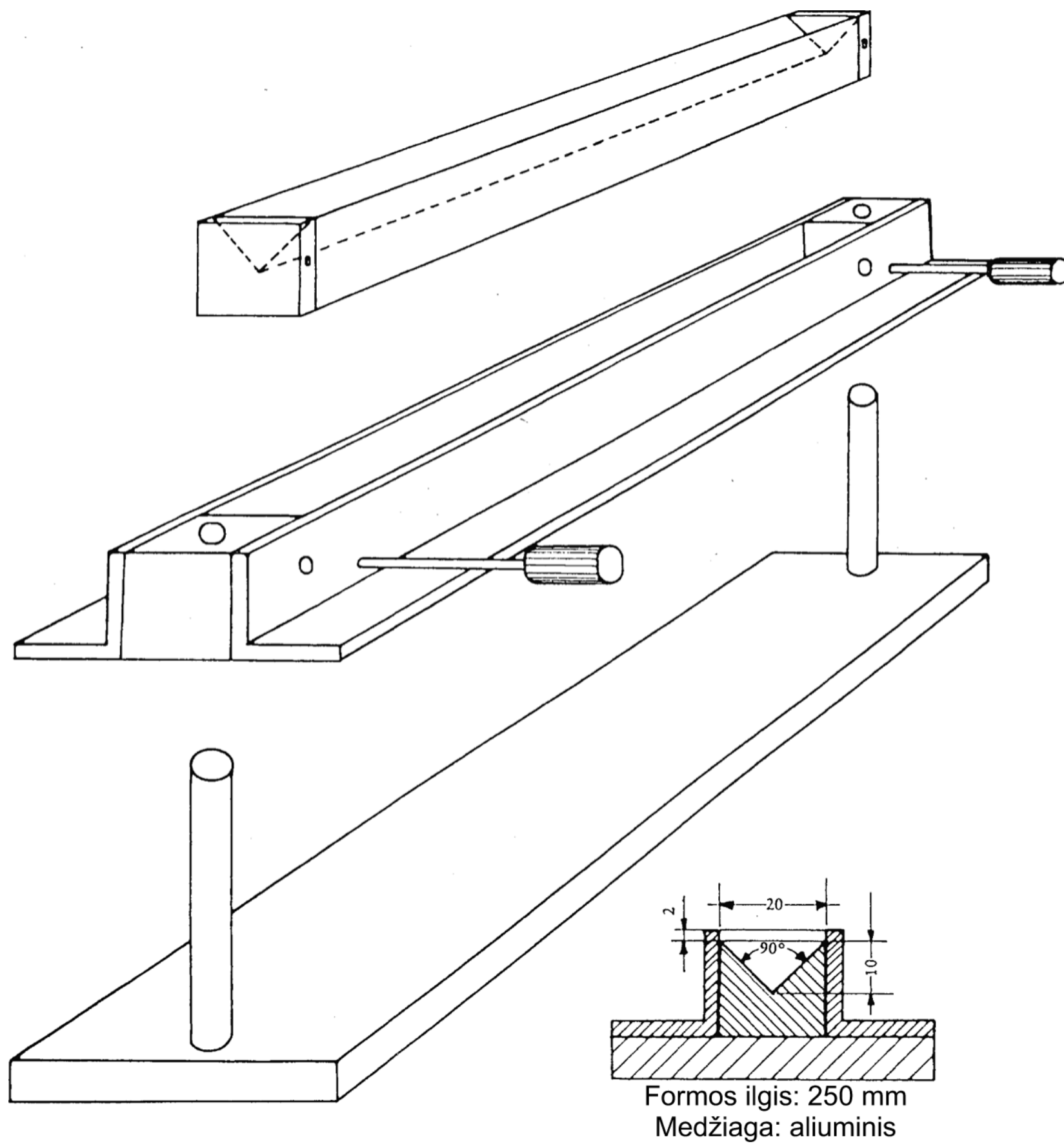
Miltelių, granulių ir pastos pavidalo medžiagos turi būti laikomos labai degiomis, jei degimo trukmė bet kuriame bandyme, atliktame pagal 1.6.2 aprašytą metodiką, yra mažesnė kaip 45 sekundės. Metalų arba metalų lydinų milteliai laikomi labai degiais, jei jie gali būti padegti ir liepsna arba reakcijos zona visu bandiniu plinta 10 minučių arba mažiau.

4. NUORODOS

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

▼B*Priedėlis**Paveikslas***Forma ir priedai krūvelei ruošti**

(Visi matmenys milimetrais)



▼B**A.11. DEGUMAS (DUJOS)****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

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

1.2. APIBRĖŽIMAS IR VIENETAI

Degumo intervalas yra intervalas tarp apatinės ir viršutinės sprogimo ribinės koncentracijos. Apatinė ir viršutinė sprogimo ribinė koncentracija yra tokia degių dujų mišinio su oru ribinė koncentracija, kuriai esant liepsnos plitimas nevyksta.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nenurodytos.

1.4. METODO ESME

Dujų koncentracija ore didinama pakopomis ir kiekvienos pakopos 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 atstumas, įdedami 60 mm nuo cilindro dugno. Cilindras turi slėgio mažinimo angą. Norint apriboti bet kokio sprogimo padarytą žalą, aparatas turi būti apsaugotas skydu.

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

1.6.2. Bandymo sąlygos

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

▼B**1.6.3. Bandymo eiga**

Žinomos koncentracijos dujų mišinys su oru leidžiamas 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 stochiometrinio mišinio su oru sudėtis, tai 1 % pakopomis reikia tikrinti pradedant mišiniu, kuriame dujų yra 10 % mažiau nei stochiometrinės sudėties mišinyje, ir baigiant mišiniu, kuriame dujų yra 10 % daugiau nei stochiometrinės 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 (identifikavimas ir priemaišos),
- naudotos aparatūros aprašymas, nurodant matmenis,
- temperatūra, kurioje bandymas buvo atliekamas,
- bandytos 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 bandoma 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

▼B**A.12. 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 ore.

1.2. APIBRĖŽIMAI 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 ESME

Medžiaga bandoma laikantis toliau aprašytos pakopų sekos; jei dujos kurios 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 padaroma 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 septynias valandas matuojama dujų išsiskyrimo sparta. Jei dujų skyrimosi sparta svyruoja arba septynias valandas didėja, matavimo trukmė turi būti padidinta ne ilgiau kaip iki penkių parų. Bandymas gali būti sustabdytas, jei išsiskyrimo sparta kuriuo nors momentu yra didesnė kaip 1 litras/kg per valandą.

▼B

1.4 ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nenurodytos.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

1.6. METODŲ 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 įdėta 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 dedamas distiliuoto vandens, įpilto į bet koki 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 daroma 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.

▼B**1.6.4. 4 pakopa****1.6.4.1. Aparatūra**

Surenkamas paveiksle parodytas aparatas.

1.6.4.2. Bandymo sąlygos

Apžiūrėkite talpyklą su bandomąja medžiaga, ar jame nėra miltelių $< 500 \mu\text{m}$ (dalelių dydis). 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; kitu atveju 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 kas valandą matuojamas septynias valandas. 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 (identifikavimas ir priemonės),

— bet kokio bandomosios medžiagos pradinio ruošimo detalės,

▼B

- 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

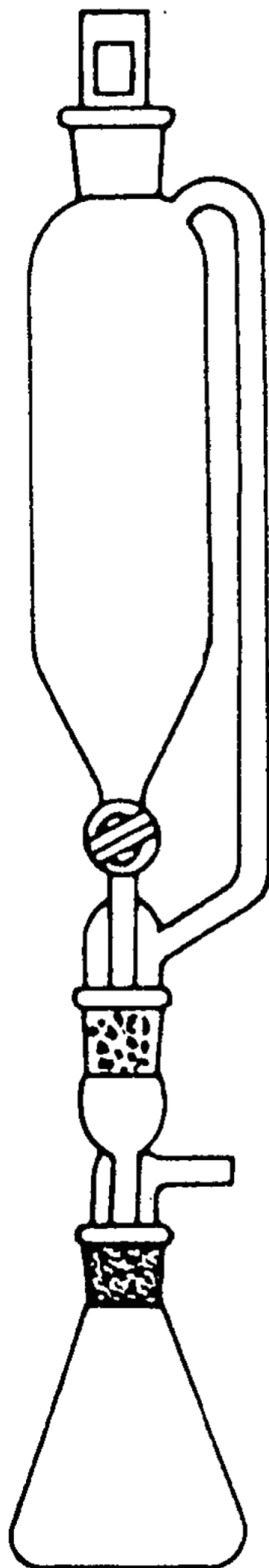
- 1) Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.
- 2) NF T 20-040 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Priedėlis

Paveikslas

Aparatas



▼B**A.13. PIROFORINĖS KIETŲJŲ MEDŽIAGŲ IR SKYSČIŲ SAVYBĖS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

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

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

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

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

Savaiminį skysčių užsidegimą gali tekti bandyti taikant A.15 metodą „Savaiminio užsidegimo temperatūra (skysčiai ir dujos)“.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nenurodytos.

1.4. METODO ESMĖ

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 apdegina filtravimo popierių.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Pakartojamumas: kadangi tai labai svarbu saugai, 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 pripildoma diatomito.

Pastaba

Diatomitas arba kuri nors kita panaši inertiška medžiaga, kurią būtų galima visur gauti, turi būti imama vietoje žemės, ant kurios bando-
moji medžiaga galėtų būti išpilta avarijos atveju.

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

▼B**1.6.2. Bandymo eiga****a) Milteliai**

1-2 cm³ 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.

b) Skysčiai

Maždaug 5 cm³ 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 anglėja. Bandymas atliekamas tris kartus, jei popierius neužsidega arba neanglėja.

2. DUOMENYS**2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS**

Bandymas gali būti nutrauktas, kai kurio nors bandymo rezultatas yra teigiamas.

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 (identifikavimas ir priemonės),
- 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.

▼B**A.14. SPROGSTAMOSIOS SAVYBĖS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Šis metodas pateikia bandymo schemą norint nustatyti, ar kelia sproginimo pavojų kieta arba pastos pavidalo medžiaga, veikiant liepsnai (terminis jautrumas) arba smūgiui ar trinčiai (jautrumas mechaniniams veiksniams), ir ar kelia sproginimo 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 duomenis leidžia įvertinti tikimybę įvykti sproginimui, 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 sproginimo 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 nurodyta aparatūra.

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 sproginimo pavojaus). Su skysčiais nereikia atlikti mechaninio jautrumo trinčiai bandymo.

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Sprogstamosios medžiagos:

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

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

1,3-dinitrobenzenas, techniškai gryna kristalinė medžiaga, išsijota per 0,5 mm sieta 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 sieta ir išlikęs ant 150 µm sieto bei išdžiovintas 103 ± 2 °C temperatūroje (4 valandas), skirtas antros eilės trinties ir smūgio bandymams.

▼B**1.4. METODO ESME**

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

1.4.1. Saugaus naudojimo bandymai (3)

Rūpinantis sauga, 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 paskirtieji 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, uždarytame diafragma, turinčia skirtingą angos skersmenį.

1.4.3. Mechaninis jautrumas (smūgis)

Taikant šį metodą medžiaga veikama 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 veikimas)****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 (veržlė ir sandariklis su sriegiu). Veržlė ir sandariklis su sriegiu pagaminti iš chromo manganinio plieno (žr. priedėlį), kuris neikiškčiuoja iki 800 °C. Diafragmos yra 6 mm storio, pagamintos iš kaitrai atsparaus plieno (žr. priedėlį), ir turi įvairaus skersmens angas.

▼B1.6.1.2. *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 cm³ medžiagos, toliau medžiaga plūkama 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 plūkama, 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 plukant 80 N jėga. Po to plukant 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 plukant 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 kartą suspaudžiant iki 9 cm³ reikalinga tam jėga. (Tai galima palengvinti naudojant tarpinius žiedus).

Skysčių ir gelių dedama į vamzdį iki 60 mm aukščio, ypatingą dėmesį kreipiant į gelių dėjimą, 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. Yra labai svarbu kontroliuoti, kad medžiaga visiškai 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 bandyme įvyko sproginimas, 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 sproginimas.

▼ **B**

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

1.6.1.4. *Vertinimas*

Bandymų rezultatas laikomas teigiamu, jei sproginas 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. Keturiomis 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.

Mėginys 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 ištektos 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*

Mėginio tūris turi būti lygus 40 mm³, arba tūris turi atitikti bet koki alternatyvųjį aparatą. Kietos medžiagos turi būti išbandytos sausos ir ruošiamos taip:

- a) milteliai sijojami (sieto akučių dydis 0,5 mm); bandoma visa tai, kas išbyra per sieta;
- b) presuotos, lietos ar kitu būdu tankintos medžiagos smulkinamos į mažus gabalus ir sijojamos; bandoma sijota 0,5-1 mm skersmens dalelių frakcija, kuri turi būti reprezentatyvi pradinės medžiagos dalis.

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

▼B1.6.2.3. *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, ekscentrinu krumpliaračiu ir atitinkama pavara tokiu būdu, kad porcelianinė plokštė po porcelianiniu kaiščiu juda 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) $\times$ 25 mm (plotis) $\times$ 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. *Bandymų sąlygos*

Bandinio tūris turi būti lygus 10 mm³ arba bandinio tūris turi atitikti bet kurią alternatyvų aparatą.

Kietos medžiagos išbandomos sausos ir ruošiamos taip:

- a) milteliai siojami (sieto akučių dydis 0,5 mm); bandoma visa tai, kas iškrenta per sietą;
- b) presuotos, lietos ar kitu būdu sutankintos medžiagos smulkinamos į mažus gabalus ir siojamos; bandymuose naudojama sijota frakcija, kurios dalelių skersmuo < 0,5 mm.

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

▼B1.6.3.3. *Bandymų eiga*

Porcelianinis kaištis uždedamas ant bandomosios medžiagos ir veikiamas apkrova. Atliekant bandymą porceliano plokštės aktytumo 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 saikiklis, 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 trimis 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 sproginimas (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 identiškumas, 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,

▼B

- 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 aiškinimas 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

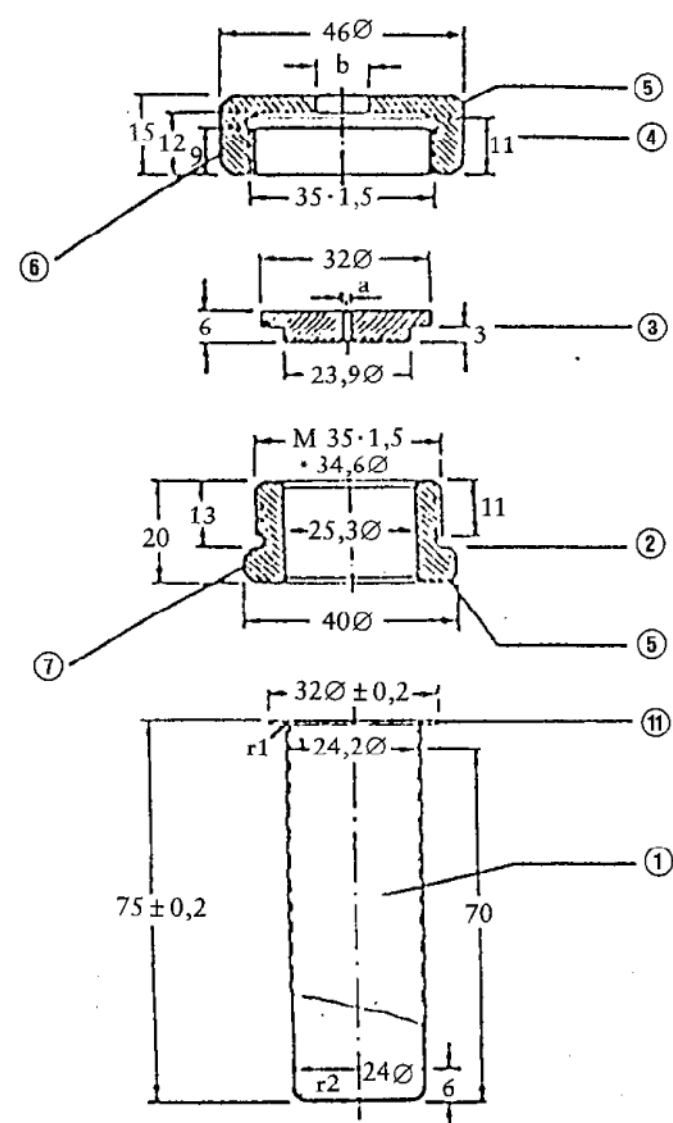
- 1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.
- 2) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990.
- 3) Koenen, H., Ide, K.H. and Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol.3, p. 6–13 ir 30–42.
- 4) NF T 20-038 (September 85). Chemical products for industrial use – Determination of explosion risk.

▼ **B***Priedėlis***Terminio jautrumo bandyme naudojamų medžiagų specifikacijos pavyzdys
(žr. DIN 1623)**

- 1) Vamzdis: medžiagos specifikacija Nr. 1.0336.505 g
- 2) Diafragma: medžiagos specifikacija Nr. 1.4873
- 3) Sandariklis su sriegiu ir veržlė: medžiagos specifikacija Nr. 1.3817

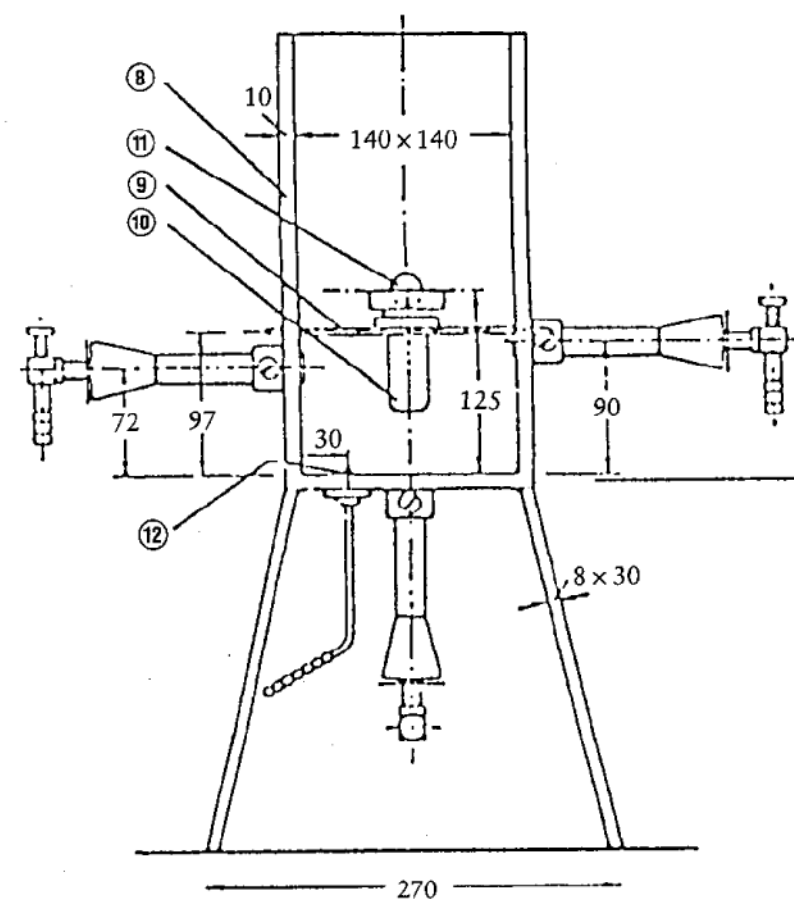
*1 paveikslas***Terminio jautrumo bandymo aparatas**

(visi matmenys milimetrais)



1a pav. Plieninis vamzdis ir priedai

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



1b pav. Kaitinimo ir apsauginis įtaisas

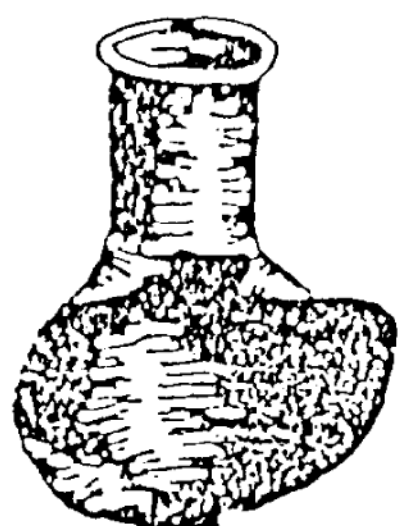
- (7) 2 briaunos 36 dydžio raktui
- (8) skeveldroms atspari dėžė
- (9) 2 strypai vamzdžiui laikyti
- (10) surinktas vamzdis
- (11) užpakalinio degiklio padėtis, kiti degikliai matomi
- (12) tuščiosios eigos purkštukas

▼B

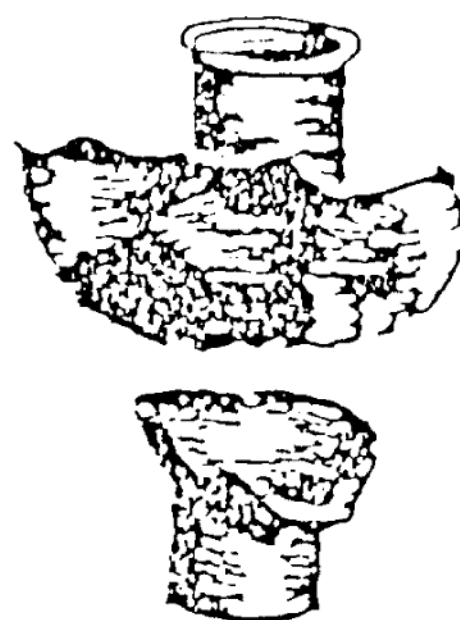
2 paveikslas

Terminio jautrumo bandymas

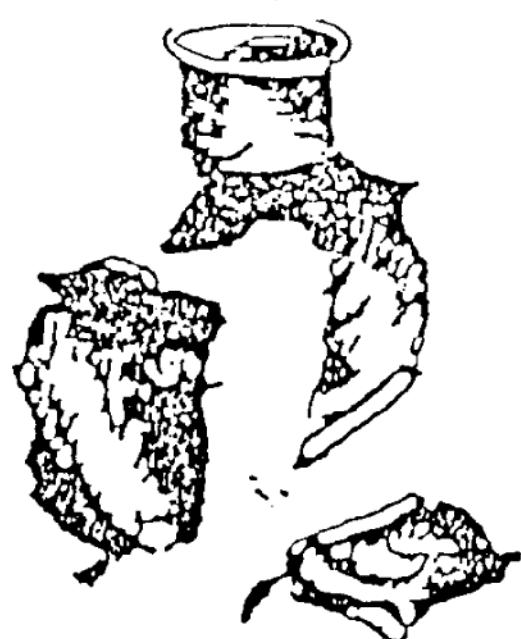
(skeveldrų susidarymo pavyzdžiai)



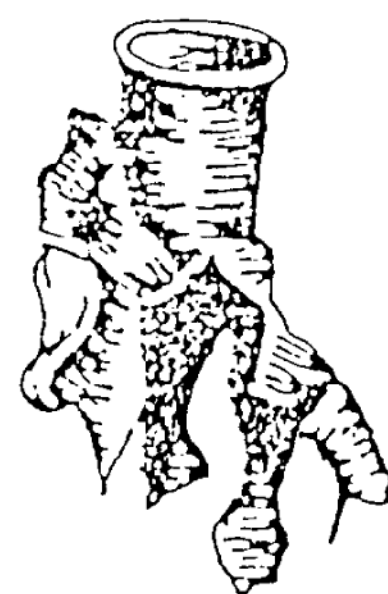
Sprogimas neįvyko



Sprogimas neįvyko



Sprogimas



Sprogimas



Sprogimas

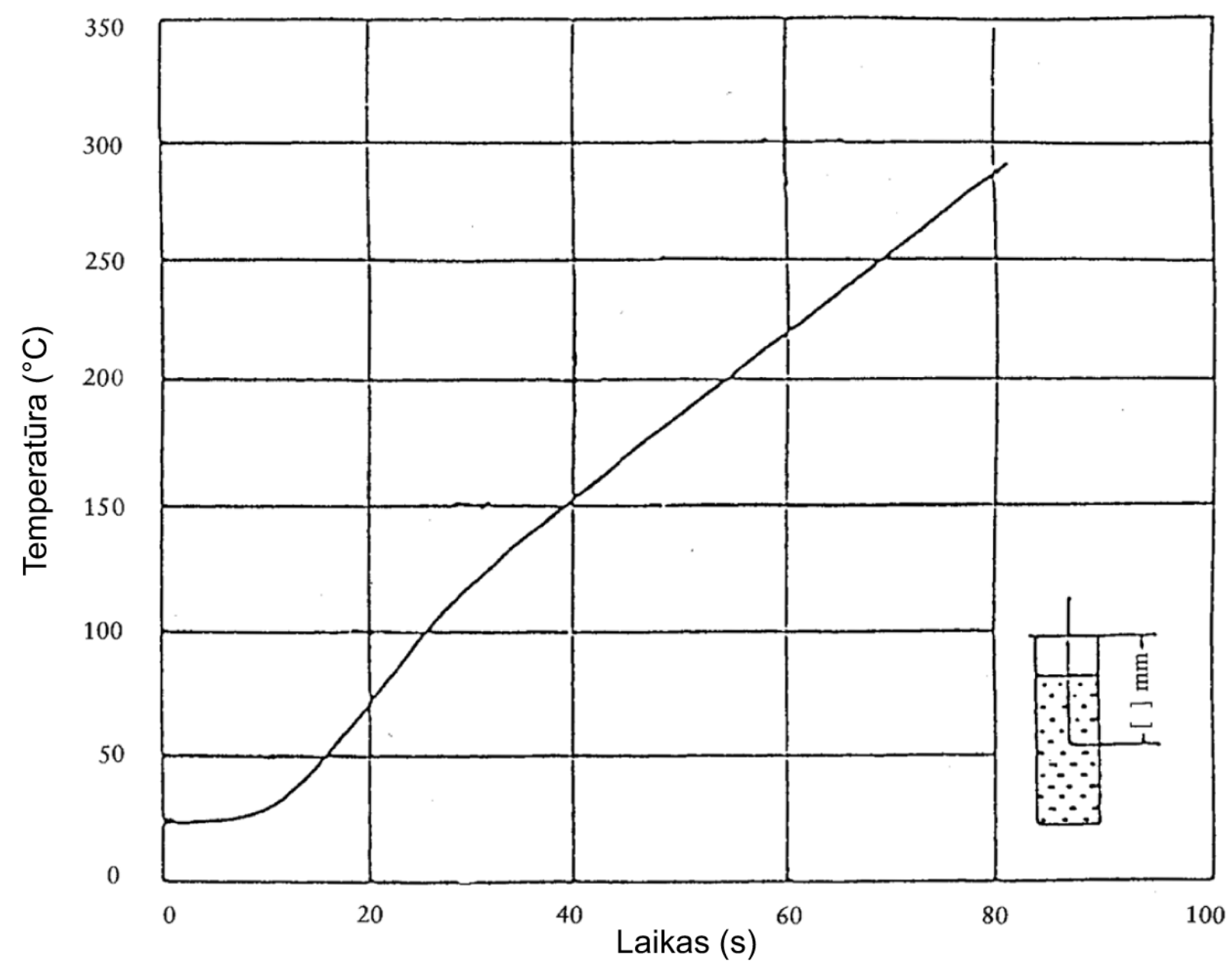


Sprogimas

▼ B

3 paveikslas

Kaitinimo spartos kalibravimas terminio jautrumo bandymui



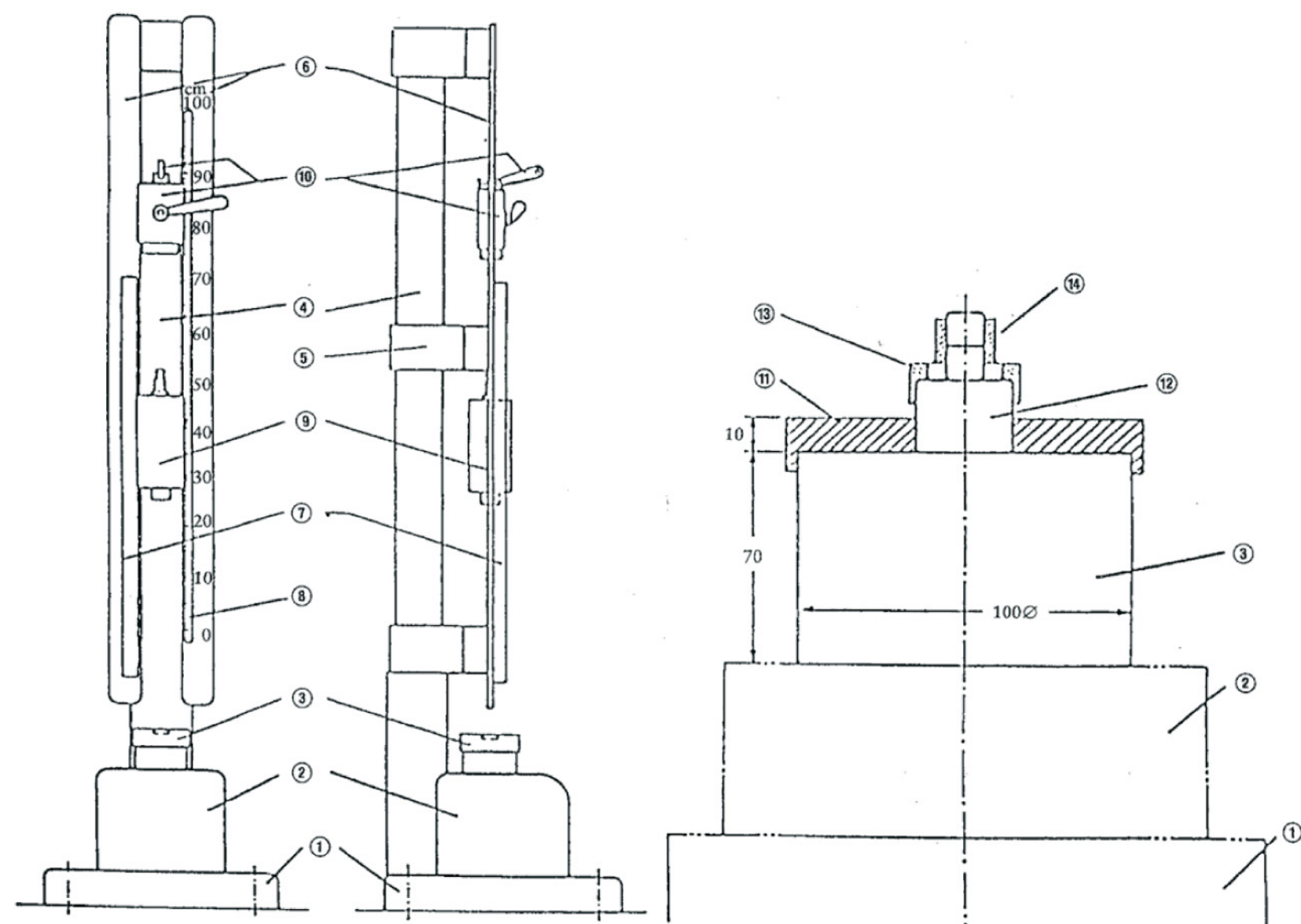
Temperatūros ir laiko priklausomybės kreivė gauta kaitinant dibutilftalatą (27 cm^3) uždaramame (1,5 mm diafragma) vamzdyje, naudojant propano 3,2 litro per minutę srautą. Temperatūra matuota 1 mm skersmens chromelio/aliumelio termoelementas, įdėtas į apvaskalą iš nerūdijančio plieno ir įstatytas vamzdžio viduryje 43 mm žemiau jo briaunos. Kaitinimo sparta $135 \text{ }^{\circ}\text{C}$ – $285 \text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje turi būti nuo 185 iki 215 K/minutę.

▼ B

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

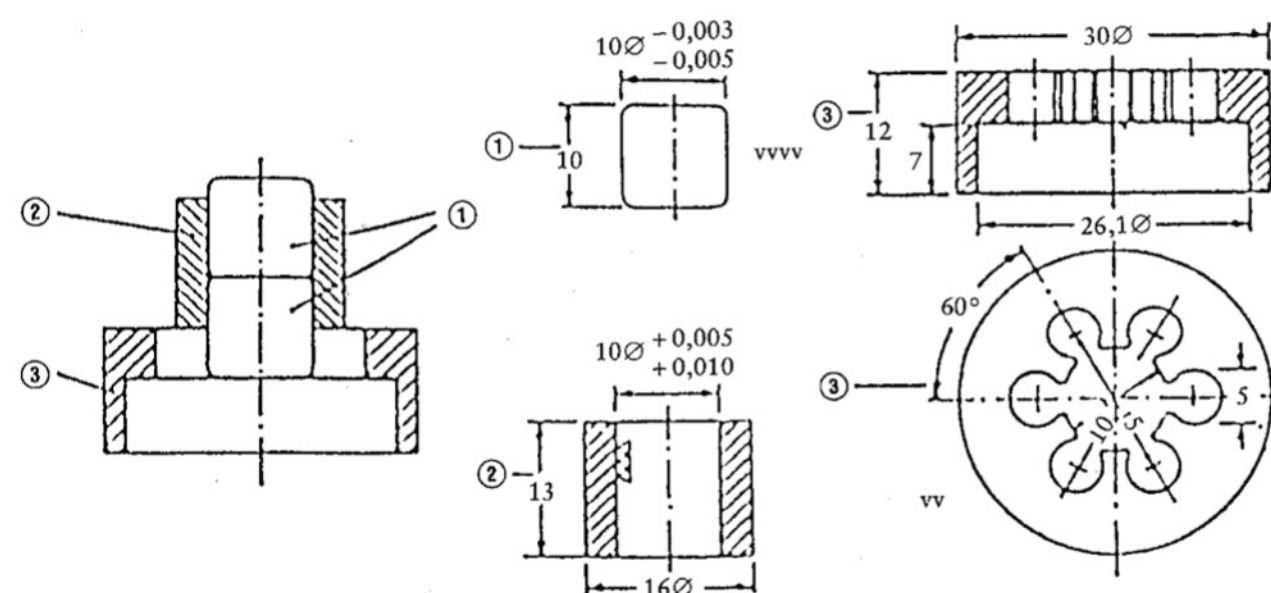
4b pav. Krintantis kūjis, apatinė dalis

- (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



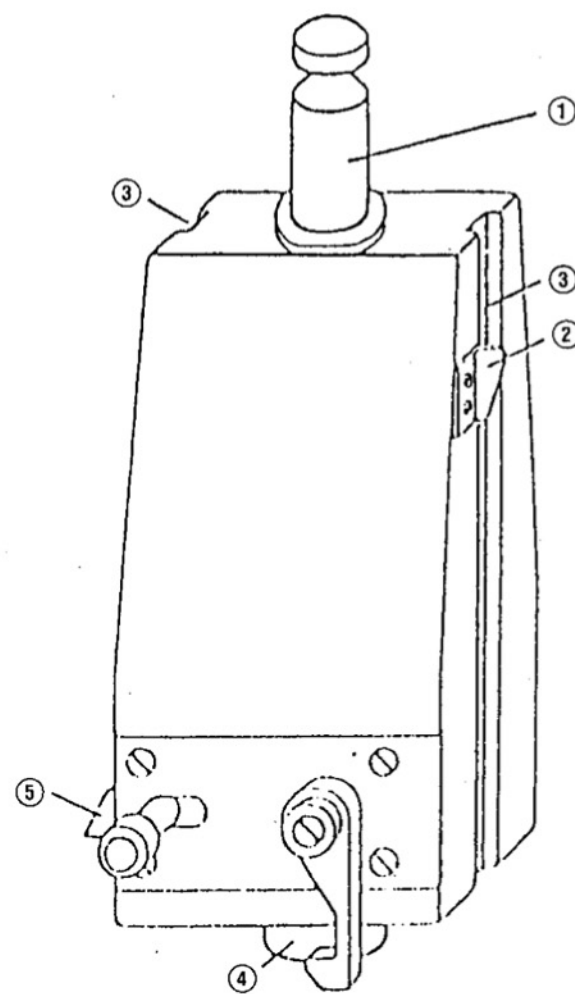
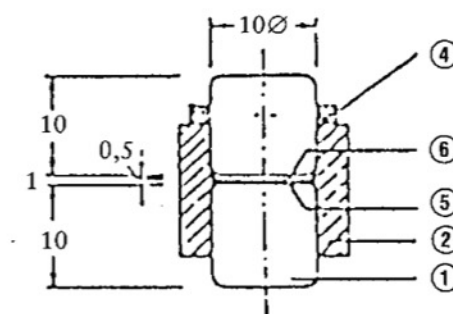
4 paveikslo

tąsa



4c pav. Smūgiavimo įtaisas miltelių arba pastos pavidalo medžiagoms

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



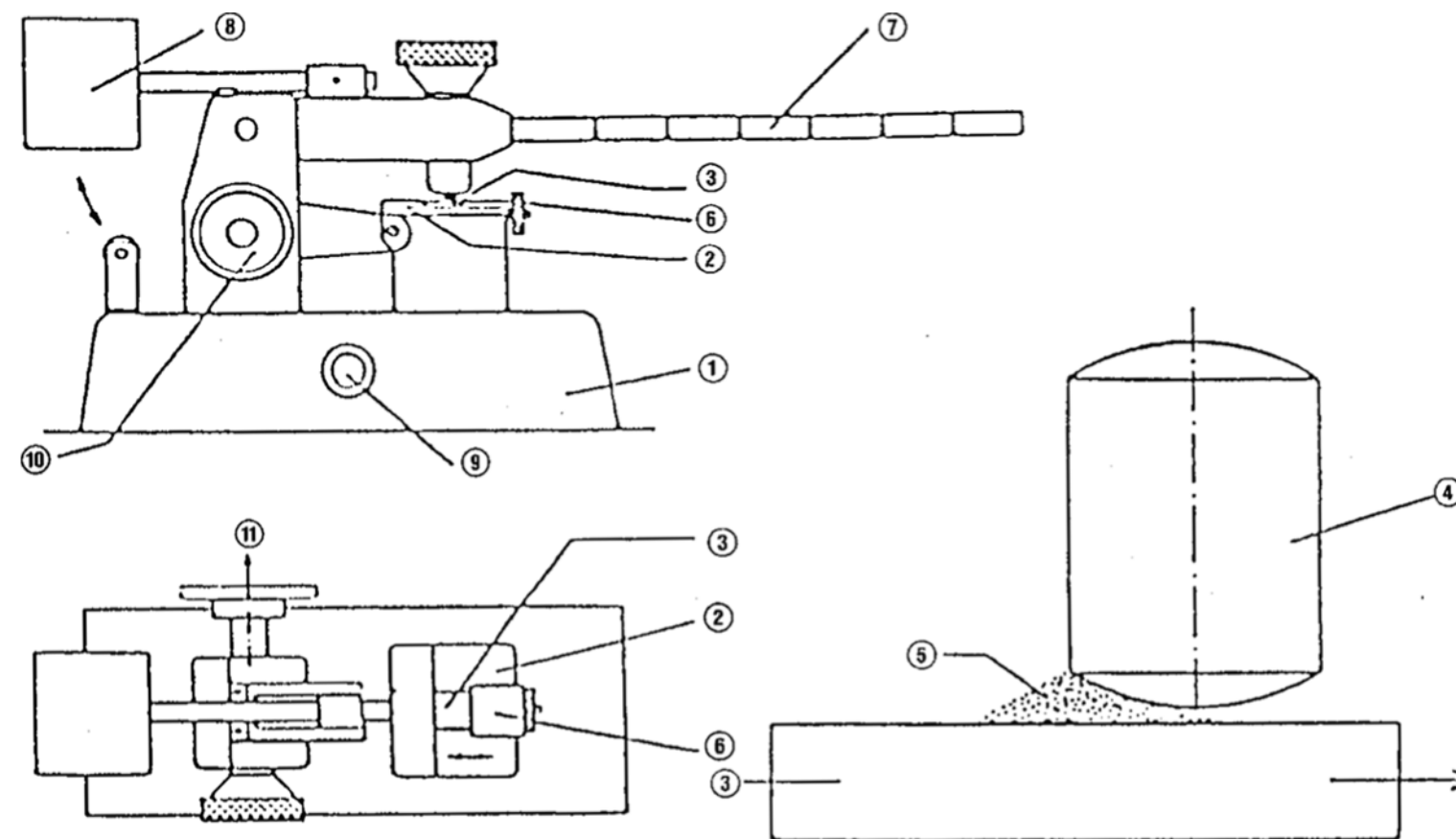
4e pav. Kūjis (kūjo masė 5 kg)

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

▼ B

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 kaitis 10 mm skersmuo » 15mm
- (5) bandinys, apytikriai 10 mm³

5b pav. Kaitis ant bandinio pradinė padėtis

- (6) kaitis laikiklis
- (7) apkrovos svirtis
- (8) atsvaras
- (9) jungiklis
- (10) ratas vežimėlio pradinei padėčiai nustatyti
- (11) elektrinės pavaros variklis

▼B**A.15. UŽSIDEGIMO TEMPERATŪRA (SKYSČIAI IR DUJOS)****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Šiuo bandymu neturi būti bandomos 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.

Užsidegimo temperatūra gali žymiai sumažėti, jei yra katalizinių priemaišų, dėl paviršiaus medžiagos arba dėl didesnio bandymo indo tūrio.

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Užsidegimo laipsnis išreikiamas užsidegimo temperatūra. Užsidegimo temperatūra yra mažiausia temperatūra, kurioje bandomoji medžiaga užsidega, sumaišyta su oru esant bandymo metode apibrėžtomis sąlygoms.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

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

1.4. METODO ESMĖ

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

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Pakartojamumas kinta atsižvelgiant į užsidegimo 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

Bandomosios medžiagos bandinys yra bandomas 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.

▼B**2. DUOMENYS**

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

3. ATASKAITA

Jei įmanoma, bandymų ataskaitoje turi būti tokia informacija:

- tiksli medžiagos specifikacija (identifikavimas ir priemaišos),
- naudotas bandinio kiekis, atmosferos slėgis,
- naudota apatatūra,
- matavimų rezultatai (bandymų temperatūra, užsidegimo rezultatai, atitinkamų vėlinimosi trukmė),
- visos papildomos pastabos, kurios būtų svarbios aiškinant rezultatus.

4. NUORODOS

Nėra.

▼B**A.16. KIETŲJŲ MEDŽIAGŲ SANTYKINĖ UŽSIDEGIMO TEMPERATŪRA****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Šiuo bandymu neturi būti bandomos sprogišios medžiagos ir medžiagos, kurios sąlytyje su oru užsidega kambario temperatūroje.

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

Jei medžiagos reakcijos su deguonimi arba egzoterminio jos skilimo metu susidariusi šiluma aplinkoje išsisklaido nepakankamai greitai, dėl savaiminio įkaitimo įvyksta užsidegimas. Taigi, užsidegimas 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 užsidegimo temperatūra turi būti taikoma tik palyginimui.

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

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

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nenurodytos.

1.4. METODO ESMĖ

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 užsidegimo 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), kuri turėtų programuojamą temperatūros reguliavimą ir kurioje būtų savaiminė oro cirkuliacija bei sprogišio slėgio mažinimo vožtuvas. Norint išvengti galimo sprogišio pavojaus, bet kokios skilimo metu susidarančios dujos turi nepatekti ant elektrinių kaitinimo elementų.

▼B1.6.1.2. *Kubas iš vielos tinklelio*

Iš nerūdijančio plieno pagamintas vielos tinklelis su 0,045 mm akutėmis turi būti supjaustytas pagal 1paveiksle 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 koordinačių 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 pildomas bandomąja medžiaga ir švelniai tapšnojančios dedama daugiau, kol kubas visiškai prisipildo. Toliau kubas kambario temperatūroje pakabinamas krosnies viduryje. Vienas termoelementas dedamas kubo viduryje, 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 užsidega, bandinyje esantis termoelementas rodys labai staigų temperatūros didėjimą palyginti 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:

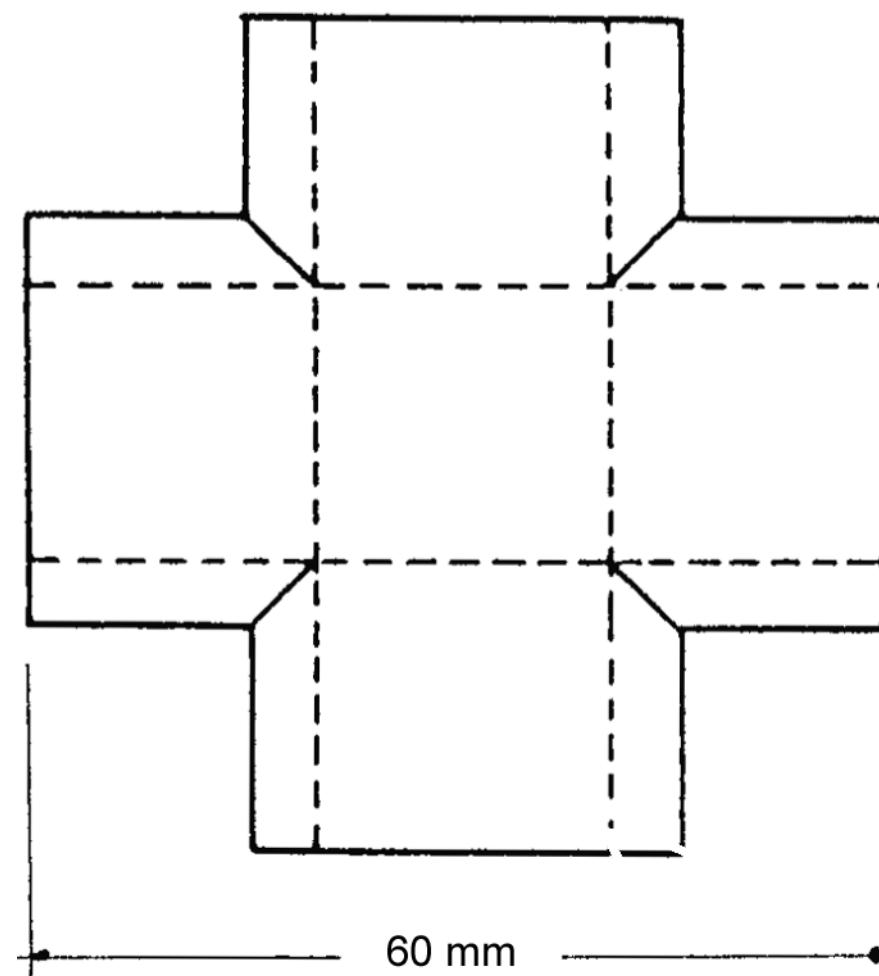
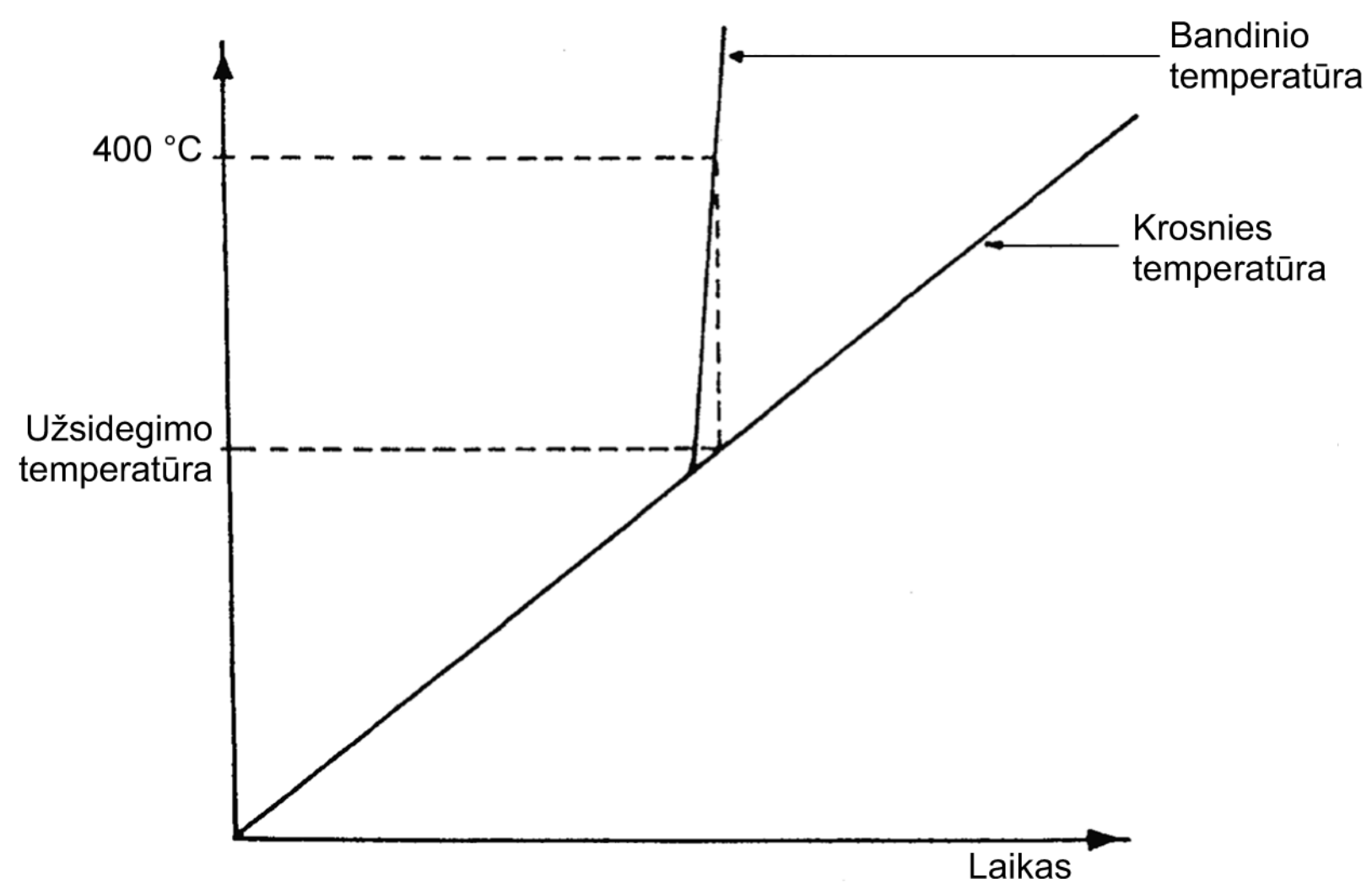
— bandyti pateiktos medžiagos apibūdinimas,

— 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.

▼B*1 paveikslas***20 mm bandymo kubo pavyzdys***2 paveikslas***Tipiška temperatūros kitimo laike kreivė**

▼B**A.17. 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. APIBRĖŽIMAS 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 mišinį, 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 ESME

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 %.

▼ B

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 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje iki pastoviosios masės. Jei bandomosios medžiagos skilimo temperatūra yra mažesnė kaip $105\text{ }^{\circ}\text{C}$, medžiaga turi būti išdžiovinta atitinkamoje mažesnėje temperatūroje.

1.6.1.2. *Degiosios medžiagos*

Degioji medžiaga yra celiuliozės milteliai. Celiuliozės rūšis turi atitikti plonasluoksnėje chromatografijoje arba kolonėlinėje chromatografijoje naudojamą celiuliozę. Tinkama nustatyta 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 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Atšaldoma ir laikoma sandariame inde, jį pripildžius kuo pilniau, kol reikės naudoti, geriausiai per 24 valandas po džiovinimo.

1.6.1.3. *Padegimo šaltinis*

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

1.6.2. **Bandymo eiga***Pastaba*

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

1.6.2.1. *Išankstinis bandymas*

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

▼B

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 papildomas mišinio, jo neplakant ir įpilant nedidelį perteklių. Forma vieną kartą numetama iš 2 cm aukščio ant kieto paviršiaus, o medžiagos perteklius nubraukiamas įstrižai pasukta plokšte. 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 kryptčiai.

Oro greitis turi būti pakankamas, kad dūmai negalėtų patekti į laboratoriją, ir bandymo metu turi nesikeisti. Apie įtaisą turi būti įtaisyta nuo traukimo 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.

▼B

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 nesisirti nuo aritmetinio vidurkio vertės daugiau kaip 10 %; kitu atveju turi būti patobulinti malimo ir maišymo metodai.

Gautą didžiausiąją 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 identifikavimas, 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 apytikrą degimo trukmę, nustatytą išankstiniame saugos (atrankos) bandyme bandomajai ir etaloninei medžiagoms,
- bandymų su inertiška medžiaga rezultatai, jei yra,
- bandymų inertiškoje atmosferoje rezultatai, jei yra.

▼B

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.

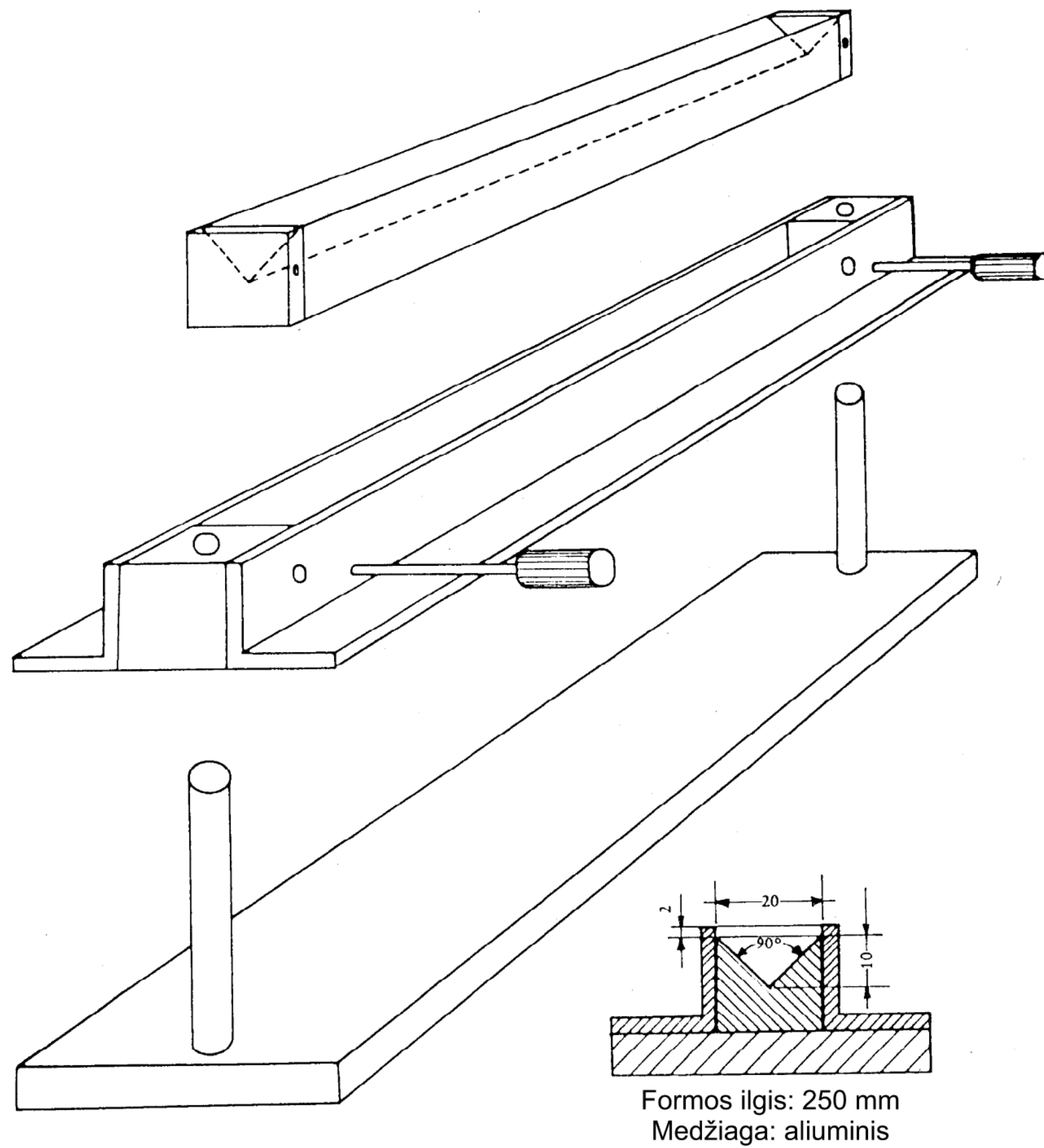
▼B

Priedėlis

Paveikslas

Krūvelei ruošti naudojama forma ir priedai

(visi matmenys milimetrais)



▼B**A.18. POLIMERŲ SKAITINĖS VIDUTINĖS MOLEKULINĖS MASĖS
IR MOLEKULINĖS MASĖS PASISKIRSTYMAS****1. METODAS**

Šis gel chromatografijos (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 gel chromatografijai (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. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

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

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

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, nustato santykis M_w/M_n .

▼B

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 absoliučiąjų verčių gali skirtis didesniu arba mažesniu laipsniu. Jei naudojami kiti etalonai, pvz., polietilenglikolis, polioksietilenas, polimetilmetakrilatas, poliakrilo rūgštis, turi būti nurodyta priežastis.

1.4. BANDYMŲ METODO ESMĖ

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 ir geriausiai būtų apskritai panašios sandaros polimerus, pvz., įvairius polistireno etalonus. Vertikalliojoje ašyje žymint įvairios molekulinės masės išplautų dalelių kiekį, kuris reiškiamas mase, o horizontaliojoje ašyje – molekulinės masės logaritmą, dažniausiai gaunama Gauso kreivė, kartais mažos molekulinės masės pusėje iškreipta nedidele uodega.

▼B

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:

$$M_p < 2\,000 \qquad M_w/M_n < 1,20$$

$$2\,000 \leq M_p \leq 10^6 \qquad M_w/M_n < 1,05$$

$$M_p > 10^6 \qquad M_w/M_n < 1,20$$

(M_p yra etalono molekulinė masė, atitinkanti smailės viršūnę)

1.6. BANDYMŲ METODO APRAŠYMAS

1.6.1. Etaloninių polistireno tirpalų ruošimas

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

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

1.6.2. Bandinio tirpalo ruošimas

Iš esmės tie patys reikalavimai taikomi ruošiant bandinių tirpalus. Bandinys ištirpinamas tinkamame tirpiklyje, pvz., tetrahidrofurane, kruopščiai maišant. Jokiu būdu negalima tirpinti naudojant ultragarinę 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,

— nudujinimo įtaisas (jei reikia),

— siurblys,

▼B

- pulsacijų slopintuvas (jei reikia),
- injekcijos sistema,
- chromatografinės kolonėlės,
- detektorius,
- debitmatis (jei reikia),
- duomenų registruotuvas-procesorius,
- atliekų indas.

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

1.6.4. Injekcijos ir tirpiklio tiekimo sistema

Tam tikras bandinio tirpalo tūris griežtai nustatytoje zonoje įleidžiamas į kolonėlę, naudojant automatinį bandinio tiektuvą arba rankiniu būdu. Švirkšto plunžerio per greitas ištraukimas arba spaudimas įleidžiant rankiniu būdu gali būti molekulinų 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). Atskirymui 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

Atskirymui 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 randamas pagal tokią lygtį:

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

kurioje:

N = teorinių lėkštelių skaičius

V_e = smailės viršūnę atitinkantis eliuavimo tūris

▼ B

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 statusas. Kolonėlės atskyrimo efektyvumas nustatomas pagal tokią priklausomybę:

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

kurioje:

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

$V_{e, (10M_x)}$ = polistireno, turinčio 10 kartų didesnę molekulinę masę, eliuavimo tūris.

Sistemos atskiriamoji galia dažniausiai apibrėžiama taip:

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

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 grynai (tetrahidrofurano grynumas 99,5 %). Tirpiklio indas (jei reikia, su inertinių dujų atmosfera) turi būti pakankamai didelis kolonėlei kalibruoti ir kelių bandinių analizei atlikti. Tirpiklis, prieš jį tiekiant siurbliu į kolonėlę, turi būti nудujintas.

1.6.9. Temperatūros reguliavimas

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

▼ B**1.6.10. Detektorius**

Detektoriaus paskirtis – kiekybiškai registruoti iš kolonėlės išplauto bandinio koncentraciją. Norint, kas smailės nebūtų labai plačios, detektoriaus kiuvetės tūris turi būti kuo mažesnis. Jis neturi būti didesnis kaip 10 µl, išskyrus šviesos sklaidos ir klampio 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, klampio 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. Bandymų medžiaga

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

▼B

- bandinio apdorojimo aprašymas, pastebėjimai, problemos.

2.2.2. Aparatūra

- tirpiklio rezervuaras, inertinės dujos, eliuento nудujinimas, eliuento sudėtis, priemonės,
- 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 (aparatinė įranga 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,

▼B

- 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 laiko pagrindu: 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,
- suglodinimo metodų aprašymas, jei jie buvo taikyti,
- bandinio ruošimo ir išankstinio apdorojimo metodikos,
- duomenys apie neištirpusias daleles, jei yra,
- injekcijos tūris (μ l) 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.

▼ B*Priedas***Kitų metodų polimerų skaitinei vidutinei molekulinei masei nustatyti 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), yra alternatyvūs metodai, pvz.:

1. Koligatyviųjų savybių naudojimas**1.1. Ebulioskopija (krioskopija):**

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

Taikomumas: $M_n < 20\,000$.

1.2. Garų slėgio mažėjimas:

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

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

1.3. Membraninė osmometrija:

remiasi osmoso principu, t. y. tirpiklio molekulių savaiminiu perėjimu per puslaidę membraną iš praskiesto tirpalo į koncentruotą tirpalą. Bandyje 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: M_n 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: $M_n < 20\,000$.

▼B**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 (pasiklovimui 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: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.
- 7) Schröder, 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.

▼B**A.19. 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 ilgios šakotos grandinės polimerams.

1.2. APIBRĖŽIMAI 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, duoda santykis M_w/M_n .

▼B

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 absoliučiąjų verčių gali skirtis didesniu arba mažesniu laipsniu. Jei naudojami kiti etalonai, pvz., polietilenglikolis, polioksietilenas, polimetilmetakrilatas, poliakrilo rūgštis, turi būti nurodyta priežastis.

1.4. BANDYMŲ METODO ESMĖ

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, 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. Vertikalliojoje ašyje žymint įvairios molekulinės masės išplautų dalelių kiekį, kuris reiškiamas mase, o horizontaliojoje ašyje – molekulinės masės logaritmą, paprastai gaunama Gauso kreivė, kartais mažos molekulinės masės pusėje iškreipta nedidele uodega.

▼B

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, atinkanti smailės viršūnę).

1.6. BANDYMŲ METODO APRAŠYMAS

1.6.1. Etaloninių polistireno tirpalų ruošimas

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

Pasirinktų etalonų koncentracijos priklauso nuo įvairių veiksnių, pvz., injekcijos tūrio, tirpalo klampio ir analizinio detektoriaus jautrumo. Norint išvengti perkrovos, didžiausias injekcijos tūris turi būti pritaikytas kolonėlės ilgiui. Taikant GPC medžiagų atskyrimui analizėje, tipiški injekcijos tūriai 30 cm × 7,8 mm kolonėlei paprastai yra 40-100 μl. Galima naudoti didesnę tūrį, tačiau jis neturi viršyti 250 μl. Prieš pradedant tikrąją 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 ultragaršinę vonią. Jei būtina, bandinio tirpalas gryninamas, filtruojant per membranineį 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.

▼ B**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 nopolimerinių 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

- rezervuaras tirpikliui,
- nudujinimo įtaisas (jei reikia),
- siurblys,
- pulsacijų slopintuvas (jei reikia),
- injekcijos sistema,
- chromatografinės kolonėlės,
- detektorius,
- debitmatis (jei reikia),
- duomenų registruotuvas-procesorius,
- atliekų indas.

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

1.6.5. Injekcijos ir tirpiklio tiekimo sistema

Tam tikras bandinio tirpalo tūris griežtai nustatytoje zonoje įleidžiamas į kolonėlę, naudojant automatinį bandinio tiekuvą arba rankiniu būdu. Švirkšto plunžerio per greitas ištraukimas arba spaudimas įleidžiant rankiniu būdu gali būti molekulinų 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). Atskirymui 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).

▼ B**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 randamas pagal tokią lygtį:

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

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 statusas. Kolonėlės atskyrimo efektyvumas nustatomas pagal tokią priklausomybę:

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

kurioje:

V_e, M_x = polistireno, turinčio molekulinę masę M_x , eliuavimo tūris,

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

Sistemos atskiriamoji galia dažniausiai apibrėžiama taip:

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

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).

▼B**1.6.9. Tirpikliai**

Visi tirpikliai turi būti labai grynai (tetrahidrofurano grynumas 99,5 %). Tirpiklio indas (jei reikia inertinių dujų atmosferoje) turi būti pakankamai didelis kolonėlei kalibruoti ir kelių bandinių analizei atlikti. Tirpiklis, prieš tai kaip jį tiekti siurbliu į kolonėlę, turi būti nudujintas.

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, kas smailės nebūtų labai plačios, detektoriaus kiuvetės turis turi būti kuo mažesnis. Jis neturi būti didesnis kaip 10 µl, išskyrus šviesos sklaidos ir klampio 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, klampio 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. Eliavimo kreivės paprastai vertinamos elektroninio duomenų apdorojimo būdu. Atliekant apskaičiavimus rankiniu būdu, galima pasižiūrėti į ASTM D 3536-91 (3).

▼B

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. BANDYMŲ ATASKAITA

Bandymų ataskaitoje turi būti tokia informacija:

2.2.1. Bandymų medžiaga

- turima informacija apie bandomąją medžiagą (identiškus, priedai, priemaišos),
- bandinio apdorojimo aprašymas, pastebėjimai, problemos.

2.2.2. Aparatūra

- tirpiklio rezervuaras, inertinės dujos, eliuento nudojinimas, 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 (aparatinė įranga ir programinė įranga).

2.2.3. Sistemos kalibravimas

- kalibracinės kreivės gavimo metodo detalus aprašymas,

▼B

- 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 laiko pagrindu: 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,
- suglodinimo metodų aprašymas, jei jie buvo taikyti,
- bandinio ruošimo ir išankstinio apdorojimo metodikos,
- duomenys apie neištirpusias daleles, jei yra,

▼B

- injekcijos tūris (μ l) 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.

▼B*Priedas***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:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc),$$

kurioje:

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 = 9×10^{-5} ml/mg.

Toliau gautoji K vertė $3,05 \times 10^{11}$ naudojama apskaičiuoti teoriškam detektoriaus atsakui, jei pro detektorių būtų išplauta 100 % išsvirkšto polimero kiekio.

▼ B**A.20. POLIMERŲ TIRPIMAS (EKSTRAHAVIMAS) VANDENYJE****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 tirpimas (ekstrahavimas) gali būti tiriamas kitų metodų pagalba. Tokiais atvejais turi būti pateiktos visos metodo detalės ir pagrindimas.

1.2 ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.3 BANDYMŲ METODO ESMĖ

Polimerų tirpimas (ekstrahavimas) 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 BANDYMŲ 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. Bandinių 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.

▼B**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 atinkamu analizės metodu skaidrioje vandeninėje fazėje nustatoma polimero koncentracija. Jei tinkamų metodų analizuoti vandeninėje terpėje nėra, bendrasis tirpumas (ekstrahuojamumas) 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 tirpimas (ekstrahavimas) vandenyje 37 °C temperatūros ir pH 2 bei pH 9 sąlygomis gali būti nustatytas tokiu pat būdu, kuris aprašytas atliekant bandymą 20 °C temperatūroje. pH vertė gali būti reguliuojama pridendant tinkamo buferinio tirpalo arba tinkamų rūgščių ar šarmų, pvz., druskos rūgšties, acto rūgšties, analiziškai gryno natrio ar kalio hidroksido, arba NH₃.

Atsižvelgiant į taikomą analizės metodą turi būti atliekami vienas arba du bandymai. Kai yra pakankamai specifiniai tiesioginės polimerų komponentų analizės vandeninėje terpėje metodai, turėtų pakakti vieno anksčiau aprašyto bandymo. Tačiau kai tokių metodų nėra, o polimero tirpimo (ekstrahavimo) 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 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 CO₂ gauti, kurio kiekis įvertinamas IR arba cheminės analizės metodu,

▼B

— atominė absorbcinė analizė (AAS) arba jos induktyviai sužadintos plazmos (ICP) emisijos atitikmuo silicio arba metalų turintiems polimerams nustatyti,

— UV absorbcija arba spektrofluorimetrija arilų polimerams,

— 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 tirpimo (ekstrahavimo) 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 nelieta 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).

▼B**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 (paprasčiausiai mgC/l), taip pat masės vienetais pradinio bandinio masei (paprasčiausiai mgC/g).

Jei tarp rezultatų, gautų dideliame ir mažame bandinio masės bei vandens santykiui, skirtumo nėra, tai galėtų rodyti, kad visi ekstrahuojami komponentai buvo iš tikrųjų ekstrahuoti. Tokiu atveju, tiesioginė analizė paprasčiausiai 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 pradiniam bandinyje.

3. ATASKAITA**3.1. BANDYMŲ ATASKAITA**

Bandymų ataskaitoje turi būti tokia informacija:

3.1.1. Bandomoji medžiaga

— turima informacija apie bandomąją medžiagą (identiškas, 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/l; 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 Kunststoffzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B**A.21. OKSIDUOJAMOSIOS 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.

▼B

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. BANDYMŲ METODO ESMĖ

Bandomasis skystis maišomas masių santykiu 1:1 su pluoštine celiulioze ir mišinys dedamas į slėginį indą. Jei maišant arba dedant įvyksta savaiminis užsidegimas, toliau bandymo daryti nereikia.

Jei mišinys savaime neužsidega, daromas 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 eksikatoriuje 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.

▼B1.6.1.2. *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 cilindą, įstatant uždegimo žvakę ir ventiliavimo angos aklidangtį. Indas su 20 mm skersmens anga iš abiejų galų viduje platinamas iki 19 mm gylio ir sriegiamas 1 „Britų standarto vamzdinis sriegis arba jo metrinis atitikmuo. Slėgio mažinimo atvamzdis įsriegiamas į kreivąjį slėginio indo paviršių 35 mm nuo vieno galo ir 90° kampu ištekintoms plokštelėms. Gręžiama 12 mm gylio anga, kurioje daromas sriegis įsukti atvamzdžiui, turinčiam „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 žvakę sandarinama inertinės medžiagos sandarikliu hermetiškumui užtikrinti. Visą sąranka tvirtinama laikančiąjame stovė naudojimui tinkamame aukštyje (2 paveikslas). Stovą paprastai sudaro mažo anglio plieno pagrindo plokštė, kurios matmenys yra 235 mm × 184 mm × 6 mm, ir 185 mm ilgio kvadratinė tuščiavidurė sekcija, kurios matmenys – 70 mm × 70 mm × 4 mm.

Vienas kvadratinės tuščiavidurės sekcijos galas nupjaunamas iš abiejų priešingų šonų dviem plokščiabriaunėms 86 mm ilgio kojoms gauti. Šių plokščiųjų šonų galai nupjaunami 60° horizontalės atžvilgiu ir privirinami prie pagrindo plokštės. Viena viršutinio galo šone išpjaunama 22 mm pločio ir 46 mm gylio išdroža, 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 sparnuotiesiems varžtams, kurie 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.

▼B**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 paveikslė. 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 tapšnojanč ir užtikrinti, kad jis būtų dedamas apie uždegimo apviją ir gerai su ja liestųsi. Svarbu kad dedant mišinį apviją nebūtų deformuota, kadangi dėl to gali būti gauti klaidingi rezultatai ⁽³⁾. Trūkioji membrana dedama į vietą ir gerai užsukamas tvirtinimo kamštis. Indas su įkrova trūkioja 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 laiko 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 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 didesnę nei bandymui reikia bandomojo skysčio ir celiuliozės 1:1 mišinio kiekį ir supilant 5 $\pm$ 0,1 g į slėginį indą. Kiekvienam bandymui ruošiamas naujas mišinys.

⁽³⁾ Visų pirma turi būti išvengta gretimų apvijų vijų sąlyčio.

▼ B

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 celiulioze vidutinė slėgio didėjimo trukmė (ms)
Amonio dichromatas, sotasis vandeninis tirpalas	20 800
Kalcio nitratas, sotasis vandeninis tirpalas	6 700
Geležies (III) nitratas, sotasis vandeninis tirpalas	4 133
Ličio perchloratas, sotasis vandeninis tirpalas	1 686
Magnio perchloratas, sotasis vandeninis tirpalas	777
Nikelio nitratas, sotasis 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, sotasis vandeninis tirpalas	^(b)
Natrio chloratas, 40 % vandeninis tirpalas	2 555 ^(d)
Natrio nitratas, 45 % vandeninis tirpalas	4 133
<i>Inertinė medžiaga</i>	
Vanduo: celiuliozė	^(c)

^(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.

▼B**3. ATASKAITA****3.1. BANDYMŲ ATASKAITA**

Bandymų ataskaitoje pateikiama ši informacija:

- bandomosios medžiagos identiškumas, 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.

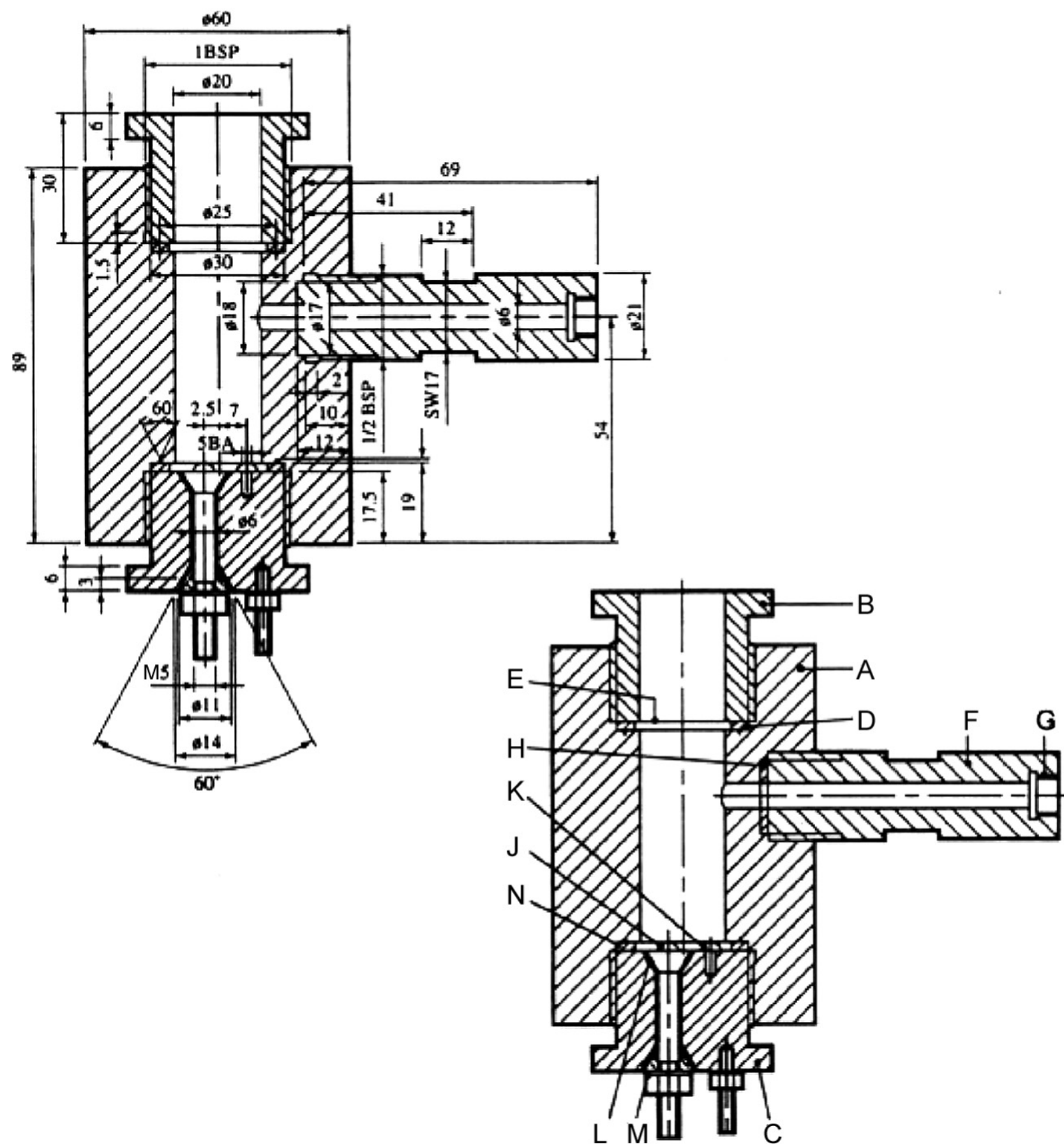
$\nabla \underline{\mathbf{B}}$

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

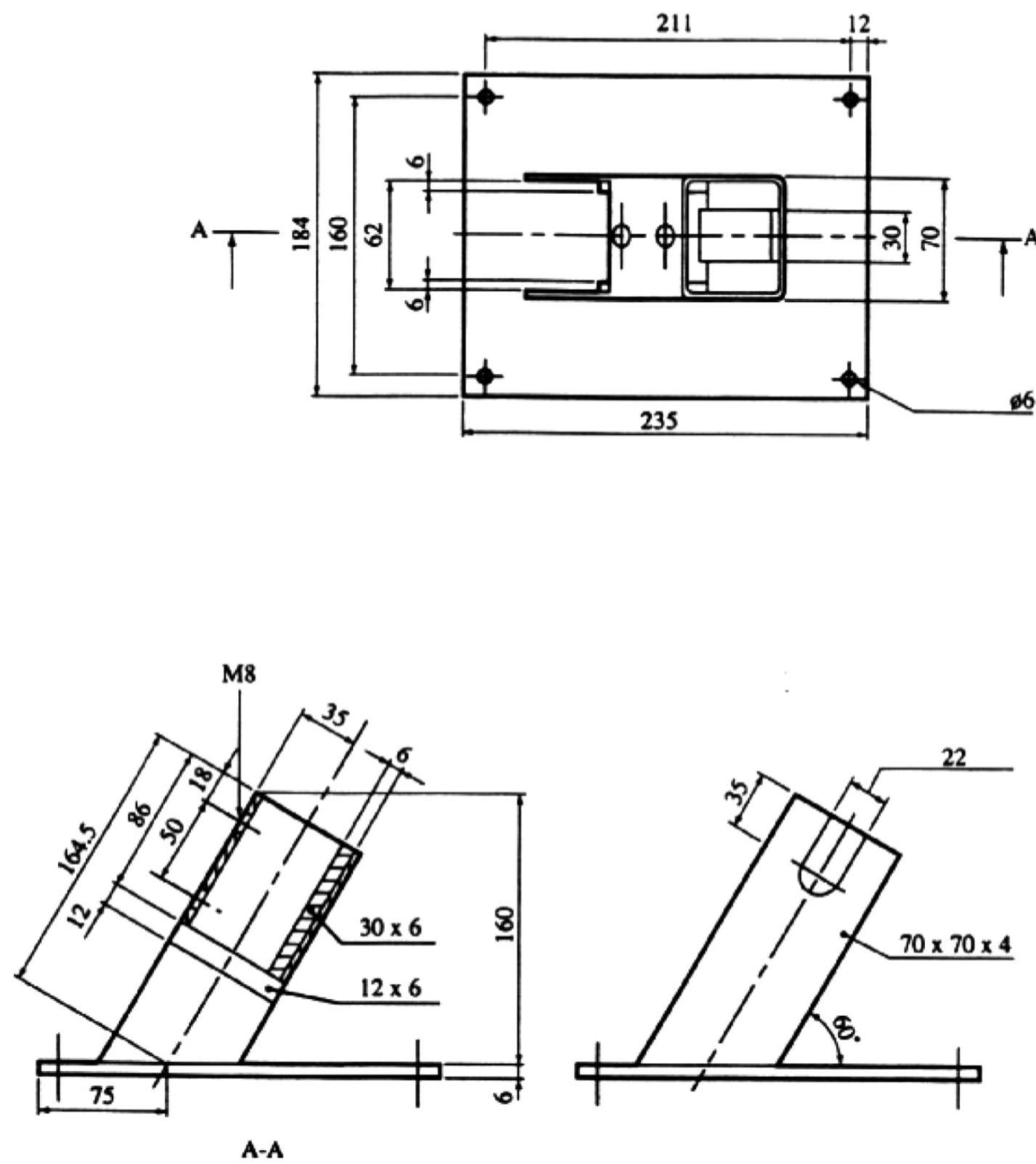


(A) Slėginio indo korpusas	(B) Trūkiosios membranos tvirtinimo kamštis	(C) Uždegimo žvakė
(D) Minkštas švininis tarpiklis	(E) Trūkioji membrana	(F) Atvamzdis
(G) Slėgio keitlio galvutė	(H) Tarpiklis	(J) Izoliuotas elektrodas
(K) Įžemintas elektrodas	(L) Izoliacija	(M) Plieninis kūgis
(N) Tarpiklio deformavimo griovelis		

$\nabla \underline{\mathbf{B}}$

2 paveikslas

Laikantysis stovas



3 paveikslas

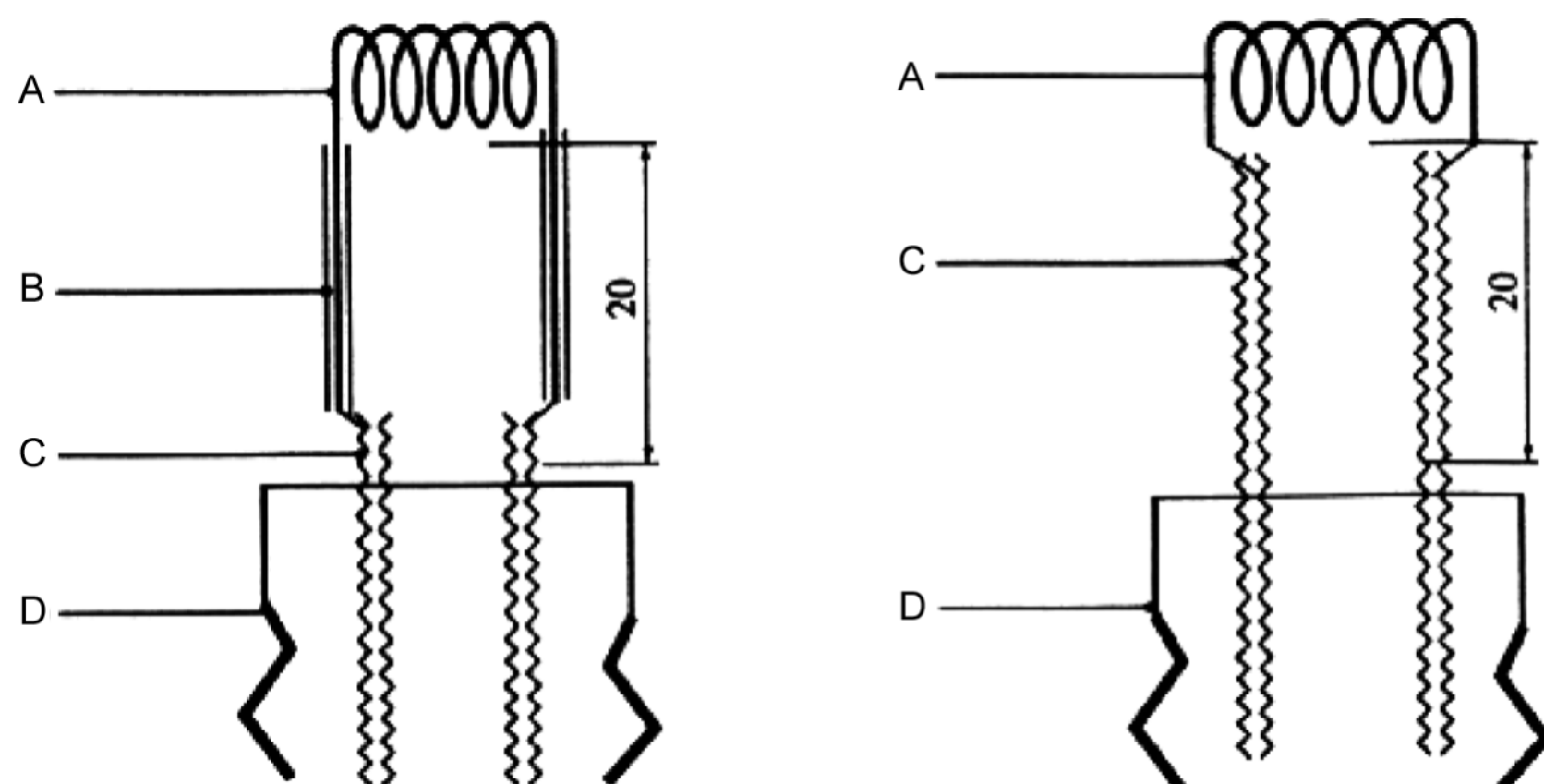
Uždegimo sistema

(A) Uždegimo
apvija

(B) Izolacija

(C) Elektrodai

(D) Uždegimo
žvakė



Pastaba: galima naudoti bet kurią iš šių schemų.

▼ **M1****A.22. PLAUSĖLIŲ 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 % pasiklivimo lygmenų ($LWGMD \pm$ dviguba standartinės paklaidos vertė), ataskaitoje pateikta vertė (bandymo vertė) bus imties apatinio 95 % pasiklivimo režio 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 $\times 10\,000$ arba didesniai 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 vienkartinės 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 $\times 10\,000$ didinimą;
- įvairios priemonės: mentelės, 24 tipo skalpelis, pincetas, SEM mėgintuvėliai, grafitiniai klėjai arba grafitinė lipnioji juosta, sidabriniai klėjai;
- ultragarsinis zondas arba stalinė ultragarsinė vonia;
- kerno ėmiklis arba kamščių grąžtas, kerno mėginams iš MMMF audinių lakštų imti.

⁽¹⁾ Šis didinimas nurodomas 3 µm plaušeliams, 6 µm plaušeliams labiau gali tikti $\times 5\,000$ 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 gražtas 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 ėminus.. Jei įmanoma, turi būti imami šeši ėminiai, siekiant įvertinti erdvinius biriosios medžiagos nukrypimus.

Šeši kerno ėminiai truginami 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 zondų, 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 siurbama 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.

Filtrą 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 klėjais. Elektriniam kontaktui pagerinti bent trijose stovo ir filtro kraštų vietose užtepama sidabrinių klijų. Išdžiūvus klėjams/sidabro klėjams, 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 $\times 2\,000$ didinimui.

1.5.3.3.2. Darbas

SEM turi dirbti naudojant 10 000 didinimą ⁽¹⁾, esant sąlygoms, užtikrinančioms gerą skyrą ir priimtina vaizdą, kai mažas skleidimo greitis, pvz., 5 s kadru. 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° 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 ($> 5\ \mu\text{m}$).

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, skaičiuotinių 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 didesnę 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 automatinės 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 ($\ln D$) aritmetinis vidurkis (vidutinis $\ln D$) ir standartinis nuokrypis ($SD_{\ln D}$).

$$\text{vidutinis } \ln D = \frac{\sum \ln D}{n} \quad (1)$$

▼ M1

$$SD_{\ln D} = \sqrt{\frac{\sum (\ln D - \text{vidutinis } \ln D)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Standartinės paklaidos vertei ($SE_{\ln D}$) gauti standartinis nuokrypis dalijamas iš matavimų skaičiaus (n) kvadratinės šaknies.

$$SE_{\ln D} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

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.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{vidutinis } \ln D - 2SE_{\ln D})} \quad (4)$$

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-weighted 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.

▼ **B****B DALIS. TOKSIŠKUMO IR KITO POVEIKIO SVEIKATAI
NUSTATYMO METODAI**

TURINYS

BENDRASIS ĮVADAS

- B.1 bis. ŪMUS ORALINIS TOKSIŠKUMAS. FIKSUOTŲJŲ DOZIŲ METODAS
- B.1 tris. ŪMUS ORALINIS TOKSIŠKUMAS. ŪMAUS TOKSIŠKUMO KLASĖS METODAS
- B.2. ŪMINIS TOKSIŠKUMAS (INHALIACINIS)
- B.3. ŪMINIS TOKSIŠKUMAS (PER ODA)
- B.4. ŪMUS TOKSIŠKUMAS. ODOS DIRGINIMAS AR ĖSDINIMAS
- B.5. ŪMUS TOKSIŠKUMAS. AKIŲ DIRGINIMAS AR ĖSDINIMAS
- B.6. ODOS SENSIBILIZACIJA
- B.7. PAKARTOTINOS DOZĖS (28 DIENO) TOKSIŠKUMAS (PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ)
- B.8. KARTOTINIŲ DOZIŲ (28 DIENOS) TOKSIŠKUMAS (INHALIACINIS)
- B.9. KARTOTINIŲ DOZIŲ (28 DIENOS) TOKSIŠKUMAS (PER ODA)
- B.10. MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJŲ TYRIMAS *IN VITRO*
- B.11. MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ KAULŲ ČIULPŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJOS TYRIMAS *IN VIVO*
- B.12. MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ ERITROCITŲ MAŽŲJŲ BRANDUOLIŲ TYRIMAS *IN VIVO*
- B.13/14. MUTAGENIŠKUMAS – GRĮŽTAMŲJŲ MUTACIJŲ BAKTERIOSE TYRIMAS
- B.15. MUTAGENIŠKUMO TYRIMAS IR ATRANKA PAGAL KARCINOGENIŠKUMĄ GENŲ MUTACIJOS – *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
- B.16. MITOZINĖ REKOMBINACIJA – *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
- B.17. MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ LĄSTELIŲ GENŲ MUTACIJŲ TYRIMAS *IN VITRO*
- B.18. DNR PAŽAIDOS IR JŲ REPARACIJA – NEPLANUOTA DNR SINTEZĖ – ŽINDUOLIŲ LĄSTELĖSE *IN VITRO*
- B.19. APSIKEITIMO SESERINĖMIS CHROMATIDĖMIS TYRIMAS *IN VITRO*
- B.20. SU LYTIMI SUSIJĘS RECESYVINIS LETALUS TESTAS *DROSOPHILA MELANOGASTER* TARPE

▼B

- B.21. ŽINDUOLIŲ LĄSTELIŲ TRANSFORMACIJOS TESTAI *IN VITRO*
- B.22. GRAUŽIKŲ DOMINANTINIS LETALINIS TESTAS
- B.23. ŽINDUOLIŲ SPERMATOGONIJŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJOS TYRIMAS
- B.24. PELIŲ TAŠKINIS TESTAS
- B.25. PELIŲ PAVELDĖTA TRANSLOKACIJA
- B.26. SUBCHRONIŠKO ORALINIO TOKSIŠKUMO BANDYMAS 90 PARŲ KARTOTINĖS DOZĖS TYRIMAS SU GRAUŽIKAIS ORALINIAM TOKSIŠKUMUI NUSTATYTI
- B.27. SUBCHRONIŠKO ORALINIO TOKSIŠKUMO BANDYMAS 90 PARŲ KARTOTINĖS DOZĖS TYRIMAS NE SU GRAUŽIKAIS ORALINIAM TOKSIŠKUMUI NUSTATYTI
- B.28. PUSIAU CHRONINIS ODOS TOKSIŠKUMO TYRIMAS 90 DIENŲ TRUNKANTIS KARTOTINĖS DOZĖS DAVIMO GRAUŽIKAMS PER ODA TYRIMAS
- B.29. PUSIAU CHRONINIS ĮKVĖPIMO TOKSIŠKUMO TYRIMAS 90 DIENŲ TRUNKANTIS KARTOTINĖS ĮKVEPIAMOS DOZĖS TYRIMAS GRAUŽIKŲ RŪŠYSE
- B.30. CHRONINIS TOKSIŠKUMO TESTAS
- B.31. TOKSIŠKO POVEIKIO PRENATALINIAM VYSTYMUISI TYRIMAS
- B.32. KARCINOGENIŠKUMO TESTAS
- B.33. KOMBINUOTAS CHRONINIO TOKSIŠKUMO/KARCINOGENIŠKUMO TESTAS
- B.34. VIENOS KARTOS DAUGINIMOSI TOKSIŠKUMO TESTAS
- B.35. TOKSIŠKO POVEIKIO DVIEJŲ KARTŲ REPRODUKCIJAI TYRIMAS
- B.36. TOKSIKOKINETIKA
- B.37. FOSFOROORGANINIŲ MEDŽIAGŲ ŪMAUS POVEIKIO SUKELTAS UŽDELSTAS NEUROTOKSIŠKUMAS
- B.38. FOSFOROORGANINIŲ MEDŽIAGŲ 28 DIENŲ PAKARTOTINOS DOZĖS SUKELTO UŽDELSTO NEUROTOKSIŠKUMO TYRIMAS
- B.39. NENUMATYTOS DNR SINTEZĖS (NDS) TYRIMAS ŽINDUOLIŲ KEPENŲ LĄSTELĖSE *IN VIVO*
- B.40. ODOS SUARDYMAS *IN VITRO*. ODOS SLUOKSNIO ELEKTRINĖS VARŽOS (OSEV) BANDYMAS)
- B.40BIS. ODOS SUARDYMAS *IN VITRO*. ŽMOGAUS ODOS MODELIO BANDYMAS

▼B

- B.41. 3T3 NRU FOTOTOKSIŠKUMO BANDYMAS *IN VITRO*
- B.42. ODOS JAUTRINIMAS. VIETINIO LIMFMAZGIO TYRIMAS
- B.43. NEUROTOKSIŠKO POVEIKIO GRAUŽIKAMS TYRIMAS
- B.44. SUGERTIS PER ODA. *IN VIVO* METODAS
- B.45. SUGERTIS PER ODA. *IN VITRO* METODAS
- B.46. *IN VITRO* ODOS DIRGINIMAS. REKONSTRUOTO ŽMOGAUS EPIDERMIO MODELIO BANDYMAS
- B.47. GALVIJŲ RAGENOS PADRUMSTĖJIMO IR PRALAUDUMO BANDYMO METODAS AKIS ĖSDINANČIOMS IR STIPRIAI DIRGINANČIOMS MEDŽIAGOMS NUSTATYTI
- B.48. IZOLIUOTOS VIŠTOS AKIES BANDYMO METODAS AKIS ĖSDINANČIOMS IR STIPRIAI DIRGINANČIOMS MEDŽIAGOMS NUSTATYTI

▼B**BENDRASIS ĮVADAS****A. TIRIAMOSIOS MEDŽIAGOS APIBŪDINIMAS**

Tiriamosios medžiagos sudėtį, taip pat ir pagrindines priemaišas, bei jos svarbiausias fizines ir chemines savybes, tarp jų pastovumą, reikėtų žinoti dar prieš bet kokio toksikologinio tyrimo planavimą.

Tiriamosios medžiagos fizinės ir cheminės savybės nulemia medžiagos patekimo kelio pasirinkimą, kai kurių tyrimo detalių planavimą, elgimąsi su medžiaga bei jos laikymą.

Tiriamosios medžiagos (jeigu įmanoma ir pagrindinių priemaišų) dozavimoje terpėje ar biologinėje medžiagoje nustatymo kokybinius ir kiekybinius analitinius metodus reikėtų parengti dar prieš tyrimą.

Visa informacija susijusi su medžiagos nustatymu, fizikinėmis ir cheminėmis jos savybėmis, grynumu, tiriamosios medžiagos elgesiu reikėtų įtraukti į tyrimo ataskaitą.

B. GYVŪNŲ PRIEŽIŪRA

Giežta aplinkos sąlygų kontrolė ir tinkama gyvūnų priežiūra yra būtini toksikologiniame tyrime.

i) Laikymo sąlygos

Eksperimentinių gyvūnų kambarių ar aptvarų aplinkos sąlygos turėtų būti tinkamos tiriamosioms rūšims. Žiurkėms, pelėms ir jūrų kiaulytėms kambario temperatūra turėtų būti $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, santykinis drėgnis nuo 30 iki 70 %; triušiams temperatūra turėtų būti $20 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, santykinis drėgnis nuo 30 iki 70 %.

Kai eksperimentinė įranga yra ypač jautri temperatūros poveikiui, tiriamajame metode reikėtų aprašyti jai tinkamas sąlygas. Visuose toksinių poveikių tyrimuose temperatūra ir drėgnis turėtų būti stebimi, registruojami ir įtraukiami į tyrimo baigiamąją ataskaitą.

Apšvietimas turi būti dirbtinis, šviesos režimas – 12 valandų šviesos/12 valandų tamsos. Apšvietimo detalės turėtų būti registruojamos ir įtraukiamos į baigiamąją tyrimo 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 poveikio bei vėlesniu stebėjimo periodu.

▼Bii) *Šėrimas*

Tyrimo metu gyvūnams duodami pašarai turi atitikti visus tos gyvūnų rūšies mitybos reikalavimus. Tais atvejais, kai tiriamoji medžiaga dedama į pašarus, jų galiojimo laikas turėtų būti sutrumpinamas dėl tiriamosios medžiagos sąveikos su pašaro sudedamosiomis dalimis. Į tokios reakcijos galimybę turėtų būti atsižvelgiama interpretuojant tyrimų rezultatus. Standartiniai laboratorinių gyvūnų pašarai turėtų būti duodami neribojant geriamo vandens kiekio. Pasiirenkant minėtą poveikio metodą, pašaro turėtų būti duodama tiek, kad tai užtikrintų reikiamą tiriamosios medžiagos gaunamą kiekį.

Maisto teršalai, kurie yra toksiški, neturėtų viršyti interferuojančių koncentracijų.

C. ALTERNATYVUS TYRIMAS

Europos Sąjunga siekia vystyti ir tvirtinti alternatyvius metodus, kurie teiktų panašią informaciją kaip ir įprasti gyvūnų tyrimai, tačiau naudotų mažiau gyvūnų, sukeltų jiems mažiau skausmo arba visiškai išvengtų jų panaudojimo.

Kai tik tokie metodai įsigalioja, juos privaloma taikyti rizikos įvertinimui, vėlesniam klasifikavimui ir kenksmingumo ženklinimui.

D. ĮVERTINIMAS IR INTERPRETACIJA

Vertinant ir interpretuojant gyvūnų ir *in vitro* tyrimų rezultatus, reikia atsižvelgti į jų tiesioginės ekstrapoliacijos žmogui ribotumą, todėl gavus įrodymą apie medžiagos neigiamą poveikį žmonėms, tai turėtų patvirtinti gyvūnų tyrimų rezultatus.

E. LITERATŪROS ŠALTINIAI

Dauguma šių metodų remiasi EBPO programos tyrimo Gairėmis ir turėtų būti atliekami pagal Geros laboratorinės praktikos principus, tam kad užtikrinti kuo didesnę duomenų pripažinimą.

Papildomą informaciją galima būtų rasti EBPO gairėse ir bet kurioje tinkamoje spausdintoje literatūroje.

▼B**B.1 BIS. ŪMUS ORALINIS TOKSIŠKUMAS. FIKSUOTŲJŲ DOZIŲ METODAS****1. METODAS**

Šis bandymų metodas atitinka OECD TG 420 (2001)

1.1 ĮVADAS

Taikant tradicinius metodus ūmaus toksiškumo poveikis 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 išvengiama gyvūnų žūties, kuri būtų poveikio įrodymas; jis pagrįstas aiškių toksiškumo požymių pasireiškimu, kai iš dozių serijos duodama viena fiksuoto dydžio dozė. Pasibaigus JK (2) ir tarptautinio (3) tinkamumo patvirtinimo tyrimui *in vivo*, 1992 m. ši procedūra buvo patvirtinta kaip bandymo metodas. Vėliau, taikant matematinius modelius, daugelyje tyrimų buvo įvertintos statistinės fiksuotų dozių metodikos savybės (4)(5)(6). Kartu daromi *in vivo* ir modeliavimo tyrimai įrodė metodikos atkuriamumą; ją taikant naudojama mažiau gyvūnų, jiems sukeliamos mažesnės kančios nei taikant tradicinius metodus ir ji leidžia suskirstyti medžiagas panašiai, kaip tai būtų padaryta taikant kitus ūmaus toksiškumo bandymo metodus.

Rekomendacijas dėl nurodytam tikslui tinkamiausio bandymų metodo pasirinkimo galima rasti Rekomendaciniame ūmaus oralinio toksiškumo bandymo dokumente (7). Be to, šiame rekomendaciniame dokumente yra papildomos informacijos apie B.1 bis bandymo metodo taikymą ir aiškinimą.

Metodo esmę sudaro tai, kad darant pagrindinį tyrimą skiriamos vidutinio toksiškumo dozės ir išvengiama dozių, kurios sukeltų žūtį. Be to, nereikia skirti dozių, kurios, kaip žinoma, sukelia didelį skausmą ir kančią dėl esdinančio arba stipriai dirginančio poveikio. Gaištantys gyvūnai arba gyvūnai, kurie akivaizdžiai patiria skausmą arba kuriems pasireiškia didelės ir ilgalaikės kančios požymiai, turi būti humaniškai nužudomi ir aiškinant bandymo rezultatus laikomi darant bandymą žuvusiais gyvūnais. Sprendimo nužudyti 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 sudertą sistemą (*Globally Harmonised System* (GHS)), skirtą ūmų toksiškumą sukeliančioms cheminėms medžiagoms klasifikuoti (9).

Prieš tyrimo pradžią bandymų laboratorija išnagrinėja visą turimą informaciją apie bandomąją medžiagą. Tokią informaciją sudarytų medžiagos identiškumas ir cheminė struktūra, jos fizikocheminės 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 norint įtikinti visus, kurie priima sprendimus dėl bandymo reikalingumo žmonių sveikatai apsaugoti, ir padėti pasirinkti tinkamą pradinę dozę.

▼B

1.2 SĄVOKOS

Ūmus oralinis toksiškumas – taikomas tam neigiamam poveikiui, kuris atsiranda davus per burną vieną medžiagos dozę arba kelias dozes per 24 h.

Uždelsta mirtis – kai gyvūnas nežūsta arba nepanašus į gaištantį per 48 h, bet žūsta vėliau per 14 parų stebėjimo laikotarpį.

Dozė – skirtas bandomosios medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama bandomosios medžiagos mase bandymo gyvūno masės vienetui (pvz., mg/kg).

Akivaizdus toksiškumas – bendrasis terminas, aprašantis aiškius toksiškumo požymius, atsiradusius davus bandomosios medžiagos (pavyzdžiai pateikti (3), kai davus kitą didžiausią fiksuotą dozę, galima laukti, kad didelio skausmo ir ilgalaikių didelių kančių požymiai, gaišimo būsenos požymiai (kriterijai pateikti rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (8) pasireikš arba galima žūtis ištiks didesnę dalį gyvūnų.

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 (fizikocheminės savybės) ir Tarptautinės darbo organizacijos (ILO) (pavojų pranešimas) bendroji veikla, koordinuojama Tarporganizacinės cheminių medžiagų tinkamos vadybos programos (*Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals* (IOMC)).

Neišvengiama žūtis – kai gaišimo būsenos arba žūties reikia laukti anksčiau negu nustatytas kito planinio stebėjimo momentas. Šios graužikų būsenos požymiai galėtų būti traukuliai, gulėjimas ant šono, gulėjimas horizontaliai ir drebulys. (Daugiau detalių pateikta rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (8)).

LD₅₀ (medianinė mirtina dozė) – statistškai apskaičiuojama viena medžiagos dozė, nuo kurios yra tikimybė žūti 50 % gyvūnų, gavusių dozę per burną. LD₅₀ vertė yra išreiškiama bandomosios medžiagos mase bandymo gyvūno masės vienetui (mg/kg).

Ribinė dozė – dozė, atitinkanti viršutinę bandymo dozės ribą (2 000 arba 5 000 mg/kg).

Gaišimo būseną – būseną prieš žūtį arba kai neišgyvena net gydomas gyvūnas. (Daugiau informacijos pateikta rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (8)).

Numatoma žūtis – klinikinių požymių, rodančių žūtį tam tikru momentu ateityje prieš eksperimento pabaigą, pvz., nesugebėjimas pasiekti vandenį arba pašarą, buvimas. (Daugiau informacijos pateikta rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (8)).

▼ B**1.3 BANDYMO METODO ESMĖ**

Vienos lyties gyvūnų grupėms nuosekliai duodamos fiksuotos 5, 50, 300 ir 2 000 mg/kg dozės (išimtiniais atvejais galima spręsti apie papildomos fiksuotos 5 000 mg/kg dozės davimą, žr. 1.6.2 skirsnį). Pradinė dozė pasirenkama atsižvelgiant į orientacinį tyrimą, kaip dozė, kuri galėtų sukelti kai kuriuos toksiškumo požymius, bet kuri nebūtų sunkaus toksiško 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, tol identifikuojama dozė, sukelianti akivaizdų toksiškumą arba ne daugiau kaip vieno gyvūno žūtį, arba kai nėra jokio poveikio esant didžiausiai dozei ar kai gyvūnai žūsta esant mažiausiai dozei.

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). Pasirinkimą lėmė tipinių LD50 bandymų informacinės apžvalgos, kurios parodė, kad jautrumo skirtumai tarp lyčių yra maži, bet tais atvejais, kai jie pastebimi, patelės dažniausiai yra šiek tiek jautresnės (10). Tačiau, jei giminingos struktūros cheminių junginių toksikologinės arba toksikokinetinės savybės rodo, kad patinai gali būti jautresni, turėtų būti naudojama ši lytis. Kai bandymai daromi su patiniais, pateikiami atitinkami tai patvirtinantys duomenys.

Bandomi sveiki, jauni, bet suaugę plačiai naudojamų laboratorinių rūšių gyvūnai. Patelės turi būti dar be vados ir neapvaisintos. Kiekvieno gyvūno amžius prieš duodant dozę turi būti nuo 8 iki 12 savaičių, o masė $\pm 20\%$ 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 užtikrinti 50–60 %. Apšvietimas turi būti dirbtinis, esant 12 h šviesos ir 12 h tamsos sekai. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, neribojant geriamojo vandens kiekio. Gyvūnai gali būti laikomi narveliuose pagal dozes, tačiau gyvūnų skaičius narvelyje neturi trukdyti aiškiai matyti 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 laboratorinių sąlygų.

▼B**1.4.4 Dozių ruošimas**

Apskritai visų dydžių bandomosios medžiagos dozės skiriamos kaip pastovaus tūrio dozės, keičiant ruošiamos dozės koncentraciją. 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. Grauzikams šis tūris paprastai neturi būti didesnis kaip 1 ml/100 g kūno masės, tačiau vandeninių tirpalų atveju galima naudoti 2 ml/100 g kūno masės. Kalbant apie dozuojamo preparato sudėtį, rekomenduojama naudoti, jei įmanoma, vandeninį tirpalą (suspensiją, emulsiją), toliau pirmenybė teikiama tirpalui (emulsijai, suspensijai) aliejuje (pvz., kukurūzų aliejuje) ir tik tuomet naudojami tirpalai kituose nešikliuose. 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 priimtiniu.

1.5 DARBO EIGA**1.5.1 Dozių davimas**

Bandomoji medžiaga duodama kaip viena dozė per skrandžio zondą arba tinkamą intubacinį vamzdelį. Esant neįprastoms aplinkybėms, kai neįmanoma duoti vienos dozės, ji gali būti duodama mažesnėmis dalimis ne ilgiau kaip per 24 h.

Prieš duodant dozę gyvūnui nešeriami (pvz., žiurkės negauna pašaro, išskyrus vandenį, per naktį; pelės gauna vandens, bet negauna pašaro 3–4 h). Pasibaigus badavimo laikotarpiui, gyvūnui 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 Orientacinis tyrimas

Orientacinio tyrimo tikslas – leisti pasirinkti atitinkamą pradinę pagrindinio tyrimo dozę. Bandomoji medžiaga nuosekliai duodama atskiriems gyvūnams pagal 1 priedo diagramą. Orientacinis tyrimas baigiamas, kai galima priimti sprendimą dėl pagrindinio tyrimo pradinės dozės (arba jei gyvūnai žūsta esant mažiausiai fiksuotai dozei).

Orientacinio tyrimo pradinė dozė pasirenkama iš 5, 50, 300 ir 2 000 mg/kg dozių, kaip dozė, kuri galėtų parodyti akivaizdų toksiškumą, pagrįstą, jei įmanoma, *in vivo* ir *in vitro* duomenimis apie tą pačią cheminę medžiagą ir struktūriniu požiūriu giminingas chemines medžiagas. Neturint tokios informacijos, pradinė dozė būtų 300 mg/kg.

Tarp dozių davimo kiekvienam gyvūnui turi būti mažiausiai 24 h laiko tarpas. Visi gyvūnai turėtų būti stebimi mažiausiai 14 parų.

▼B

Išimtiniais atvejais ir tik norint įvykdyti konkrečius kontrolės institucijų reikalavimus, galima spręsti, ar skirti papildomą viršutinės ribos fiksuotą 5 000 mg/kg dydžio dozę (žr. 3 priedą). Dėl priešasčių, susijusių su gyvūnų gerove, 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 arba gyvūnų sveikatos apsauga.

Tais atvejais, kai darant orientacinį tyrimą žūsta gyvūnas, gavęs mažiausią fiksuotą dozę (5 mg/kg), taikant įprastą procedūrą tyrimą reikia nutraukti ir medžiagą priskirti GHS 1 kategorijai (kaip nurodyta 1 priede). Tačiau jei reikalingas tolesnis klasifikavimo patvirtinimas, gali būti atliekama ši neprivaloma papildoma procedūra. 5 mg/kg dozė duodama antram gyvūnui. Jei šis antras gyvūnas žūsta, GHS 1 kategorija patvirtinama ir tyrimas 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 priedo 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 priede pateiktas klasifikavimo metodas pagal ES sistemą, laukiant naujos GHS įgyvendinimo.

1.5.3 Pagrindinis tyrimas

1.5.3.1 *Gyvūnų skaičius ir dozių dydis*

Veiksmai, kurių turi būti imamasi po bandymo su pradine doze, nurodyti 2 priede 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 tyrimą nebus kartojama dozė, sukėlus žūtį darant orientacinį tyrimą (žr. 2 priedą). Patyrimas rodo, kad labiausiai tikėtinas pradinės dozės davimo rezultatas pasireišk tuo, kad medžiaga galės būti klasifikuota ir tolesnis bandymas nebus būtinas.

Kiekvienai tiriamai dozei paprastai bus naudojama iš viso po penkis vienos lyties gyvūnus. Penkis gyvūnus sudarys vienas gyvūnas iš orientacinio tyrimo, gavusio pasirinktą dozę, ir keturi papildomi gyvūnai (išskyrus neįprastus atvejus, kai pagrindinio tyrimo dozė nebuvo įtraukta į orientacinį tyrimą).

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 toksiškumui stebėti. Laiko tarpas prireikus gali būti reguliuojamas, pvz., reakcijos be traukulių atveju.

▼B

Kai sprendžiama, ar skirti didžiausią fiksuotą 5 000 mg/kg dozę, reikėtų laikytis 3 priede aprašytos metodikos (dar žr. 1.6.2 skirsnį).

1.5.3.2 *Ribinis bandymas*

Ribinis bandymas visų pirma daromas 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 toksikologinį reikšmingumą turinčių komponentų tapatumą ir procentinę dalį. Tais atvejais, kai informacijos apie medžiagos toksiškumą yra mažai arba jos išvis nėra arba kai pagal tą informaciją bandomoji medžiaga gali būti toksiška, turi būti daromas pagrindinis bandymas.

Taikant įprastą procedūrą, šioje rekomendacijoje ribiniu bandymu būtų orientacinis tyrimas esant 2 000 mg/kg (arba išimtiniais atvejais 5 000 mg/kg), po kurio keturiems papildomiems gyvūnams būtų skirta tokio pat dydžio dozė.

1.6 STEBĖJIMAI

Gavę dozę gyvūnai atskirai mažiausiai vieną kartą per pirmąsias 30 min. ir periodiškai per pirmąsias 24 h, ypač per pirmąsias 4 h, ir toliau kasdien stebimi visas 14 parų, išskyrus kai gyvūnams reikia nutraukti tyrimą ir humaniškai nužudyti dėl gyvūnų gerovės priežasčių arba kai jie nugaišta. Tačiau stebėjimo trukmė neturi būti griežtai fiksuojama. Ji nustatoma pagal toksiškumo reakcijas, sveikimo laikotarpio pradžią ir trukmę, taigi prireikus ji gali būti pratęsta. Svarbus yra toksiškumo požymių atsiradimo ir išnykimo momentas, ypač jei jie vėluoja atsirasti (11). Visi stebėjimai yra sistemingai užrašomi atskirai apie kiekvieną gyvūną.

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, somatomotorinės veiklos 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 nužudyti. Kai gyvūnai nužudomi dėl humaniškų priežasčių arba randami negyvi, žūties laikas užrašomas kiek įmanoma tiksliau.

1.6.1 **Kūno masė**

Atskira gyvūnų masė nustatoma prieš pat bandomosios medžiagos davimą ir vėliau – mažiausiai kas savaitę. Turi būti apskaičiuotas ir užrašytas masės pokytis. Pasibaigus bandymui, išlikę gyvūnai sveriami ir humaniškai nužudomi.

▼B**1.6.2 Patologija**

Visiems bandymo gyvūnams (įskaitant nugaišusius darant bandymą arba pašalintus iš tyrimo dėl gyvūnų gerovės priežasčių) daromas bendrasis skrodimas. 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 atskirų gyvūnų duomenys. Be to, visi duomenys suvedami į lenteles, kuriose kiekvienai bandymo grupei nurodomas naudotų gyvūnų skaičius, toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičius, darant bandymą žuvusių arba dėl humaniško priežasčių nužudytų gyvūnų skaičius, atskirų gyvūnų žūties laikas, toksiško poveikio aprašymas, to poveikio kitimas laike ir grįžtamumas, skrodimo duomenys.

3. ATASKAITOS RENGIMAS**3.1 BANDYMŲ ATASKAITA**

Bandymų ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija, jei tinka:

Bandomoji medžiaga:

- fizinė būsena, grynumas ir, jei tinka, fizikocheminės savybės (įskaitant izomerizavimą),
- identifikavimo duomenys, įskaitant CAS numerį.

Nešiklis (jei tinka):

- nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei tai ne vanduo.

Bandymo gyvūnai:

- naudota rūšis ir veislė,
- mikrobiologinė gyvūno būsena, jei žinoma,
- gyvūnų skaičius, amžius ir lytis (įskaitant, jei tinka, patinų vietoj patelių naudojimo pagrindimą),
- šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.

Bandymo sąlygos:

- išsami informacija apie bandomosios medžiagos preparatą, įskaitant duodamos medžiagos fizikinį pavidalą,
- išsami informacija apie bandomosios medžiagos davimą, įskaitant dozavimo tūrį ir davimo laiką,
- išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę (įskaitant pašaro tipą (šaltinį), vandens šaltinį),
- pradinės dozės pasirinkimo pagrindimas.

▼B

Rezultatai:

- kiekvieno gyvūno reakcijos duomenų ir dozės dydžio lentelės (t. y. gyvūnų, kuriems pasireiškia toksiškumo požymiai, įskaitant gaištamumą, poveikio tipą, sunkumą ir trukmę),
- kūno masės ir jos kitimo lentelės,
- atskirų gyvūnų masė dozės davimo dieną, vėliau kas savaitę ir žūties arba nužudymo dieną,
- žūties data ir laikas, jei tai įvyksta prieš planinį nužudymą,
- toksiškumo požymių kiekvienam gyvūnui atsiradimas ir vystymasis, jų galimas grįžtamumas,
- kiekvieno gyvūno skrodimo ir histopatologiniai duomenys, jei yra.

Rezultatų aptarimas ir aiškinimas.

Išvados.

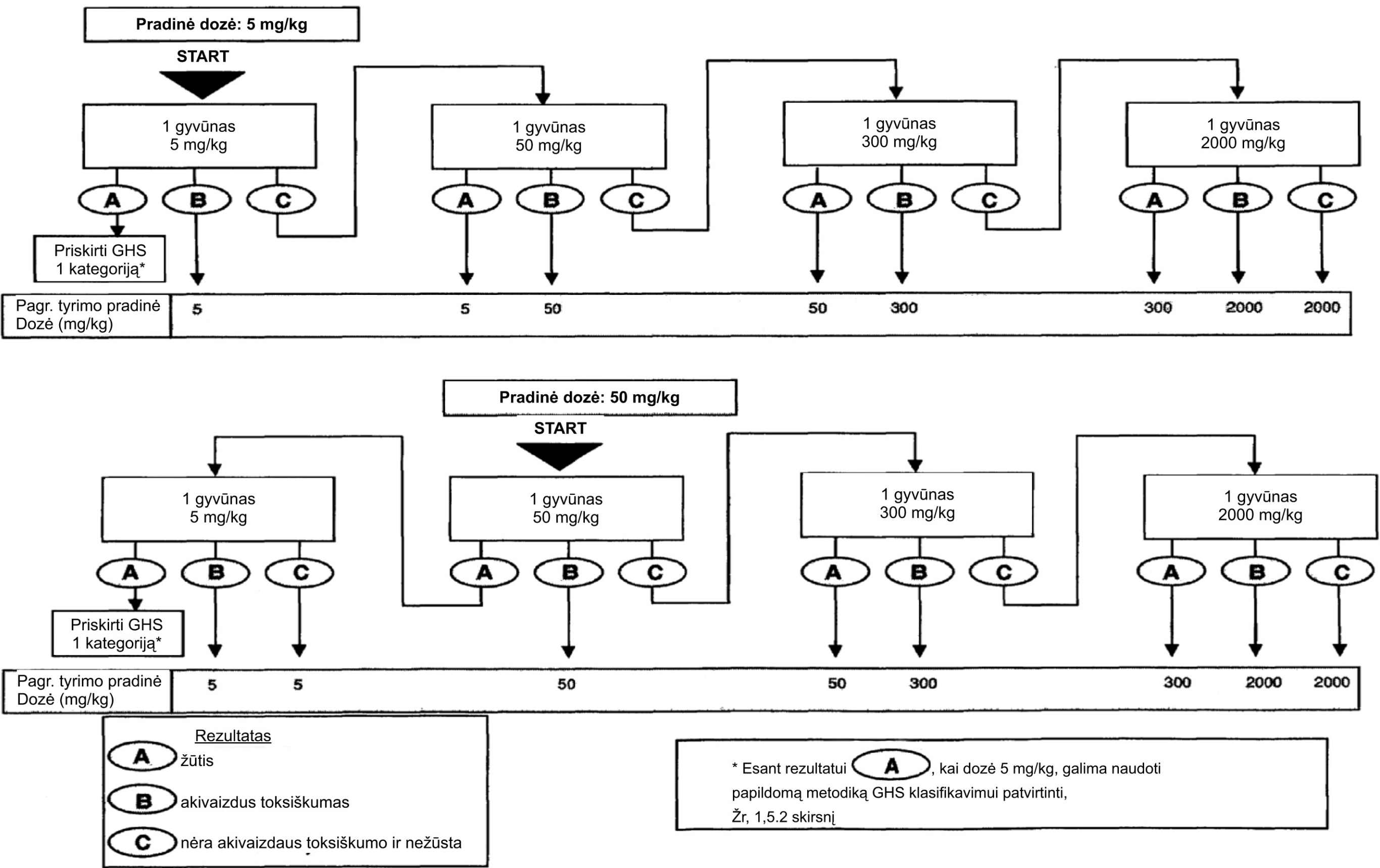
4. **NUORODOS**

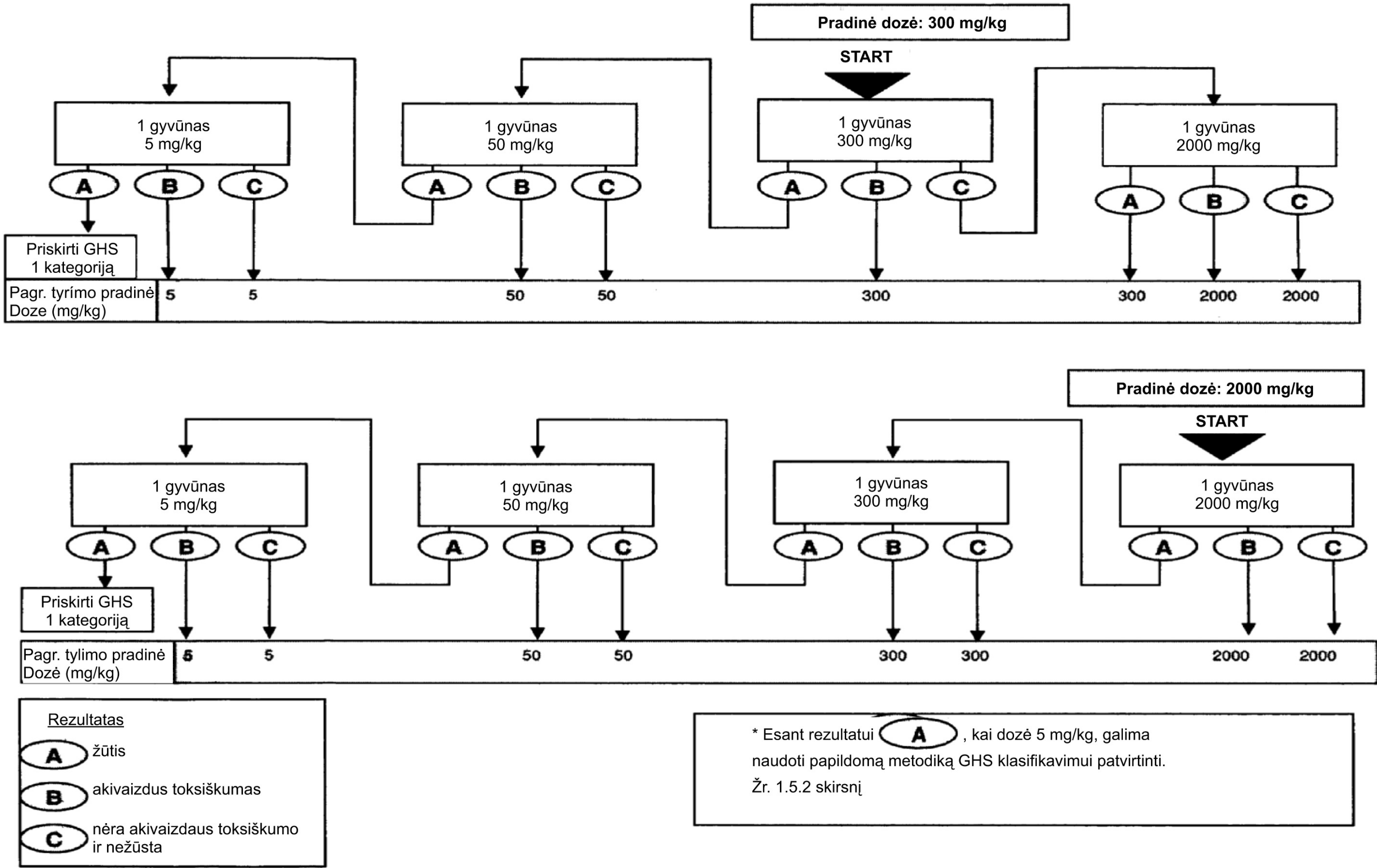
- 1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 3, p. 85–92.
- 2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O., (1987) Evaluation of the 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 LD₅₀ 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 Assessment No 19.

▼B

- 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 LD₅₀, 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.

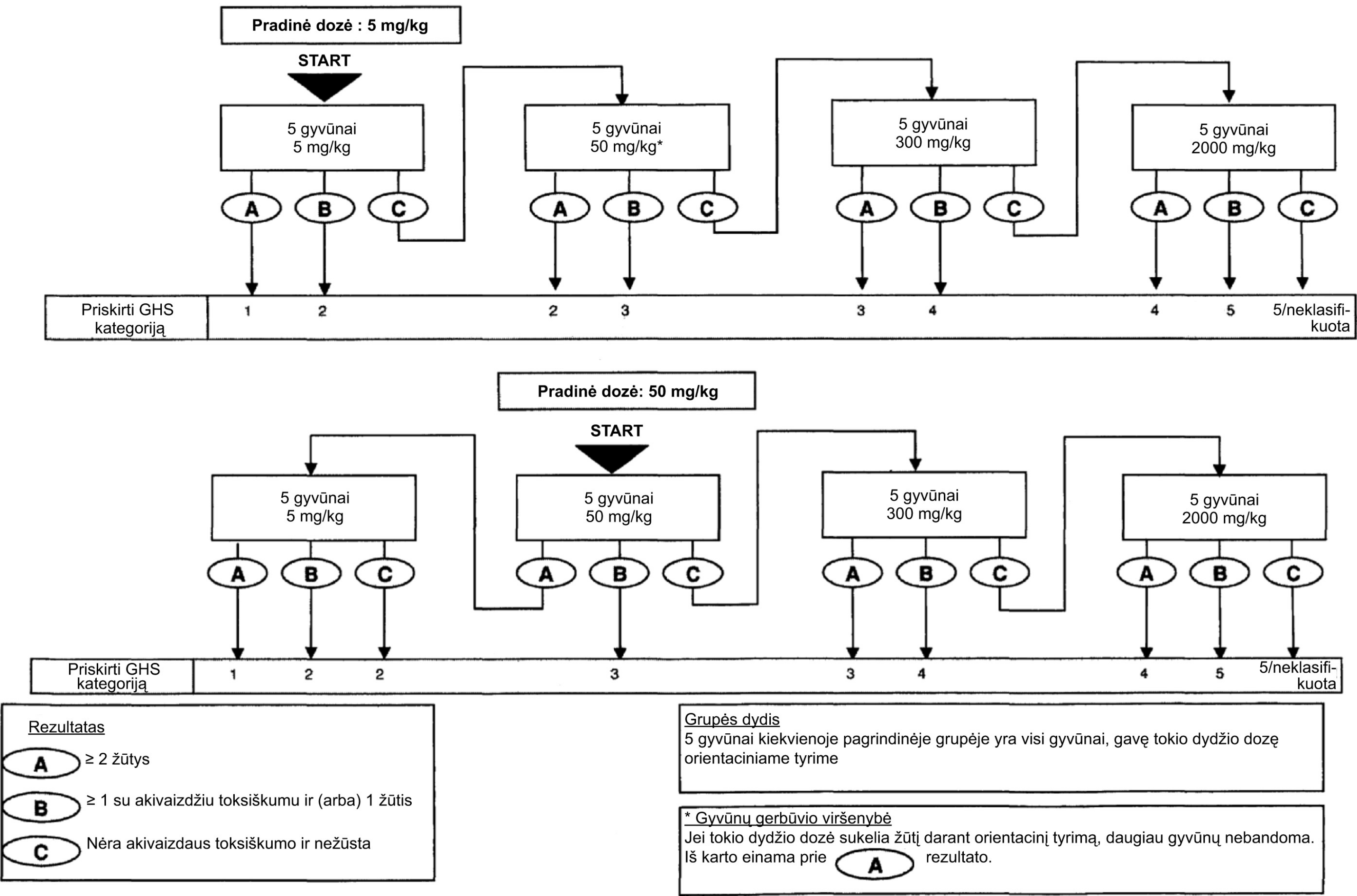
ORIENTACINIO TYRIMO SCHEMA

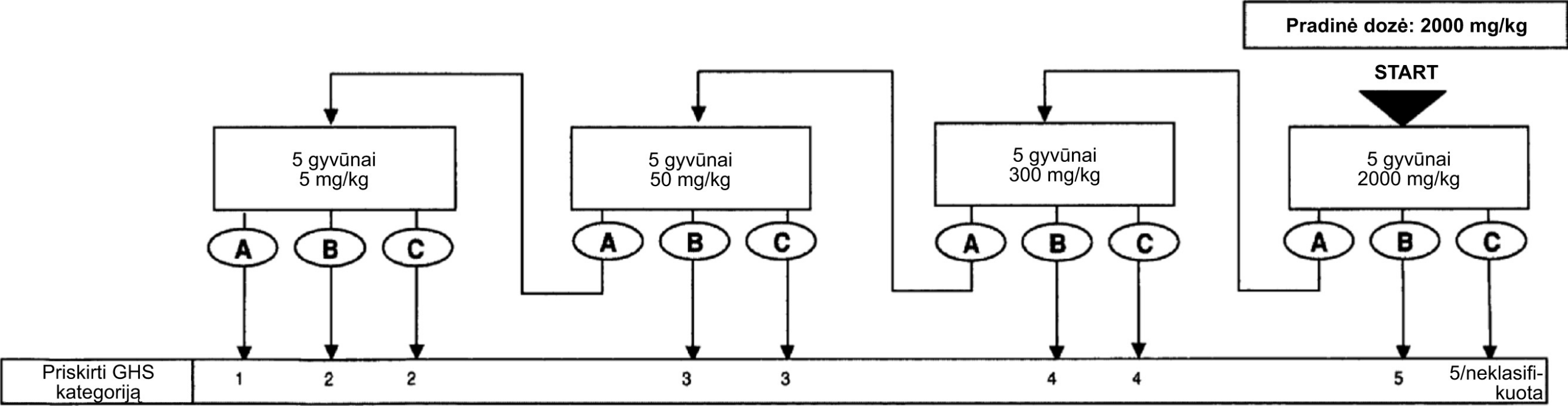
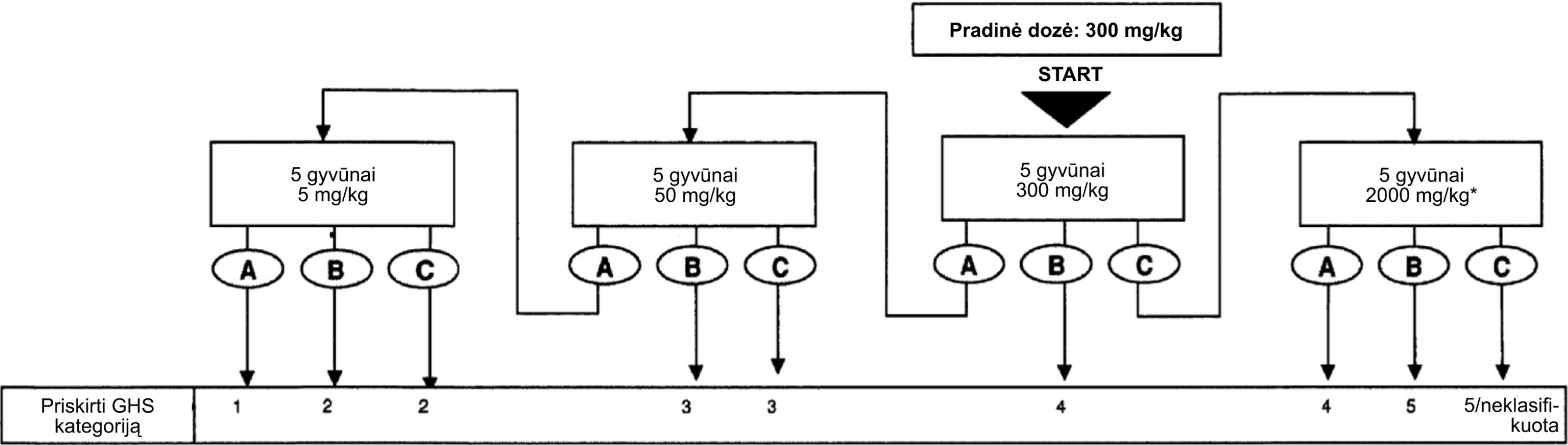




2 PRIEDAS

PAGRINDINIO TYRIMO SCHEMA





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 tyrime	

* Gyvūnų gerbūvio viršenybė	
Jei tokio dydžio dozė sukelia žūtį darant orientacinį tyrimą, daugiau gyvūnų nebandoma. Iš karto einama prie A rezultato.	

▼B*3 PRIEDAS***BANDOMŲJŲ MEDŽIAGŲ, KURIŲ TIKĖTINOS LD₅₀ VERTĖS YRA DIDESNĖS NEGU 2 000 MG/KG, KLASIFIKAVIMO KRITERIJAI NEDARANT BANDYMO**

Pavojaus 5 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 LD₅₀ per burną 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 $2\,000\text{ mg/kg} < LD_{50} < 5\,000\text{ mg/kg}$ (5 kategorija pagal GHS), šiais atvejais:

- a) jei būtų priskirtos šiai kategorijai pagal kurią nors iš 2 priedo bandymo schemų, pagrįstų gaištamumo dažnumu;
- b) Jei jau yra patikimų duomenų, rodančių, kad LD₅₀ yra 5 kategorijos verčių intervale, arba kiti tyrimai su gyvūnais arba toksiškas 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 toksišką poveikį žmonėms, arba
 - pastebimas tam tikras gaištamumas, kai bandymas atliekamas duodant per burną dozes, siekiančias 4 kategorijos vertes, arba
 - jei tęsiant bandymus iki 4 kategorijos verčių ekspertų sprendimu patvirtinami reikšmingi klinikiniai toksiškumo požymiai, išskyrus viduriavimą, pasiūšiusius plaukus arba nesveiko gyvūno išvaizdą, arba
 - jei ekspertų sprendimu patvirtinama patikima informacija, rodanti galimą reikšmingą ūmų poveikį darant kitus tyrimus 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 sprendžiamą kai yra didelė tikimybė, kad jo rezultatai yra tiesiogiai sietini su žmonių arba gyvūnų sveikatos apsauga (9).

Orientacinis tyrimas

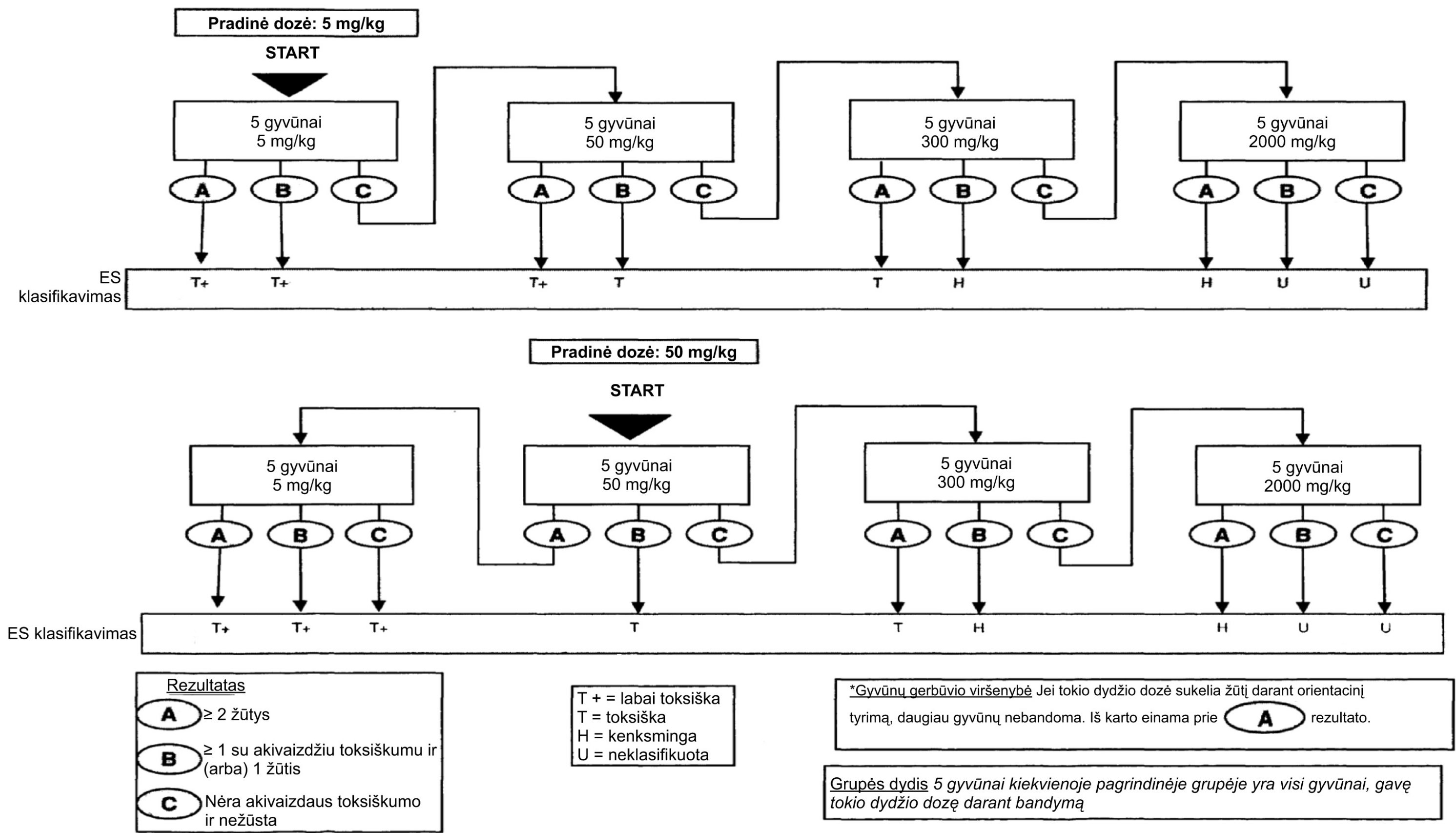
Sprendimo priėmimo taisyklės, taikomos 1 priede pateiktai nuosekliai procedūrai, išplečiamos, kad būtų galima įtraukti 5 000 mg/kg dozę. Taigi kai skiriama orientacinio tyrimo pradinė 5 000 mg/kg dozė, gavus A rezultatą (žūtis) reikės daryti bandymą su antru gyvūnu, skiriant 2 000 mg/kg; gavus B ir C rezultatus (akivaizdus toksiškumas arba joks toksiškumas) pradinė pagrindinio tyrimo 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 gaunami B arba C rezultatai; gavus A rezultatą, esant 5 000 mg/kg, pagrindinio tyrimo pradinė dozė yra 2 000 mg/kg, o gavus B ir C rezultatus, pagrindinio tyrimo pradinė dozė yra 5 000 mg/kg.

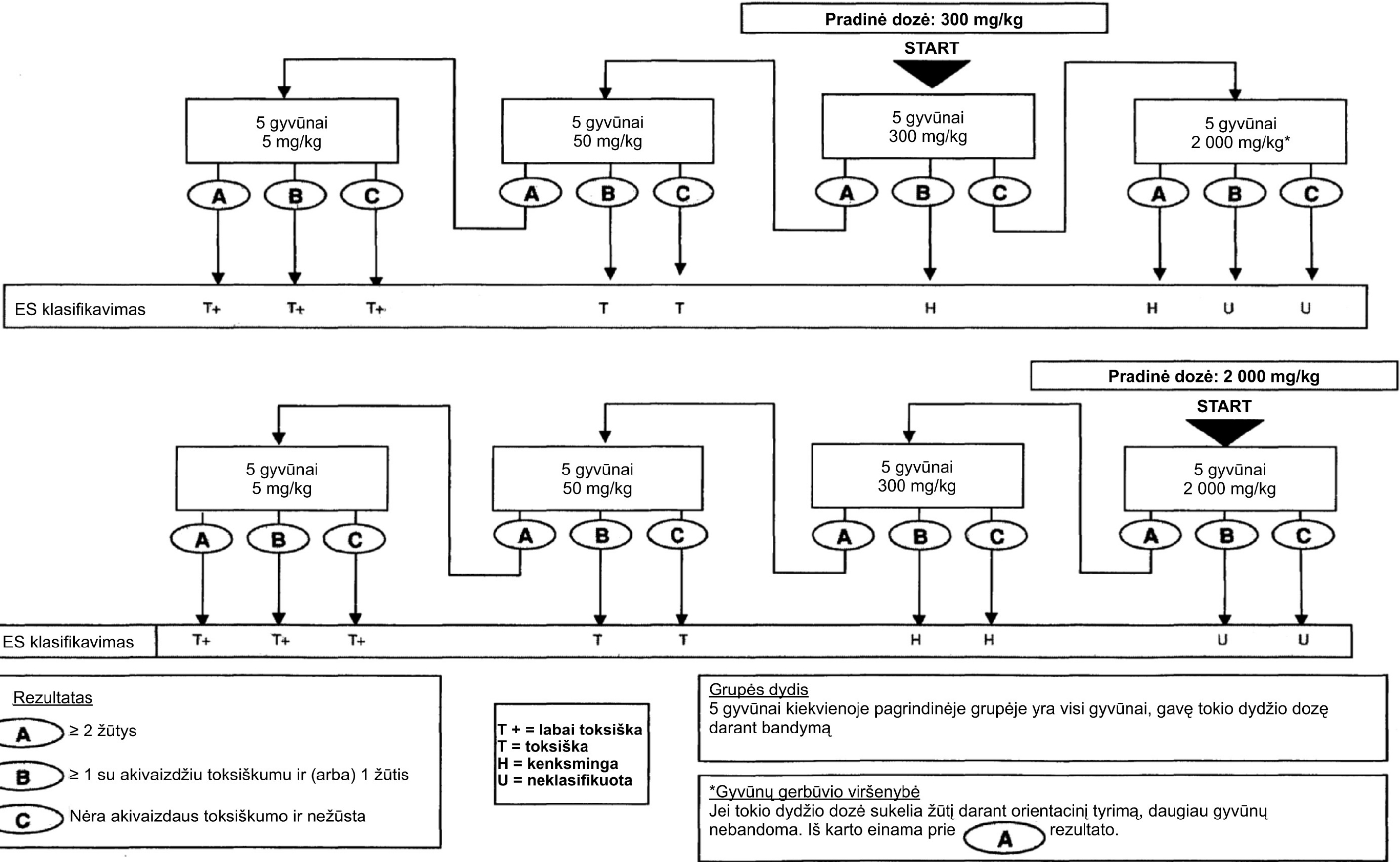
▼B**Pagrindinis tyrimas**

Sprendimo priėmimo taisyklės, taikomos 2 priede pateiktai nuosekliai procedūrai, išplečiamos, kad būtų galima įtraukti 5 000 mg/kg dozę. Taigi kai skiriama pagrindinio tyrimo pradinė 5 000 mg/kg dozė, gavus A rezultatą (≥ 2 žūtys) reikės daryti 2 grupės bandymą, 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; gavus A rezultatą esant 5 000 mg/kg, medžiaga priskiriama GHS 5 kategorijai, o gavus B arba C rezultatus, medžiaga pagal GHS neklasifikuojama.

BANDYMŲ METODAS B.1 bis.

Klasifikavimo pagal ES schemą rekomendacijos, taikomos pareinamajam laikotarpiui iki visiškai visuotinai suderintos klasifikavimo sistemos (GHS) įgyvendinimo (paimta iš (8) nuorodos)





▼B**B.1 TRIS. ŪMUS ORALINIS TOKSIŠKUMAS. ŪMAUS TOKSIŠKUMO KLASĖS METODAS****1. METODAS**

Šis bandymų 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 toksiškumą. Ši metodika yra atkuriamą, 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 klasifikuoti ir įvertinti jos pavojų. 1996 m. priimto metodo tinkamumas buvo plačiai patvirtintas nacionaliniu (6) ir tarptautiniu mastu (7) darant *in vivo* bandymus ir lyginant su literatūroje pateiktais LD₅₀ duomenimis.

Rekomendacijas dėl nurodytam tikslui tinkamiausio bandymų metodo pasirinkimo galima rasti Rekomendaciniame ūmaus oralinio toksiškumo bandymo dokumente (8). Be to, šiame Rekomendaciniame dokumente yra papildomos informacijos apie B.1 tris bandymo metodo taikymą ir aiškinimą.

Nereikia duoti dozių, kurios, kaip žinoma, sukelia didelį skausmą ir kančią dėl esdinančio arba stipriai dirginančio poveikio. Gaištantys gyvūnai arba gyvūnai, kurie akivaizdžiai patiria skausmą arba kuriems pasireiškia didelės ir ilgalaikės kančios požymiai, turi būti humaniškai nužudomi ir aiškinant bandymo rezultatus laikomi darant bandymą žuvusiais gyvūnais. Sprendimo nužudyti 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 klasifikuoti pagal visuotinai suderintą sistemą (*Globally Harmonised System* (GHS)), skirtą ūmų toksiškumą sukeliančioms cheminėms medžiagoms klasifikuoti (10).

Iš esmės šis metodas nėra skirtas tikslioms LD₅₀ 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 LD₅₀ vertę tik tais atvejais, kai mažiausiai dviejų dozių sukeliamas gaištamumas yra didesnis kaip 0 % ir mažesnis kaip 100 %. Kai skiriamos iš anksto pasirinktos dozės neatsižvelgiant į bandomąją medžiagą, o klasifikavimas tiesiogiai siejamas su stebimų skirtingos būsenos gyvūnų skaičiumi, laboratorijoms didėja galimybė pasiekti suderinamų ir atkartojamų rezultatų.

▼ B

Prieš tyrimo pradžią bandymų laboratorija išnagrinėja visą turimą informaciją apie bandomąją medžiagą. Tokią informaciją sudarytų medžiagos identiškumas ir cheminė struktūra, jos fizikocheminės 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 norint įtikinti visus, kurie priima sprendimus dėl bandymo reikalingumo žmonių sveikatai apsaugoti, ir padėti pasirinkti tinkamą pradinę dozę.

1.2 SAVOKOS

Ūmus oralinis toksiškumas – taikomas tam neigiamam poveikiui, kuris atsiranda davus per burną vieną medžiagos dozę arba kelias dozes per 24 h.

Uždelsta mirtis – kai gyvūnas nežūsta arba nepanašus į gaištantį per 48 h, bet žūsta vėliau per 14 parų stebėjimo laikotarpį.

Dozė – skirtas bandomosios medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama bandomosios medžiagos mase bandymo gyvūno masės vienetui (pvz., mg/kg).

GHS – visuotinai suderinta cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo sistema (*Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures*). OECD (žmonių sveikata ir aplinka), JT pavojingų prekių pervežimo ekspertų komiteto (fizikocheminės savybės) ir ILO (pavojų pranešimas) bendroji veikla, koordinuojama Tarporganizacinės cheminių medžiagų tinkamos vadybos programos (*Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals* (IOMC)).

Neišvengiama žūtis – kai gaišimo būsenos arba žūties reikia laukti anksčiau negu nustatytas kito planinio stebėjimo momentas. Šios graužikų būsenos požymiai galėtų būti traukuliai, gulėjimas ant šono, gulėjimas horizontaliai ir drebulys. (Daugiau informacijos pateikta rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (9)).

LD₅₀ (medianinė mirtina dozė) – tai statistiškai apskaičiuojama viena medžiagos dozė, nuo kurios yra tikimybė žūti 50 % gyvūnų, gavusių dozę per burną. LD₅₀ vertė yra išreiškiama bandomosios medžiagos mase bandymo gyvūno masės vienetui (mg/kg).

Ribinė dozė – dozė, atitinkanti viršutinę bandymo dozės ribą (2 000 arba 5 000 mg/kg).

Gaišimo būseną – būseną prieš žūtį arba kai neišgyvena net gydomas gyvūnas. (Daugiau informacijos pateikta rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (9)).

Numatoma žūtis – klinikinių požymių, rodančių žūtį tam tikru momentu ateityje prieš eksperimento pabaigą, pvz., nesugebėjimas pasiekti vandenį arba pašarą, buvimas. (Daugiau informacijos pateikta rekomendaciniame dokumente dėl poveikio žmonėms (9)).

▼B

1.3 BANDYMO METODO ESMĖ

Šio bandymo esmę sudaro nuosekli metodika, pagal kurią vienai pakopai naudojant mažiausią įmanomą gyvūnų skaičių gaunama pakankamai informacijos apie bandomosios medžiagos ūmų toksiškumą, kad būtų galima ją klasifikuoti. Grupė bandymo gyvūnų per burną gauna vieną iš nustatytų bandomosios medžiagos dozių. Medžiaga bandoma taikant nuoseklią metodiką, kiekvienai pakopai naudojami trys vienos lyties gyvūnai (paprastai patelės). Su junginiu siejamas dozę gavusių gyvūnų gaišimas arba negaišimas per vieną iš pakopų lemia kitą pakopą, t. y.:

— toliau bandyti nereikia,

— duoti tokią pat dozę dar trimis gyvūnams,

— trims papildomiems gyvūnams duoti kitą didesnę arba mažesnę dozę.

Bandymo metodika išsamiai aprašyta 1 priede. Metodas leidžia spręsti, ar bandomąją medžiagą priskirti vienai iš toksiškumo klasių, apibrėžtų fiksuotomis LD₅₀ 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). Pasirinkimą lėmė tipinių LD₅₀ bandymų informacinės apžvalgos, kurios parodė, kad jautrumo skirtumai tarp lyčių yra maži, bet tais atvejais, kai jie pastebimi, patelės dažniausiai yra šiek tiek jautresnės (11). Tačiau jei giminingos struktūros cheminių junginių toksikologinės arba toksikokinetinės savybės rodo, kad patinai gali būti jautresni, turėtų būti naudojama ši lytis. Kai bandymai daromi su patiniais, turėtų būti pateikti atitinkami tai patvirtinantys duomenys.

Bandomi sveiki, jauni, bet suaugę plačiai naudojamų laboratorinių rūšių gyvūnai. Patelės turi būti dar be vados 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

Bandymo 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 užtikrinti 50–60 %. Apšvietimas turi būti dirbtinis, esant 12 h šviesos ir 12 h tamsos sekai. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, neribojant geriamo vandens kiekio. Gyvūnai gali būti laikomi narveliuose pagal dozes, tačiau gyvūnų skaičius narvelyje neturi trukdyti aiškiai matyti kiekvieną gyvūną.

▼B**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 laboratorinių sąlygų.

1.4.4 Dozių ruošimas

Apskritai visų dydžių bandomosios medžiagos dozės duodamos kaip pastovaus tūrio dozės, keičiant ruošiamos dozės koncentraciją. 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. Grauzikams šis tūris paprastai neturėtų būti didesnis negu 1 ml/100g kūno masės, tačiau vandeninių tirpalų atveju galima naudoti 2 ml/100g kūno masės. Kalbant apie dozavimo preparato sudėtį, rekomenduojama naudoti, jei įmanoma, vandeninį tirpalą (suspensiją, emulsiją), toliau pirmenybė teikiama tirpalui (emulsijai, suspensijai) aliejuje (pvz., kukurūzų aliejuje) ir tik tuomet naudojami tirpalai kituose nešikliuose. 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 priimtiniu.

1.5 DARBO EIGA**1.5.1 Dozių davimas**

Bandomoji medžiaga duodama kaip viena dozė per skrandžio zondą arba tinkamą intubacinį vamzdelį. Esant neįprastoms aplinkybėms, kai neįmanoma duoti vieną dozę, 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 gauna vandens, bet negauna pašaro 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 imami 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 pradinę turėtų būti pasirinkta dozė, kuriai esant tikrai nugaistų kai kurie iš dozę gavusių gyvūnų. Schemose, pateiktose 1 priede, aprašyta procedūra, kurios reikėtų laikytis kiekvienai pradinei dozei. Be to, 4 priede pateiktas klasifikavimo metodas pagal ES sistemą, laukiant naujos GHS įgyvendinimo.

▼B

Kai turimoje informacijoje nurodoma, kad gyvūnai neturėtų gaišti esant didžiausiai pradinei dozei (2 000 mg/kg kūno masės), reikėtų daryti ribinį bandymą. Neturint informacijos apie bandomąją medžiagą, bet rūpinantis gyvūnų gerove, 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 norint įvykdyti konkrečius kontrolės institucijų reikalavimus, galima spręsti, ar skirti papildomą viršutinės ribos fiksuotos 5 000 mg/kg dydžio dozę (žr. 2 priedą). Dėl su gyvūnų gerove susijusių priežasčių, neskatinama daryti bandymą taikant GHS 5 kategorijos intervalus (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 daromas 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 toksikologinį reikšmingumą turinčių komponentų tapatumą ir procentinę dalį. Tais atvejais, kai informacijos apie medžiagos toksiškumą yra mažai arba jos visai nėra arba kai pagal tą informaciją bandomoji medžiaga gali būti toksiška, turi būti daromas 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 priedą). Jei pastebimas su medžiaga siejamas gaišimas, gali tekti daryti bandymą esant gretimai mažesnei dozei.

1.6 STEBĖJIMAI

Gavę dozę gyvūnai atskirai mažiausiai vieną kartą per pirmąsias 30 min. ir periodiškai per pirmąsias 24 h, ypač per pirmąsias 4 h, ir toliau kasdien stebimi visas 14 parų, išskyrus kai gyvūnams reikia nutraukti tyrimą ir humaniškai nužudyti dėl gyvūnų gerovės priežasčių arba kai jie nugaišta. Tačiau stebėjimo trukmė neturi būti griežtai fiksuojama. Ji nustatoma pagal toksiškumo reakcijas, sveikimo laikotarpio pradžią ir trukmę, taigi prireikus ji gali būti pratęsta. Svarbus yra toksiškumo požymių atsiradimo ir išnykimo momentas, ypač jei jie vėluoja atsirasti (12). Visi stebėjimai yra sistemingai užrašomi atskirai apie kiekvieną gyvūną.

▼B

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, somatomotorinės veiklos 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 nužudyti. Kai gyvūnai nužudomi dėl humaniškų priežasčių arba randami negyvi, žūties laikas užrašomas kiek įmanoma tiksliau.

1.6.1 **Kūno masė**

Atskira gyvūnų 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 nužudomi.

1.6.2 **Patologija**

Visiems bandomiesiems gyvūnams (įskaitant nugaišusius darant bandymą arba pašalintus iš tyrimo dėl gyvūnų gerovės priežasčių) daromas bendrasis skrodimas. 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 atskirų gyvūnų duomenys. Be to, visi duomenys suvedami į lenteles, kuriose kiekvienai bandymo grupei nurodomas naudotų gyvūnų skaičius, gyvūnų, kuriems pasireiškia toksiškumo požymiai, skaičius, darant bandymą žuvusių arba dėl humaniškų priežasčių nužudytų gyvūnų skaičius, atskirų gyvūnų žūties laikas, toksiškumo poveikio aprašymas, tokio poveikio kitimas laike ir grįžtamumas, skrodimo duomenys.

3. **ATASKAITOS RENGIMAS**

3.1 **BANDYMŲ ATASKAITA**

Bandymų ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija, jei tinka:

Bandomoji medžiaga:

— fizikinė būseną, grynumas ir, jei tinka, fizikocheminės savybės (įskaitant izomerizavimą),

— identifikavimo duomenys, įskaitant CAS numerį.

Nešiklis (jei tinka):

— nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei tai ne vanduo.

Bandymo gyvūnai:

— naudota rūšis ir veislė,

▼B

- mikrobiologinė gyvūno būseną, jei žinoma,
- gyvūnų skaičius, amžius ir lytis (įskaitant, jei tinka, patinų vietoj patelių naudojimo pagrindimą),
- šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.

Bandymo sąlygos:

- išsami informacija apie bandomosios medžiagos preparatą, įskaitant duodamos medžiagos fizikinį pavidalą,
- išsami informacija apie bandomosios medžiagos davimą, įskaitant dozavimo 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 gaištamumą, poveikio tipą, sunkumą ir trukmę),
- kūno masės ir jos kitimo lentelės,
- atskirų gyvūnų masė dozės davimo dieną, vėliau kas savaitę ir žūties arba nužudymo dieną,
- žūties data ir laikas, jei tai įvyksta prieš planinį nužudymą,
- toksiškumo požymių kiekvienam gyvūnui atsiradimas ir vystymasis, jų galimas grįžtamumas,
- kiekvieno gyvūno skrodimo 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 Toxizität 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/LC₅₀ 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 LD₅₀ Test. Arch. Toxicol. 66, p. 455–470.

▼B

- 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 LD₅₀, 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.

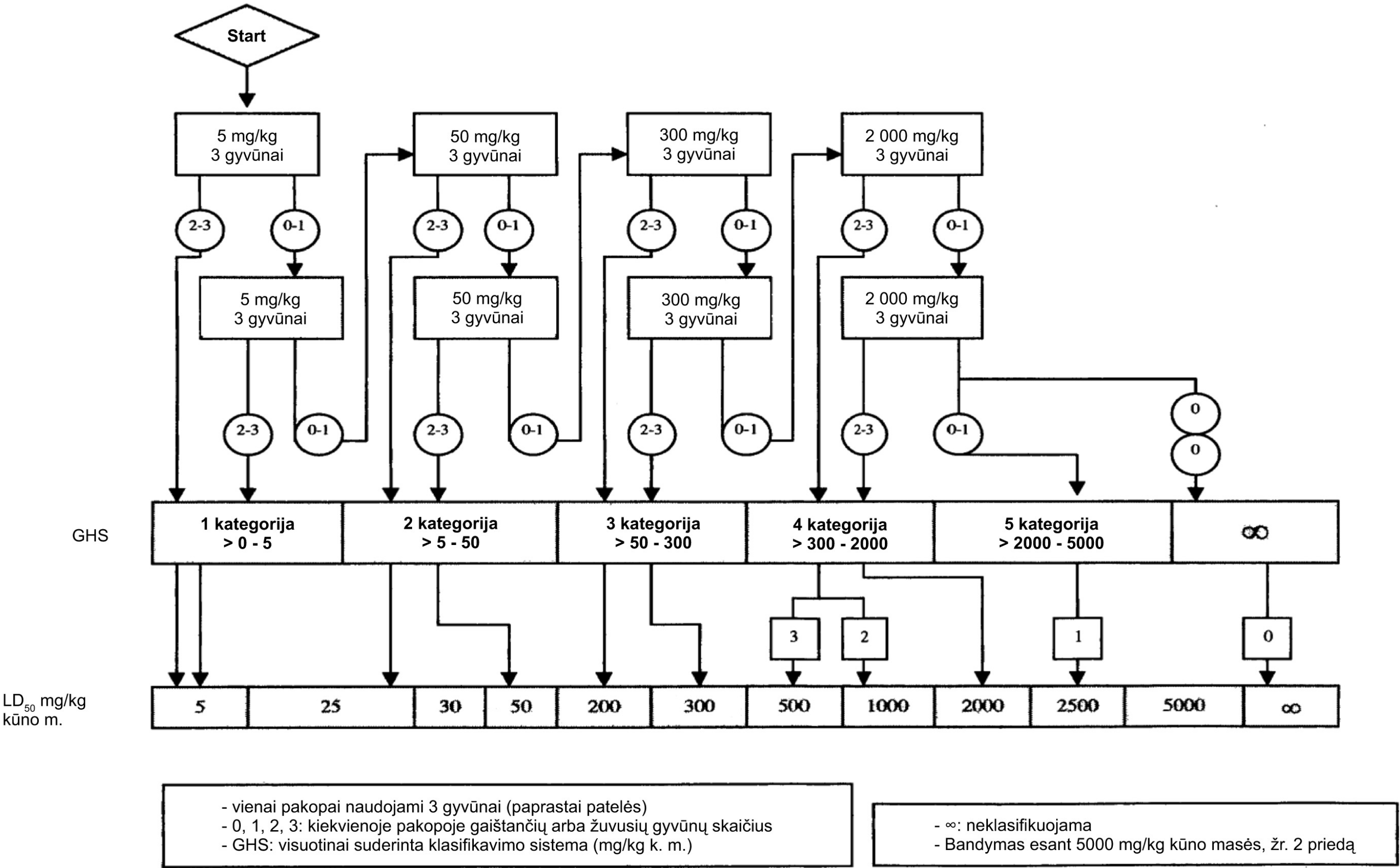
▼B*I PRIEDAS***PROCEDŪRA, TAIKOMA NAUDOJANT KIEKVIENĄ PRADINĘ DOZĘ***BENDROSIOS PASTABOS*

Į šį priedą įtrauktose atitinkamose bandymo schemose aprašoma kiekvienos pradinės dozės procedūra, kurios reikia laikytis.

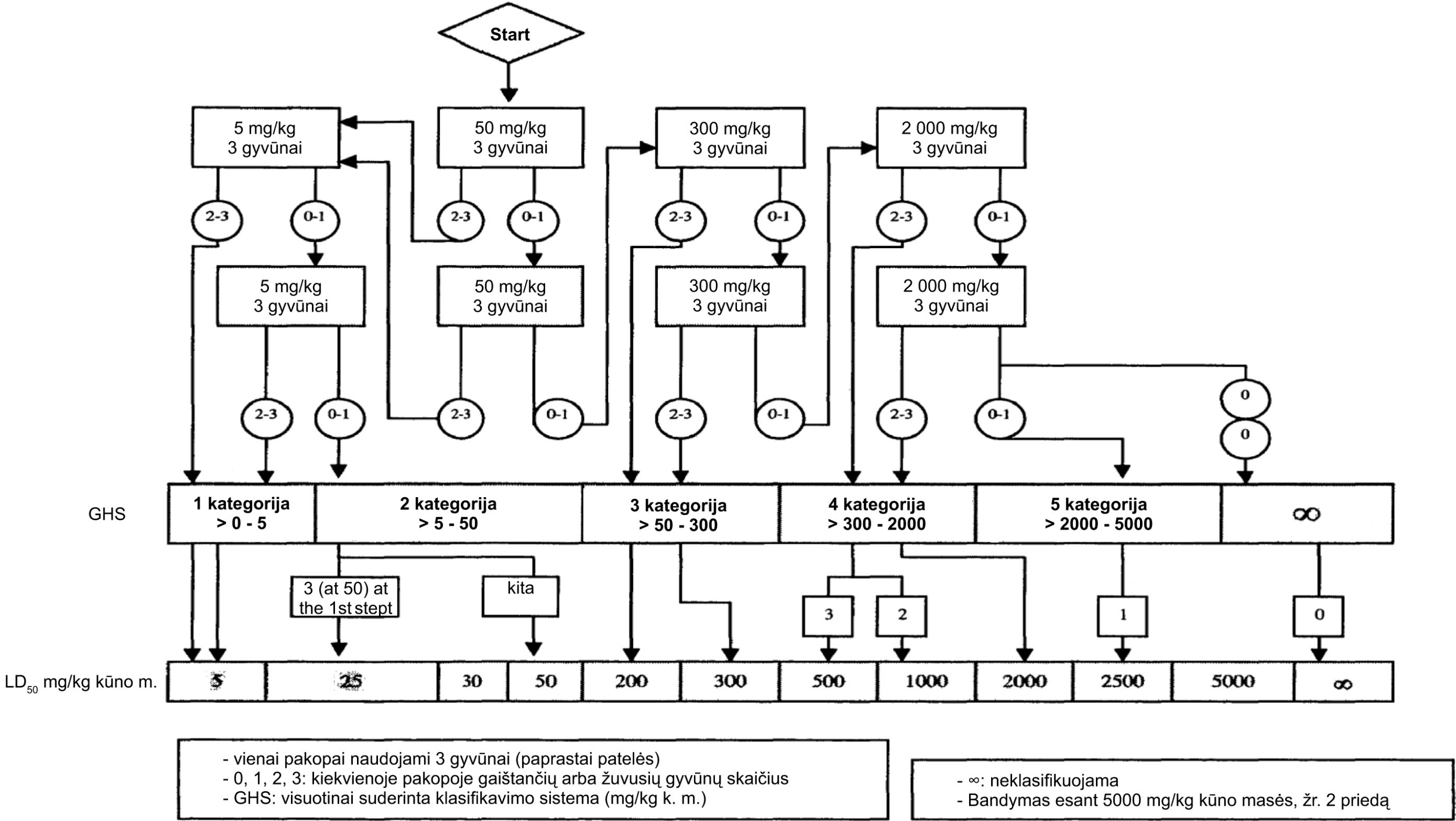
- 1 a priedas: pradinė dozė 5 mg/kg kūno masės
- 1 b priedas: pradinė dozė 50 mg/kg kūno masės
- 1 c priedas: pradinė dozė 300 mg/kg kūno masės
- 1 d priedas: pradinė dozė 2 000 mg/kg kūno masės

Atsižvelgiant į humaniškai nužudytų arba žuvusių gyvūnų skaičių, bandymo eiga žymima rodyklėmis.

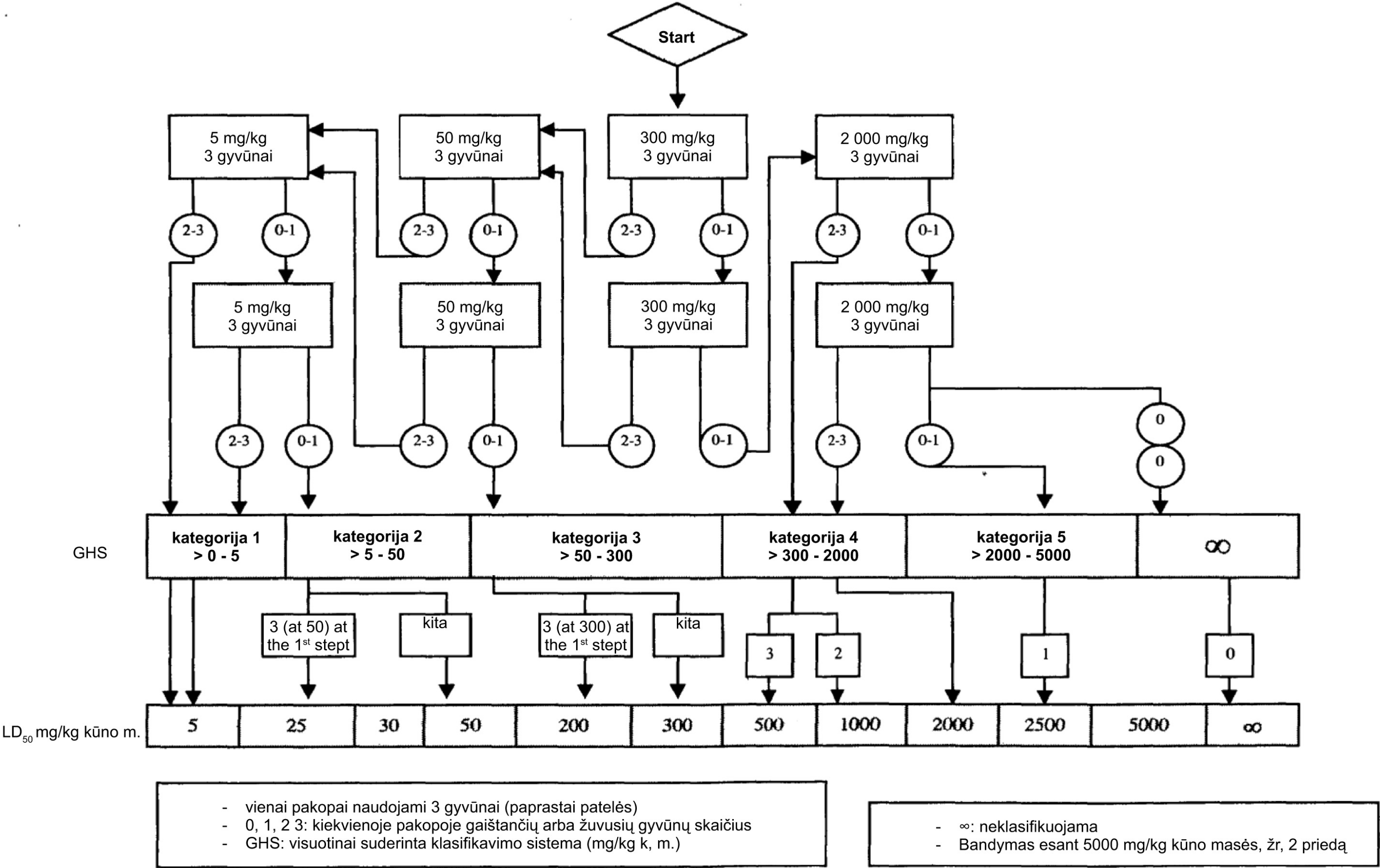
PROCEDŪRA ESANT 5 MG/KG KŪNO MASĖS PRADINEI DOZEI



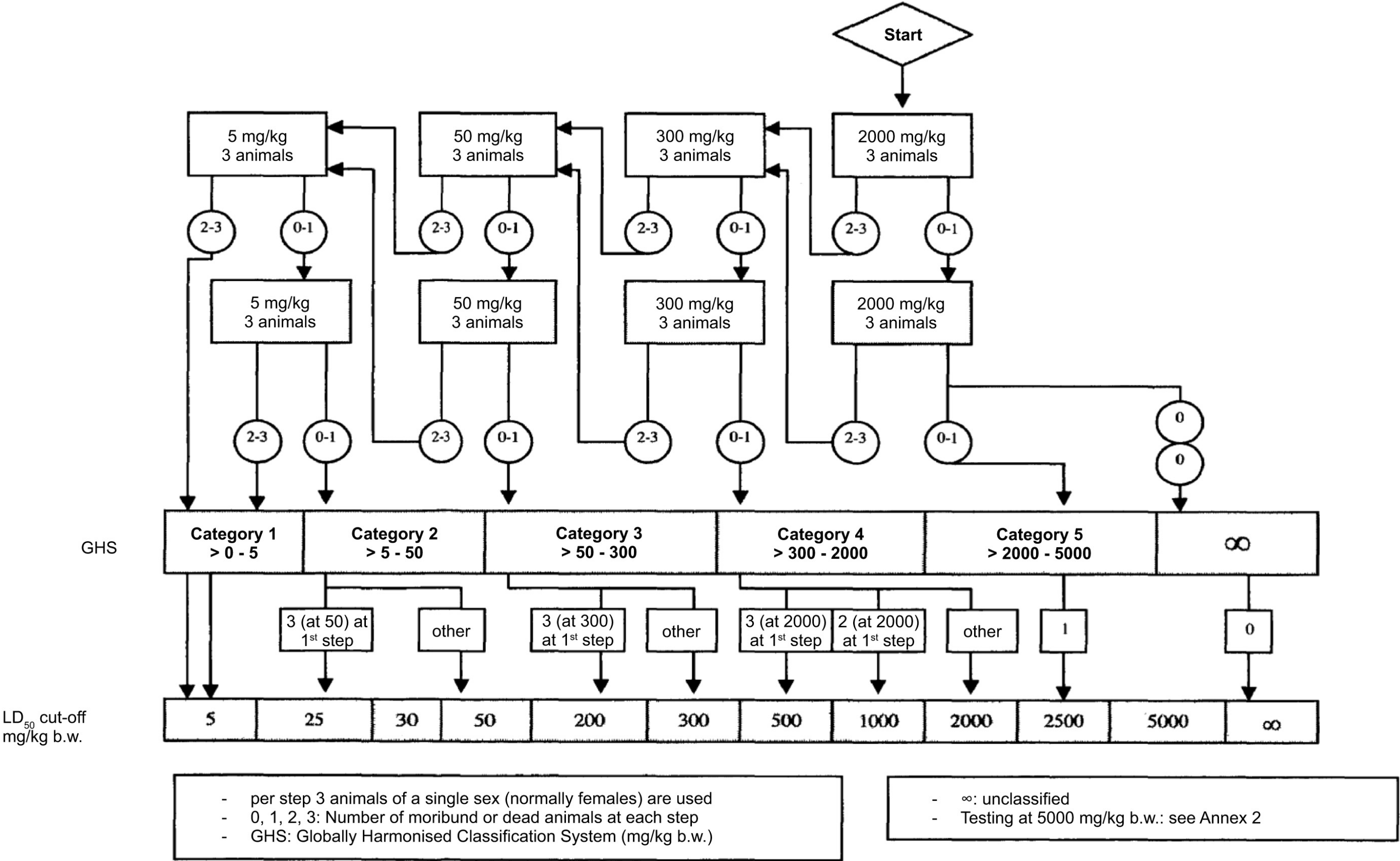
PROCEDŪRA ESANT 50 MG/KG KŪNO MASĖS PRADINEI DOZEI



PROCEDŪRA ESANT 300 MG/KG KŪNO MASĖS PRADINEI DOZEI



PROCEDŪRA ESANT 2 000 MG/KG KŪNO MASĖS PRADINEI DOZEI





2 PRIEDAS

BANDOMŲJŲ MEDŽIAGŲ, KURIŲ TIKĖTINOS LD₅₀ VERTĖS YRA DIDESNĖS NEGU 2 000 MG/KG, KLASIFIKAVIMO KRITERIJAI NEDARANT BANDYMO

Pavojaus 5 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 LD₅₀ per burną 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 $2\,000\text{ mg/kg} < \text{LD}_{50} < 5\,000\text{ mg/kg}$ (5 kategorija pagal GHS), šiais atvejais:

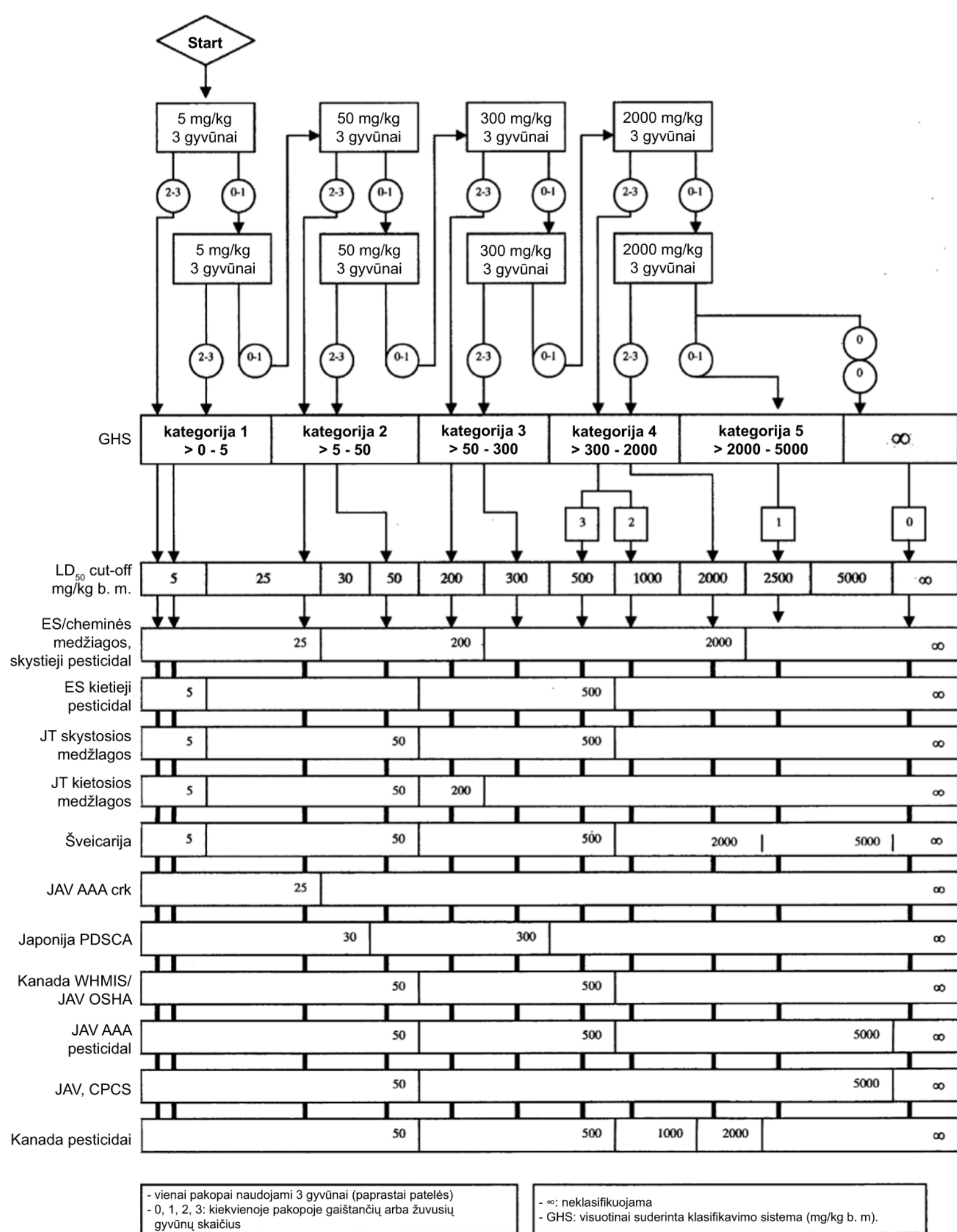
- a) jei būtų priskirtos šiai kategorijai pagal kurią nors iš 2 priedo bandymo schemų, pagrįstų gaištamumo dažnumu;
- b) jei jau yra patikimų duomenų, rodančių, kad LD₅₀ yra 5 kategorijos verčių intervale, arba kiti tyrimai su gyvūnais arba toksiškas poveikis žmonėms rodo ūmaus tipo poveikį žmonių sveikatai;
- c) gaunant duomenis ekstrapoliavimo, įvertinimo arba matavimo būdu, jei priskyrimas didesnio pavojaus klasei nepagrįstas ir
 - yra patikimos informacijos, rodančios didelį toksišką poveikį žmonėms, arba
 - pastebimas tam tikras gaištamumas, kai bandymas atliekamas duodant per burną dozes, siekiančias 4 kategorijos vertes, arba
 - jei tęsiant bandymus iki 4 kategorijos verčių ekspertų sprendimu patvirtinami reikšmingi klinikiniai toksiškumo požymiai, išskyrus viduriavimą, pasiūšiusius plaukus arba nesveiko gyvūno išvaizdą, arba
 - jei ekspertų sprendimu patvirtinama patikima informacija, rodanti galimą reikšmingą ūmų poveikį darant kitus tyrimus su gyvūnais.

BANDYMAS ESANT DIDESNĖMS KAIP 2 000 MG/KG DOZĖMS

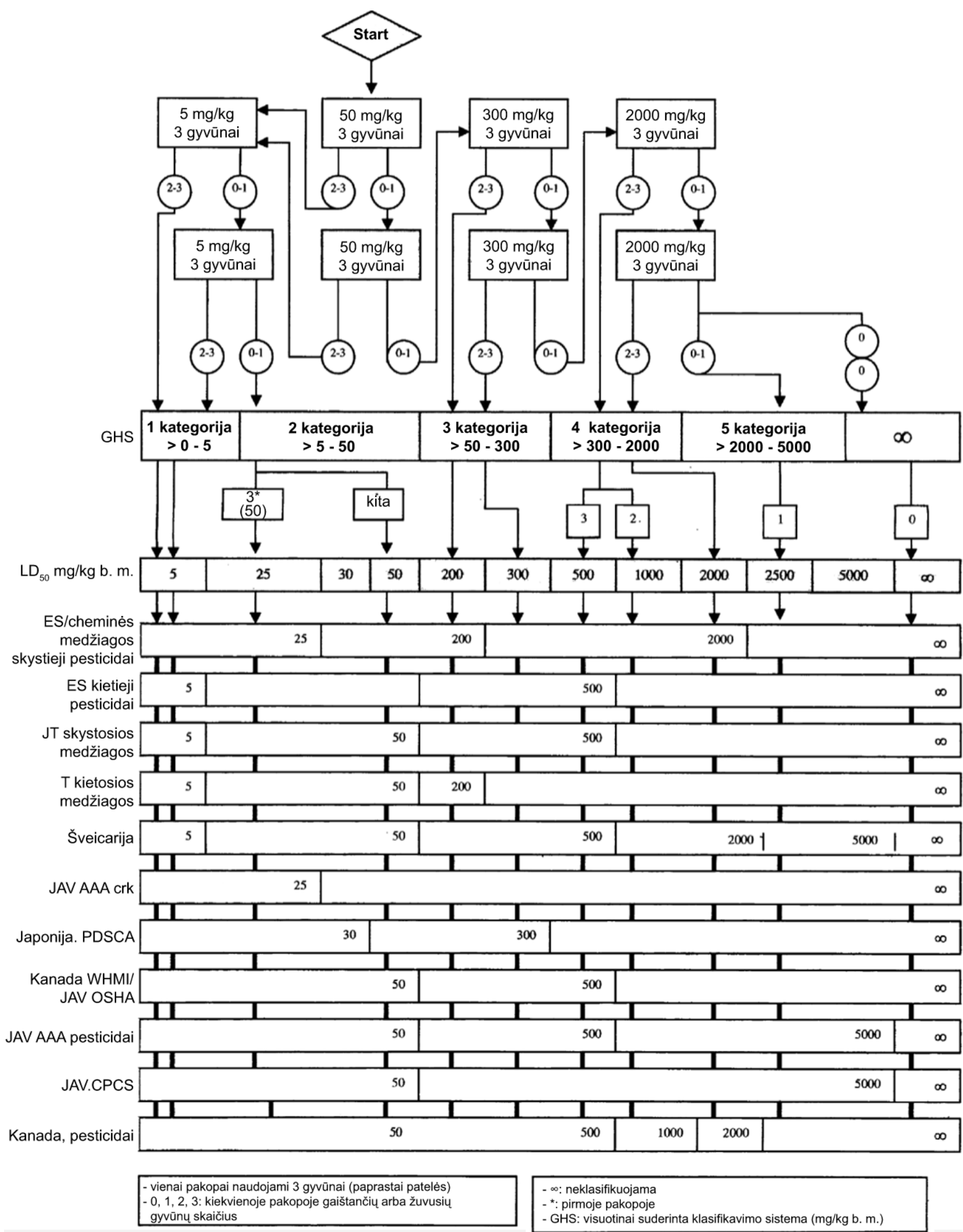
Pripažįstant būtinumą apsaugoti gyvūnų gerovę, bandymas su gyvūnais skiriant 5 kategorijos intervalo dozes (5 000 mg/kg) neskatinamas ir apie tokio bandymo būtinybę turėtų būti sprendžiama, kai yra didelė tikimybė, kad jo rezultatai yra tiesiogiai sietini su žmonių arba gyvūnų sveikatos apsauga (10). 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 priede pateiktas schemas. Jei pirmas gyvūnas lieka gyvas, dozę gauna kiti du gyvūnai. Jei žūsta tik vienas iš trijų gyvūnų, daroma prielaida kad LD₅₀ vertė yra didesnė negu 5 000 mg/kg. Jei žūsta abu gyvūnai, dozavimas tęsiamas skiriant 2 000 mg/kg dozę.

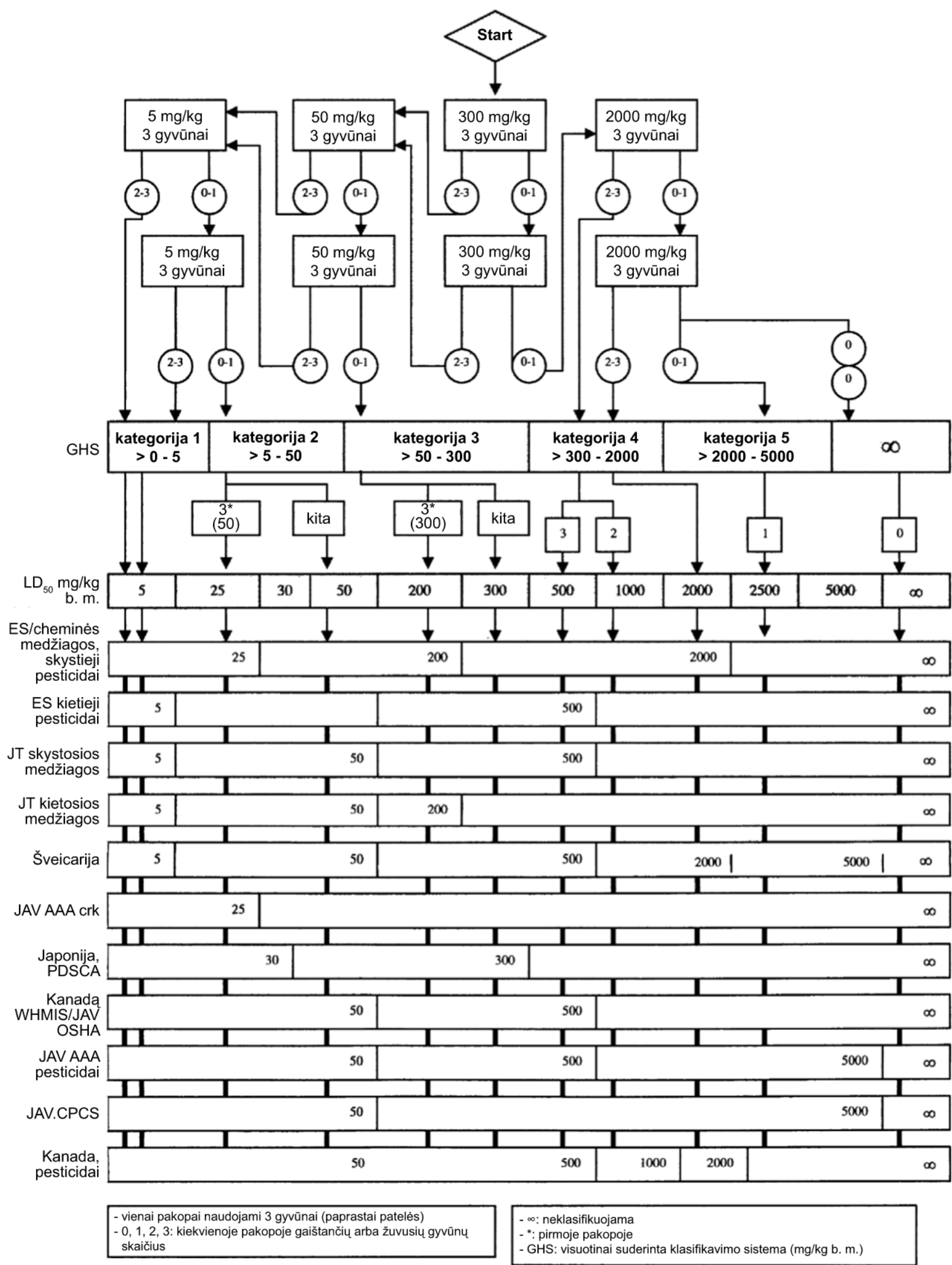
BANDYMŲ METODAS B.1 tris. Klasifikavimo pagal ES schemą rekomendacijos, taikomos pereinamajam laikotarpiui iki visiško visuotinai suderintos klasifikavimo sistemos (GHS) įgyvendinimo (paimta iš 8 nuorodos)



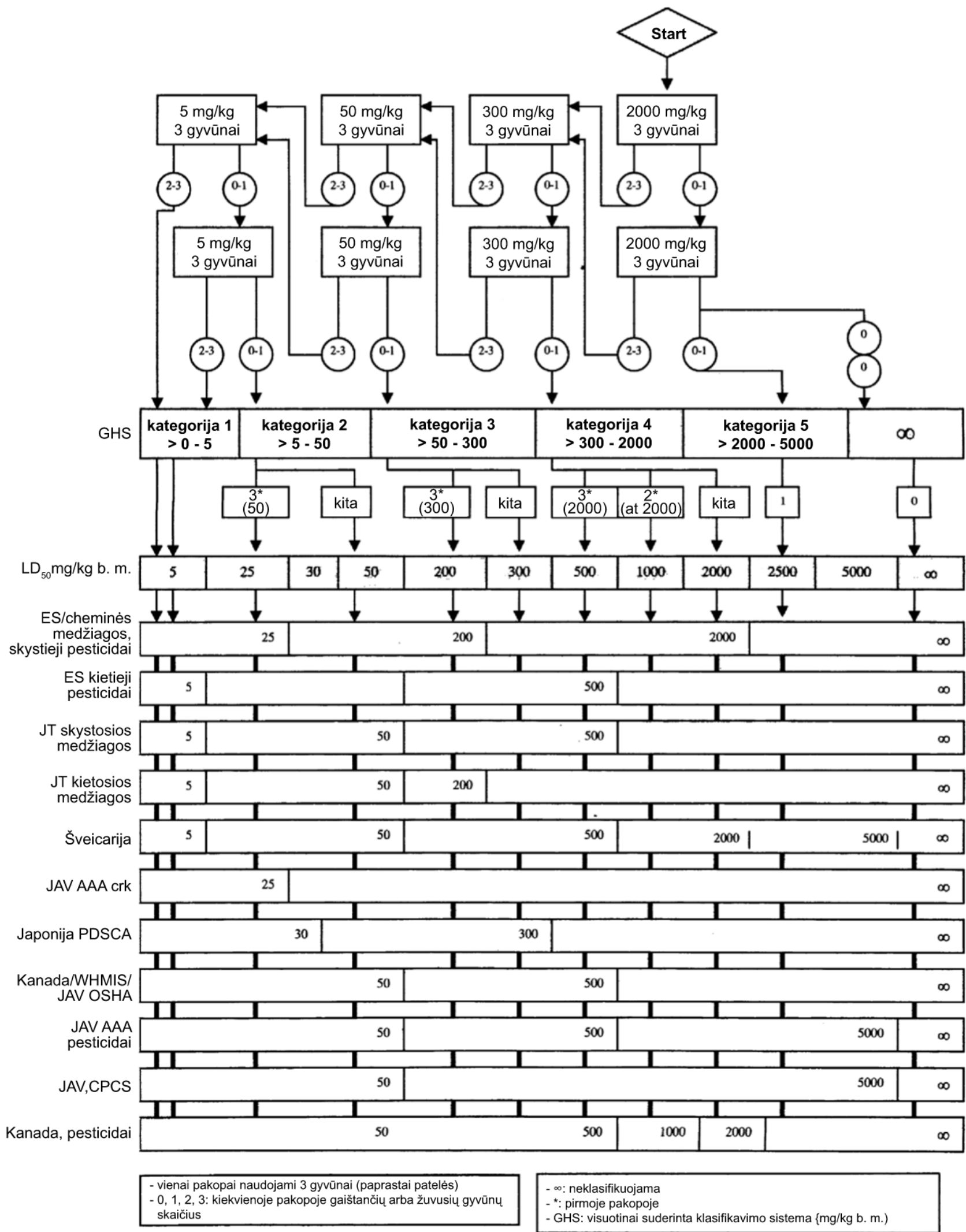
▼B



▼B



▼B



▼B**B.2. ŪMINIS TOKSIŠKUMAS (INHALIACINIS)****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Naudinga turėti išankstinę informaciją apie medžiagos dalelių dydžio pasiskirstymą, garų slėgį, lydymosi temperatūrą, virimo temperatūrą, pliūpsnio temperatūrą ir sprogamą (jeigu tinka).

Taip pat žr. bendrąją įvadinę B(A) dalį.

1.2. SĄVOKOS

Žr. bendrąją įvadinę B(B) dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Kelios eksperimentinių gyvūnų grupės yra veikiamos tiriamąja medžiaga apibrėžtą laikotarpį tam tikra tvarka suskirstytomis koncentracijomis, viena koncentracija naudojama vienai grupei. Po to atliekami poveikio ir žūties atvejų stebėjimai. Gyvūnams, kurie nugaišta bandymo metu, atliekama autopsija, o užbaigus bandymą – likusiems gyviems gyvūnams atliekama autopsija.

Gyvūnus, kurie turi aiškių ir ilgalaikių kančios ir skausmo požymių, reikia humaniškai nužudyti. 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 eksperimentinėmis laikymo ir šėrimo sąlygomis ne trumpiau kaip penkias dienas iki eksperimento. Prieš bandymą sveiki jauni gyvūnai yra randomizuojami ir suskirstomi į reikalingą grupių skaičių. Jie neturi patirti dirbtinai sukurto poveikio, išskyrus atvejus, jei tai daryti rekomenduojama dėl tam tikro poveikio aparato tipo.

Kietąsias tiriamas medžiagas gali tekti mikronizuoti, kad būtų gaunamos atitinkamo dydžio dalelės.

Prireikus į tiriamąją medžiagą gali būti dedama atitinkamo tirpiklio, kad būtų gaunama atitinkama tiriamos medžiagos koncentracija atmosferoje, po to turėtų būti naudojama kontrolinė tirpiklių grupė. Jeigu tirpiklis ar kiti priedai yra naudojami dozavimui palengvinti, turėtų būti žinoma, kad jie nesukels toksiško poveikio. Atitinkamais atvejais gali būti naudojamos ankstesniais duomenimis.

▼B**1.6.2. Bandymo sąlygos****1.6.2.1. *Eksperimentiniai gyvūnai***

Jeigu nėra kontraindikacijų, pirmenybė atiduodama žiurkėms s. Turėtų būti panaudojamos plačiai naudojamos laboratorinės veislės. Kiekvienai lyčiai bandymo pradžioje naudojamų gyvūnų svorio įvairavimas neturėtų viršyti $\pm 20\%$ atitinkamo vidutinio svorio.

1.6.2.2. *Skaičius ir lytis*

Ne mažiau kaip dešimt graužikų (penki patinėliai ir penkios patelės) yra naudojami kiekvienai koncentracijai. Patelės turėtų būti neturėjusios jauniklių ir nevaikingos.

Pastaba: Atliekant ūminio toksiškumo bandymus su aukštesniaisiais negu graužikai gyvūnais turi būti apsvaistoma galimybė naudoti mažesnę gyvūnų skaičių. Dozės turėtų būti atidžiai parenkamos ir turėtų būti dedamos visos pastangos neviršyti vidutiniškai toksiškų dozių. Tokiuose bandymuose turėtų būti vengiama įvesti mirtinas tiriamosios medžiagos dozes.

1.6.2.3. *Poveikio koncentracijos*

Koncentracijų skaičius turėtų būti pakankamas, ne mažiau trijų, ir taip paskirstytų, kad susidarytų bandymo grupės, turinčios tam tikrą toksiško poveikio intervalą ir mirštamumo procentą. Duomenų turi būti tiek, kad pakaktų sudaryti mirtinų koncentracijų kreivę ir atitinkamais atvejais būtų galima tinkamai nustatyti LC_{50} .

1.6.2.4. *Ribinis bandymas*

Jeigu penkis bandomus patinėlius ir penkias bandomas pateles paveikus 5 mg skystos arba kietos medžiagos viename litre dujų arba aerozolio (arba, jeigu tai neįmanoma dėl tiriamos medžiagos fizikinių arba cheminių, taip pat ir sprogumo savybių – maksimalia pasiekama koncentracija) keturias valandas, per 14 dienų nebūna su tuo cheminiu junginiu susijusių nugaikimo atvejų, laikoma, kad tolesnis bandymas yra nereikalingas. (18th ATP, dir. 93/21/EEC, L1 10/93)

1.6.2.5. *Poveikio trukmė*

Poveikio trukmė turėtų būti lygi keturioms valandoms.

1.6.2.6. *Įrenginiai*

Gyvūnai turėtų būti bandomi inhaliaciniais įrenginiais, skirtais išlaikyti dinaminį oro srautą ne mažiau kaip 12 oro pasikeitimų per valandą, kad būtų užtikrintas pakankamas deguonies kiekis ir vienodai pasiskirstytų poveikio atmosfera. Jeigu naudojama kamera, ji turėtų būti tokios konstrukcijos, kad kaip galima būtų sumažinamas gyvūnų susigrūdimas ir kad jie įkvėptų kaip galima daugiau tiriamosios medžiagos. Paprastai, norint užtikrinti kameros atmosferos pastovumą, visas bandomų gyvūnų „tūris“ neturėtų viršyti 5 % bandymo kameros tūrio. Atskiroje kameroje gali būti paveikiama burna ir nosis, tik galva arba visas kūnas; du pirmieji būdai padeda sumažinti tiriamos medžiagos patekimą kitais keliais.

▼B1.6.2.7. *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, jis gali būti pailginamas. Labai svarbus yra laikas, kada toksiškumo požymiai atsiranda ir išnyksta, bei nugaišimo laikas, ypač jeigu yra tendencija, kad žūtis pasireiškia vėliau.

1.6.3. **Darbo eiga**

Prieš pat poveikį gyvūnai yra sveriami ir po to paveikiami tirama koncentracija tam skirtame aparate keturias valandas po to, kai kameroje nustatoma koncentracijos pusiausvyra. Pusiausvyros nustatymo trukmė turi būti trumpa. Temperatūra, kurioje vykdomas bandymas, turėtų būti išlaikoma 22 ± 3 °C. Tinkamiausias santykinis drėgnumas yra tarp 30 % ir 70 %, bet tam tikrais atvejais (pvz., atliekant tam tikrus aerozolių bandymus), tai gali būti neįgyvendinama. Išlaikant nedidelį neigiamą slėgį kameros viduje (≥ 5 mm vandens) užkertamas kelias tiriamajai medžiagai patekti į aplinką. Poveikio metu turėtų būti duodama pašaro ir vandens. Turėtų būti naudojamos atitinkamos bandymo atmosferos generavimo ir stebėsenos sistemos. Tokia sistema turėtų užtikrinti, kad kaip galima greičiau bus pasiektos pastovios poveikio sąlygos. Kamera turėtų būti tokios konstrukcijos ir taip veikti, kad kameros viduje būtų palaikomas vienodas bandymo atmosferos pasiskirstymas.

Turėtų būti atliekami šie matavimai arba stebėsenos:

- a) oro srauto greičio (visą laiką),
- b) tikrosios tiriamos medžiagos koncentracijos, matuojamos kvėpavimo zonoje ne mažiau kaip tris kartus poveikio metu (esant tam tikrai atmosferai, pvz., naudojant didelės koncentracijos aerozolius, gali tekti vykdyti dažnesnį monitoringą). Poveikio metu koncentracija neturėtų keistis daugiau negu ± 15 % vidutinės vertės. Tačiau naudojant tam tikrus aerozolius, šio kontrolės lygio gali būti neįmanoma pasiekti, tokiu atveju būtų priimtinas platesnis intervalas. Aerozolių dalelių dydžio analizė turėtų būti atliekama reikiamu dažnumu (ne rečiau kaip vieną kartą vienai bandomajai grupei),
- c) temperatūros ir drėgnumo, jeigu įmanoma, visą laiką.

Poveikio metu ir po jo 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 iki minimumo sumažinti bandymo metu prarandamų gyvūnų skaičių, pvz., rastų negyvų gyvūnų autopsija arba užšaldymas ir nusilpusių arba gaištančių gyvūnų izoliavimas arba nužudymas.

▼B

Stebimi odos ir kailio, akių, gleivinės pasikeitimai, taip pat respiratorinės, kraujo, autonominės ir centrinės nervų sistemų ir somatomotorinės veiklos ir elgsenos pasikeitimai. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas tremorų, konvulsijų, salivacijos, diarėjos, letargo, miego ir komos stebėjimams. Nugaišimo laikas turėtų būti užrašomas kaip galima tiksliau. Kiekvieno gyvūno svoris turėtų būti nustatomas kiekvieną savaitę po poveikio ir šiam nugaišus.

Gyvūnams, kurie nugaišta bandymo metu, ir tiems, kurie išlieka gyvi bandymą sustabdžius, atliekama autopsija, ypač atkreipiant dėmesį į visus viršutinių ir apatinių kvėpavimo takų pokyčius. Turėtų būti užregistruojami visi dideli patologiniai pokyčiai. Jeigu reikalaujama, turėtų būti paimami audiniai histopatologiniam tyrimui.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti apibendrinami lentelėse, nurodant kiekvienos bandomos grupės gyvūnų skaičių bandymo pradžioje, kiekvieno gyvūno nugaišimo laiką, gyvūnų, turinčių kitokius toksiškumo požymius, skaičių, pateikiant toksiškų poveikių ir autopsijos duomenų aprašymą. Turėtų būti apskaičiuojami ir registruojami svorio pasikeitimai, jeigu išgyvenama ilgiau negu vieną dieną. Gyvūnai, kurie humaniškai nužudomi dėl cheminio junginio sukeliamų kančių ir skausmo, yra užregistruojami kaip nugaišimo atvejai, kurių priežastis – cheminis junginys. LD₅₀ gali būti nustatomas pripažintu metodu. Į duomenų vertinimą turėtų įeiti sąryšis, jeigu toks yra, tarp gyvūnų poveikio tiriamąją medžiagą ir visų specifinių rodiklių dažnumo ir stiprumo, taip pat ir elgsenos ir klinikinių parodymų, didesnių audinių pakitimų, kūno svorio pasikeitimų, mirštamumo ir kitų toksikologinių poveikių.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

3.1. **BANDYMO ATASKAITA**

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, pateikiama tokia informacija:

— rūšis, veislė, gyvūnų tiekėjas, aplinkos sąlygos, pašarai ir pan.;

— bandymo sąlygos: poveikio aparato apibūdinimas, taip pat aparato konstrukcija, tipas, dydžiai, oro šaltinis, aerozolių generavimo sistema, oro kondicionavimo metodas ir gyvūnų laikymo bandymo kameroje, jeigu tokia naudojama, būdas. Turėtų būti apibūdinama temperatūros, drėgnumo matavimo įranga, aerozolio koncentracijos ir dalelių dydžio pasiskirstymas.

▼B

Duomenys apie poveikį

Jie turėtų būti pateikiami lentelėse vidutinėmis vertėmis ir kintamumo vienetais (pvz., standartinis nuokrypis) ir, jeigu įmanoma, į juos turėtų būti įtraukti:

- a) oro srauto, tekančio inhaliacijos įrenginiu, greitis;
- b) oro temperatūra ir drėgnumas;
- c) nominalios koncentracijos (visas tiriamos medžiagos kiekis, įdėtas į inhaliacijos įrenginį, padalytas iš oro tūrio);
- d) tirpiklio, jeigu naudotas, rūšis;
- e) faktinės koncentracijos kvėpavimo bandymo zonoje;
- f) masės medianinis aerodinaminis skersmuo (MMAD) ir geometrinis standartinis nuokrypis (GSD);
- g) pusiausvyros nustatymo periodas;
- h) poveikio periodas;
 - duomenų apie reakciją pagal lytį ir poveikį surašymas į lenteles (pvz., gyvūnų, kurie nugaišo arba buvo nužudyti bandymo metu, skaičius; toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičius; paveiktų gyvūnų skaičius),
 - nugaišimo laikas poveikio metu arba po jo, priežastys ir kriterijai, kuriais naudotasi humaniškai nužudant gyvūnus,
 - visi pastebėjimai,
 - LC₅₀ vertė kiekvienai lyčiai, nustatyta stebėjimo laikotarpio pabaigoje (nurodant apskaičiavimo metodą),
 - LC₅₀ 95 % pasikliautinis intervalas (tais atvejais, kai gali būti pateikta),
 - dozės ir mirštamumo kreivė ir statusas (jeigu įmanoma pagal nustatymo metodą),
 - autopsijos duomenys,
 - visi histopatologiniai duomenys,
 - rezultatų aptarimas (ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas tam, kokią poveikį humaniškas gyvūnų nužudymas bandymo metu galėtų turėti apskaičiuojamai LC₅₀ vertei),
 - rezultatų aiškinimas.

3.2. REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(D) dalį.

4. LITERATŪRA

Žr. bendrąją įvadinę B(E) dalį.

▼B**B.3. ŪMINIS TOKSIŠKUMAS (PER ODA)****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. bendrąją įvadinę B(A) dalį.

1.2. SĄVOKOS

Žr. bendrąją įvadinę B(B) dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Tiriamoji medžiaga dedama ant odos suskirstytomis dozėmis kelioms eksperimentinių gyvūnų grupėms, viena dozė – vienai grupei. Po to atliekami poveikio ir nugaišimo atvejų stebėjimai. Gyvūnams, kurie nugaišta bandymo metu, atliekama autopsija, ir, užbaigus bandymą, autopsija daroma išlikusiems gyviems gyvūnams.

Gyvūnus, kurie turi aiškių ir ilgalaikių kančios ir skausmo požymių, reikia humaniškai nužudyti. 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 randomizuojami ir paskiriami į apdorojimo grupes. Apytikriai 24 valandas iki bandymo nuo gyvūno kūno sprando srityje pašalinamas kailis, jį nukerpant arba nuskutant. Jeigu kailis kerpamas arba skutamas, reikia stengtis nenubrūžinti odos, tai gali pakeisti pralaidumą. Tiriamajai medžiagai uždėti turėtų būti nukirpta ar nuskusta ne mažiau kaip 10 % kūno paviršiaus. Jeigu bandomos kietosios medžiagos, kurios atitinkamais atvejais gali būti pulverizuojamos, tiriamoji medžiaga turėtų būti pakankamai sudrėkinama vandeniu arba, jeigu reikia, atitinkamu tirpikliu, kad būtų užtikrinamas geras sąlytis su oda. Jeigu naudojamas tirpiklis, turėtų būti atsižvelgiama į tirpiklio poveikį tiriamosios medžiagos išsiskverbimui į odą. Skystos tiriamosios 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 kitos rūšys, bet jų naudojimas turėtų būti pagrindžiamas. Turėtų būti panaudojamos plačiai naudojamos veislės. Kiekvienai lyčiai bandymo pradžioje naudojamų gyvūnų svorio įvairavimo intervalas neturėtų viršyti ± 20 % atitinkamo vidutinio svorio.

▼ **B**1.6.2.2. *Skaičius ir lytis*

Kiekvienai dozei naudojama ne mažiau 5 gyvūnų. Jie visi turėtų būti vienos lyties. Jeigu naudojamos patelės, jos turėtų būti neturėjusios jauniklių ir būti nevaikingos. Jeigu galima gauti informacijos, parodančios, kad kuri nors lytis yra daug jautresnė, dozė taikoma tai lyčiai.

Pastaba. Atliekant ūminio toksiškumo bandymus su aukštesniaisiais negu graužikai gyvūnais reikėtų išnagrinėti galimybę naudoti mažesnių gyvūnų skaičių. Dozės turėtų būti kruopščiai parenkamos, ir stengiamasi neviršyti vidutinio toksiškumo dozių. Tokių bandymų metu turėtų būti vengiama įvesti mirtinas tiriamosios medžiagos dozes.

1.6.2.3. *Dozės*

Jų turėtų būti pakankamas skaičius, ne mažiau kaip trys, ir atitinkamai paskirstytų, kad susidarytų tiriamosios grupės, turinčios atitinkamą toksiško poveikio intervalą ir mirštamumo procentą. Duomenų turėtų būti tiek, kad būtų galima sudaryti dozės ir reakcijos kreivę ir, jeigu įmanoma, būtų galima nustatyti LD₅₀.

1.6.2.4. *Ribinis bandymas*

Jeigu naudojami graužikai, ribinis bandymas suleidžiant vieną dozę, ne mažesnę kaip 2 000 mg/kg kūno svorio, gali būti atliekamas su penkių patinėlių ir penkių patelių grupe, naudojant aukščiau apibūdintą 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 stebėjimų trukmė neturėtų būti griežtai nustatoma. Ji turėtų būti nustatoma pagal toksines reakcijas, jų pasireiškimo dažnumą ir sveikimo laikotarpio trukmę; todėl jis gali būti pailginamas, jeigu laikoma, kad to reikia. Svarbus yra laikas, per kurį toksiškumo požymių atsiranda ir išnyksta, taip pat nugaišimo laikas, ypač jeigu yra tendencija, kad žūtis pasireiškia vėliau.

1.6.3. **Darbo eiga**

Gyvūnai turėtų būti laikomi atskiruose narveliuose. Tiriamoji 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 kiek įmanoma plonesnių ir lygesniu sluoksniu.

Tiriamoji medžiaga turėtų liestis su oda akytu marlės tvarsčiu ir nedirginančia lipnia juoste per visą 24 valandų poveikio laiką. Tiriamoji vieta ir toliau turėtų būti atitinkamai padengta, kad būtų išsaugotas marlės tvarstis ir tiriamoji medžiaga bei užtikrinama, kad gyvūnai nepraris tiriamosios medžiagos. Gali būti naudojami ribotuvai, kad tiriamoji medžiaga nebūtų praryjama, bet visiško imobilizavimo metodas nerekomenduojamas.

▼B

Poveikio laikotarpio pabaigoje tiriamosios medžiagos likutis turėtų būti nuimamas, paprastai naudojant vandenį ar kokį kitą atitinkamą odos valymo būdą.

Poveikio 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 iki minimumo sumažinti bandymo metu prarandamų gyvūnų skaičių, pvz., rastų negyvų gyvūnų autopsija arba užšaldymas ir nusilpusių arba gaištančių gyvūnų izoliavimas arba nužudymas.

Turėtų būti stebimi odos ir kailio, akių ir gleivinės pasikeitimai, taip pat respiratorinės, kraujos, autonominės ir centrinės nervų sistemų ir somatomotorinės veiklos ir elgsenos pasikeitimai. Ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas tremorų, konvulsijų, salivacijos, diarėjos, letargo, miego ir komos stebėjimams. Nugaišimo laikas turėtų būti užrašomas kaip galima tiksliau. Gyvūnams, kurie nugaišo bandymo metu ir kurie išliko gyvi dėl bandymo nutraukimo, yra atliekama autopsija. Visi dideli patologiniai pokyčiai turėtų būti registruojami. Jeigu nurodyta, turėtų būti paimami audiniai histopatologiniam ištyrimui.

Priešingos lyties toksiškumo 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 labiau jautresni tiriamai medžiagai. Esant kitokioms sąlygoms, mažesnio gyvūnų skaičiaus naudojimas turėtų būti pagrindžiamas. Jeigu galima gauti pakankamai informacijos, įrodančios, kad tiriamos lyties gyvūnai yra daug jautresni, galima apsieiti be priešingos lyties gyvūnų bandymo.

2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti apibendrinami lentelėse, kiekvienai grupei nurodant gyvūnų skaičių bandymo pradžioje, kiekvieno gyvūno nugaišimo laiką, gyvūnų, turinčių kitokius toksiškumo požymius, skaičių, pateikiant toksiškų poveikių ir autopsijos duomenų aprašymą. Turėtų būti nustatomas kiekvieno gyvūno svoris ir užrašomas prieš pat įvedant tiriamąją medžiagą, po to kartą per savaitę ir nugaišimo metu; turėtų būti apskaičiuojami svorio pasikeitimai ir užrašomi, jeigu išgyvenama ilgiau negu vieną dieną. Gyvūnai, kurie humaniškai nužudomi dėl cheminio junginio sukeltų kančių ir skausmo, yra užregistruojami kaip žūties atvejai, kurių priežastis – cheminis junginys. LD₅₀ gali būti nustatomas pripažintu metodu.

Į duomenų vertinimą turėtų įeiti sąryšis, jeigu toks yra, tarp gyvūnų, paveiktų tiriamąja medžiaga, ir visų specifinių rodiklių dažnumo ir stiprumo, taip pat ir elgsenos ir klinikinių parodymų, didesnių audinių pakitimų, kūno svorio pasikeitimų, mirštamumo ir kitų toksikologinių poveikių.

3. ATASKAITOS PATEIKIMAS

3.1. BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje, jeigu įmanoma, turėtų būti pateikiama tokia informacija:

▼B

- rūšis, veislė, gyvūnų tiekėjas, aplinkos sąlygos, pašaras ir pan.,
- bandymo sąlygos (taip pat odos nuvalymo metodas ir tvarstymo būdas: uždaras arba neuždaras),
- dozės (nurodant tirpiklį, jeigu naudojamas, ir koncentracijas),
- gyvūnų, kuriems įvestos dozės, lytis,
- duomenų lentelės pagal lytį ir dozes (t. y. gyvūnų, kurie nugaišo arba buvo nužudyti bandymo metu, skaičius, toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičius, paveiktų gyvūnų skaičius),
- nugaišimo laikas įvedus dozę, priežastys ir kriterijai, kuriais naudotasi humaniškai nužudant gyvūnus,
- visi pastebėjimai,
- išsamiam bandyme dalyvavusių lyčių LD_{50} vertės, kurios nustatytos per 14 dienų (nurodant apibrėžtą nustatymo metodą),
- LD_{50} 95 % pasikliautinis intervalas (tais atvejais, kai gali būti pateikta),
- dozės ir mirštamumo kreivė ir statusas, jeigu įmanoma nustatyti pagal nustatymo metodą,
- autopsijos duomenys,
- visi histopatologiniai duomenys,
- bet kurio bandymo su priešinga lytimi rezultatai,
- rezultatų aptarimas (ypatingas dėmesys turėtų būti atkreipiamas į tai, kokią poveikį apskaičiuojamai LD_{50} vertei gali turėti humaniškas gyvūnų nužudymas bandymo metu),
- duomenų aiškinimas.

3.2. DUOMENŲ APSKAIČIAVIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(D) dalį.

4. LITERATŪRA

Žr. bendrąją įvadinę B(E) dalį.

▼B**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. Šiame metode 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 nuoseklių bandymą (1). Į bandymo strategiją, pateikiamą kaip šio metodo priedas, 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 tyrimų su žmonėmis ir (arba) laboratoriniais gyvūnais rezultatai, ėsdinimo ar dirginimo duomenys, gauti apie vieną arba kelias medžiagas, turinčias giminingą 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 tyrimų metu gautų duomenų.

Pirmenybė teikiama į šio metodo priedą įtrauktai nuosekliųjų bandymų strategijai, kurią sudaro įteisinti ir priimti *in vitro* arba *ex vivo* odos 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. Naujoms medžiagoms rekomenduojamas nuoseklusis bandymo būdas mokslškai pagrįstiems duomenims apie medžiagos ėsdinimo ar dirginimo savybes gauti. Turimoms medžiagoms, apie kurių odos ėsdinimo ar dirginimo savybes duomenų nepakanka, ši strategija turėtų būti taikoma, jei trūksta duomenų. Kitokios bandymo strategijos arba metodikos taikymas arba sprendimas netaikyti nuoseklaus bandymų metodo turi būti pagrįstas.

Jei ėsdinimo arba dirginimo savybių negalima nustatyti, darant duomenų įrodomosios vertės analizę, atitinkančią nuoseklaus bandymo strategiją, reikėtų spręsti klausimą apie *in vivo* bandymą (žr. priedą).

▼B

1.2 SĄVOKOS

Odos dirginimas: išnykstantis odos pažeidimas, bandomąja medžiaga veikiant ne ilgiau kaip 4 h.

Odos ėsdinimas – neišnykstantis odos pažeidimas; būtent, matomoji nekrozė per epidermį ir odos nekrozė po bandomosios medžiagos uždėjimo ne ilgiau kaip keturioms valandoms. Ėsdinimo požymiai yra opos, kraujavimas, kruvini šašai ir, baigiantis 14 parų stebėjimo laikotarpiui, odos blukimas dėl jos šutimo, visiškai nuplikusios vietos ir randai. Neaiškiems pažeidimams nustatyti galima būtų daryti histopatologinį tyrimą.

1.3 BANDYMO METODO ESMĖ

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. Tyrimo trukmės turi pakakti stebimo poveikio grįžtamumui arba negrįžtamumui įvertinti.

Gyvūnai, kuriems kurioje nors bandymo stadijoje pasireiškia nuolatiniai sunkių kančių ir (arba) skausmo požymiai, turi būti humaniškai nužudomi, o medžiaga atitinkamai įvertinama. Kriterijai, pagal kuriuos priimamas sprendimas dėl humaniško gaištančių ir labai kenčiančių gyvūnų nužudymo, aprašyti (8) nuorodoje.

1.4 BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.4.1 Pasiruošimas *in vivo* bandymui1.4.1.1 *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 užtikrinti 50-60 %. Apšvietimas turi būti dirbtinis, esant 12 h šviesos ir 12 h tamsos sekai. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, neribojant geriamo vandens kiekio.

▼B**1.4.2 Bandymo eiga****1.4.2.1 Bandomosios medžiagos uždėjimas**

Bandomoji medžiaga uždedama ant mažo odos ploto (maždaug 6 cm) 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 uždara 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 purškiamos, jei būtų manoma, kad tai daryti yra būtina), bandomąją medžiagą reikėtų sudrėkinti kiek įmanoma 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 nuplautas, jei įmanoma, vandeniui arba kitu tinkamu tirpikliu, nepakeičiant odos reakcijos arba epidermio vientisumo.

1.4.2.2 Dozės dydis

Ant bandymo vietos dedama 0,5 ml skysčio arba 0,5 g kietosios medžiagos arba pastos dozė.

1.4.2.3 Pradinis bandymas (in vivo odos dirginimo ar ėsdinimo bandymas su vienu gyvūnu)

Labai rekomenduojama *in vivo* bandymą iš pradžių daryti su vienu gyvūnu, ypač kai yra įtarimas dėl ėsdinančiųjų medžiagos savybių. Tai atitinka nuosekliųjų bandymų strategiją (žr. 1 priedą).

Kai po duomenų įrodomosios vertės analizės padaroma išvada, kad medžiaga yra ėsdinanti, bandymų su gyvūnais daryti nereikia. Didesnei daliai medžiagų, kurias galima laikyti ėsdinančiomis, *in vivo* bandymai paprastai nebūtini. 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 poveikimų, bandymas nedelsiant baigiamas. Jei ėsdinančio poveikio nėra, nuėmus paskutinį tamponą, gyvūnas stebimas 14 parų, jei ėdinimo požymių neatsiranda anksčiau.

▼B

Tai 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 su vienu tamponu ir esant keturių valandų veikimo trukmei. 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 trimis gyvūnams gali būti dedamas vienas tamponas, kuris nuimamas po keturių valandų. Kai naudojami du gyvūnai ir abiejų reakcija vienoda, toliau bandyti nereikia. Priešingu atveju dar daromas 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. Poveikio grįžtamumui nustatyti 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*

Stebima, ar visi gyvūnai neturi eritemos ir edemos požymių, o reakcija įvertinama po 60 minučių nuėmus tamponą 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 toksiškas poveikis, pvz., odos džiūvimas, ir bet koks sisteminis neigiamas 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, padėti bandymo laboratorijoms ir visiems, kurie vykdo ir aiškina stebėjimus, juos vykdančias personalas turi būti atitinkamai apmokytas taikyti įvertinimo balais sistemą (žr. toliau pateiktą lentelę). Tam galėtų būti naudingas iliustruotas odos dirginimo ir kitų pažeidimų įvertinimo vadovas (9).

2. **DUOMENYS**

2.1 **REZULTATŲ PATEIKIMAS**

Galutinėje ataskaitoje tyrimo rezultatai turi būti apibendrinti lentelėje, į kurią būtų įtraukti visi 3.1 skirsnio punktai.

▼B**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 dar vertinamas kitas bandomosios medžiagos poveikis. Į šiuos atskirus rezultatus reikėtų žiūrėti kaip į pamatines vertes, kurios turi būti vertinamos kartu su visais kitais tyrimo rezultatais.

Vertinant sudirginimą turėtų būti atsižvelgta į odos pažeidimų grįžtamumą. Kai reakcija, pvz., plikimas (ribotame plote), hiperkeratozė, hiperplazija ir pleiskanojimas, pasireiškia baigiantis stebėjimo laikotarpiu 14 parai, bandomoji medžiaga priskiriama dirginančioms.

3. ATASKAITOS RENGIMAS**3.1 BANDYMŲ ATASKAITA**

Bandymų 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 ar etaloningą medžiagą,
- duomenų įrodomosios vertės analizė *in vivo* tyrimui daryti.

Bandomoji medžiaga:

- identifikavimo duomenys (pvz., CAS numeris, šaltinis, grynumas, žinomos priemonės, siuntos numeris),
- fizinė būseną ir fizikocheminės savybės (pvz., pH, lakumas, tirpumas, stabilumas),
- sudėtis ir komponentų procentinė dalis, jei tai mišinys.

Nešiklis:

- identifikavimas, koncentracija (jei tinka), naudojamas tūris,
- nešiklio pasirinkimo pagrindimas.

Bandymo gyvūnai:

- naudota rūšis ir veislė, kitų, ne baltųjų triušių, naudojimo pagrindimas,
- kiekvienos lyties gyvūnų skaičius,
- atskirų gyvūnų masė bandymo pradžioje ir pabaigoje,
- amžius tyrimo pradžioje,
- gyvūnų šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.

▼B

Bandymo sąlygos:

- tampono dėjimo vietos ruošimo technika,
- išsami informacija apie naudojamą tampono medžiagą ir tampono dėjimo techniką,
- išsami informacija apie bandomosios medžiagos ruošimą, dėjimą ir nuėmimą.

Rezultatai:

- kiekvieno gyvūno dirginimo ar ėsdinimo reakcijos balų, gautų visuose matavimo laiko taškuose, 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 ėsdinimu pasireiškiančio neigiamo vietinio (pvz., odos džiūvimo) ir sisteminio 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., Esdaile, D.J., Holzutter, 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.oecd.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.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).

▼B

- 8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (<http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- 9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, (207-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990.

[Paprašius, galima gauti OECD sekretoriatė].

▼B*I LENTELE***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 (burokėlio raudonumo) arba šašų susidarymas, trukdantis įvertinti eritemą	4

Didžiausias įmanomas: 4

Edemos atsiradimas

Edemos nėra	0
Labai nedidelė edema (vos pastebima)	1
Nedidelė edema (plotelio kraštai aiškiai apibrėžti, nes yra pakilę)	2
Vidutinė edema (kraštai pakilę maždaug 1 mm)	3
Didelė edema (pakilusi daugiau kaip 1 mm ir išplitusi už veikiamo ploto ribų)	4

Didžiausias įmanomas: 4

Neaiškiems pažeidimams paaiškinti galima būtų daryti histopatologinį tyrimą.



PRIEDAS

Nuosekliųjų bandymų strategija odos dirginimui ir ėsdinimui nustatyti

BENDRIEJI KLAUSIMAI

Siekiant gauti nuodugnių mokslinių rezultatų ir rūpinantis gyvūnų gerove, svarbu be reikalo nenaudoti gyvūnų ir kiek įmanoma mažinti visus bandymus, kurie gyvūnams gali sukelti sunkias reakcijas. Visa informacija apie medžiagos galimą ėsdinamąjį ar dirginamąjį poveikį odai turėtų būti įvertinta prieš sprendžiant, ar daryti *in vivo* bandymus. 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 tyrimus. 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 ribinės vertės), turėtų būti nagrinėjama visa turima informacija. 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* tyrimų reikėtų kiek įmanoma vengti. Toliau pateikiami bandymų strategijos veiksniai.

▼B

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 giminingą struktūrą turinčių medžiagų bandymo rezultatai, jei tokie būtų. Kai tiriant žmones ir gyvūnus gautų duomenų apie giminingos struktūros medžiagas arba tokių medžiagų mišinius pakanka, norint 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. Taikant nuosekliųjų bandymų strategiją, neigiami duomenys, gauti tiriant giminingos struktūros medžiagas arba tokių medžiagų mišinius, nėra pakankamas įrodymas, kad medžiaga nėra ėsdinanti ar jautrinanti. Medžiagų geba ėsdinti ir dirginti odą nustatoma taikant įteisintus ir priimtus SAR metodus.

Fizikocheminės 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 medžiaga 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 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*.

▼B

Bandymas su triušiais in vivo (7 ir 8 pakopos). Jei atlikus duomenų įrodomosios vertės analizę priimamas sprendimas daryti bandymą *in vivo*, jį reikėtų pradėti pradinio 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.

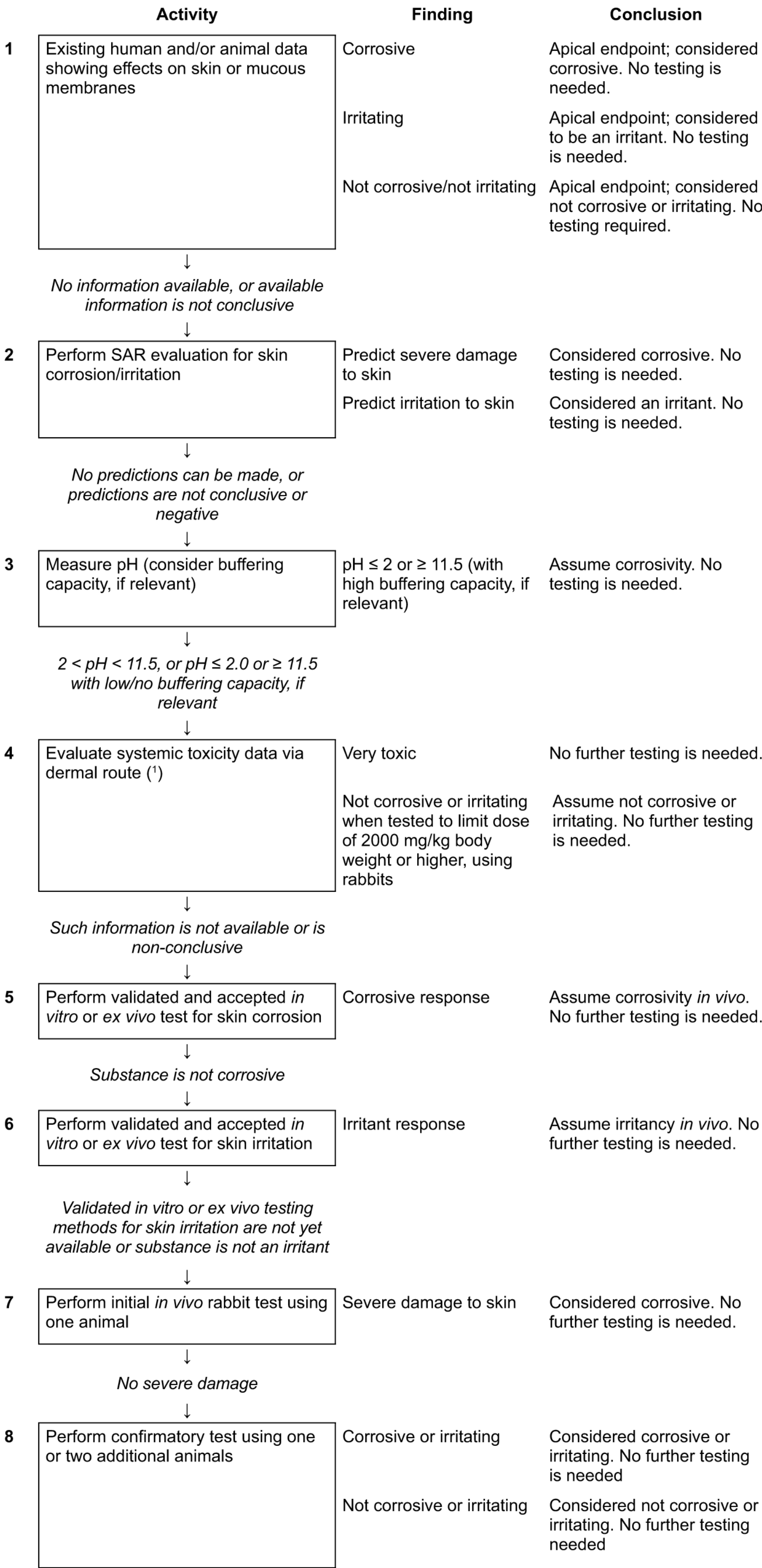
NUORODOS

- 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/background.htm>).
- 2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.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 irritation 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.



Schema

ODOS DIRGINIMO AR ĖSDINIMO BANDYMO IR ĮVERTINIMO STRATEGIJA



⁽¹⁾ can be considered before Steps 2 and 3.

▼B**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. Šiame metode 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 nuoseklių bandymą (2)(3). Į bandymo strategiją įtraukti šio metodo priede 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 vienu metu užtikrinti duomenų mokslinį patikimumą ir gyvūnų gerovę, *in vivo* bandymai neturėtų būti numatomi tol, kol darant duomenų įrodomosios vertės analizę nebus įvertinti visi turimi duomenys, apibūdinantys galimą medžiagos ėsdinamąjį ar dirginamąjį poveikį akims. Tokius duomenis sudarys turimų tyrimų su žmonėmis ir (arba) laboratoriniais gyvūnais rezultatai, ėsdinimo ar dirginimo duomenys, gauti apie vieną arba kelias medžiagas, turinčias giminingą struktūrą, arba jų mišinius, duomenys, patvirtinantys 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). Tyrimai gali būti daromi prieš duomenų įrodomosios vertės analizę arba kaip jos rezultatas.

Tokia kai kurių medžiagų analizė gali parodyti, kad reikia daryti medžiagos akių ėsdinimo ar dirginimo gebos *in vivo* tyrimus. Visais šiais atvejais prieš numatant daryti *in vivo* akių bandymą, iš pradžių reikėtų daryti medžiagos poveikio odai *in vivo* tyrimą ir jį įvertinti pagal B.4 bandymo metodą (7). Duomenų įrodomosios vertės analizės ir nuosekliųjų bandymų strategijos taikymas turėtų sumažinti poreikį *in vivo* bandyti tokių medžiagų, apie kurias jau yra gauta pakankamai duomenų darant kitus tyrimus, akių ėsdinimo ar dirginimo poveikį. Jei taikant nuosekliųjų bandymų strategiją akių ėsdinimo arba dirginimo geba negali būti nustatyta net po odos ėsdinimo ir dirginimo *in vivo* tyrimo, galima daryti *in vivo* akių ėsdinimo ar dirginimo bandymą.

▼ **B**

Pirmenybė teikiama į šio metodo priedą įtrauktai nuosekliųjų bandymų strategijai, kurią sudaro įteisinti ir priimti *in vitro* arba *ex vivo* odos ėsdinimo ar dirginimo bandymai. Strategiją parengė ir vienbalsiai rekomendavo OECD seminario 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. Naujoms medžiagoms rekomenduojamas nuoseklusis bandymo būdas moksliai pagrįstiems duomenims apie medžiagos ėsdinimo ar dirginimo savybes gauti. Turimoms medžiagoms, apie kurių odos ėsdinimo ar dirginimo savybes duomenų nepakanka, ši strategija turėtų būti taikoma, jei trūksta duomenų. Kitokios bandymo strategijos arba metodikos taikymas arba sprendimas netaikyti nuoseklaus bandymų metodo turi būti pagrįstas.

1.2 SĄVOKOS

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

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

1.3 BANDYMO METODO ESMĖ

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, poveikio išsamiam įvertinimui aprašomas bet koks kitas poveikis ir neigiamas sisteminis poveikis. Tyrimo 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 nužudomi, o medžiaga atitinkamai įvertinama. Kriterijai, pagal kuriuos priimamas sprendimas dėl humaniško gaištančių ir labai kenčiančių gyvūnų nužudymo, aprašyti (10) nuorofoje.

1.4 BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.4.1 Pasiruošimas *in vivo* bandymui1.4.1.1 *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 nustatomas akių dirginimas, akių defektai arba prieš tai buvęs ragenos pažeidimas, neturi būti naudojami.

▼ B1.4.1.3 *Laikymo ir šėrimo sąlygos*

Gyvūnai turi būti laikomi atskirai. 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 užtikrinti 50–60 %. Apšvietimas turi būti dirbtinis, esant 12 h šviesos ir 12 h tamsos sekai. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, neribojant geriamo vandens kiekio.

1.4.2 **Bandymo eiga**1.4.2.1 *Bandomosios medžiagos dėjimo būdas*

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

1.4.2.2 *Akių plovimas*

Bandomo gyvūno akių, įdėjus bandomosios medžiagos, 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, išskyrus kai tai yra mokslškai pagrįsta. Prireikus pagalbinės grupės, reikėtų naudoti du gyvūnus. Kruopščiai aprašomos plovimo sąlygos, pvz., plovimo laikas, plovimo tirpalo sudėtis ir temperatūra, trukmė, tūris ir tiekimo 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. Prieš įpurškiant 0,1 ml į akį, skystis iš pradžių pumpuojamas ir surenkamas į indą.

1.4.2.3.2 *Kietųjų medžiagų bandymas*

Bandant kietąsias medžiagas, pastą ir daleles, naudojamos medžiagos tūris turi būti 0,1 ml arba masė – ne didesnė kaip 100 mg. Bandomoji medžiaga turi būti sumalta į smulkias dulkes. Kietosios medžiagos tūris matuojamas ją švelniai sutankinus, pvz., tapšnojant matavimo indą. Jei stebint pirmą kartą, praėjus 1 h po akies apdorojimo, kieta bandomoji medžiaga nepašalinama iš bandomo gyvūno akies veikiant fiziologiniams mechanizms, akį galima praplauti fiziologiniu tirpalu arba distiliuotu vandeniu.

▼ **B**1.4.2.3.3. *Aerolių bandymas*

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

Aerolio dozei įvertinti galima modeliuoti šį įpurškimo bandymą: per triušio akies dydžio angą medžiaga purškiama ant pasverto popieriaus lapo, dedamo tiesiai prieš akį. Popieriaus masės padidėjimas naudojamas apytikriam į akį įpurškto kiekio įvertinimui. Lakiųjų medžiagų dozė gali būti įvertinta pasveriant indą su medžiaga prieš įpurškimą 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 priedą), 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 nuskausminama panašiu būdu.

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

Jei darant pradinį bandymą ėsdinantis poveikis nepastebimas, 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 galimą stiprų (neišnykstantį) poveikį darant patvirtinamąjį bandymą, šį bandymą rekomenduojama daryti nuosekliu būdu ir vietoj dviejų papildomų gyvūnų vienu metu naudoti vieną gyvūną. Jei antrajam gyvūnui pasireiškia ėsdinamasis arba sunkus dirginamasis poveikis, bandymas nutraukiamas. Silpnam arba vidutinio dydžio dirginamajam poveikiui patvirtinti gali būti reikalingi papildomi gyvūnai.

▼B**1.4.2.7** *Stebėjimo laikotarpis*

Stebėjimo laikotarpio trukmės turi pakakti stebimo poveikio dydžiui ir grįžtamumui visiškai įvertinti. Tačiau bandymas turi būti baigtas bet kuriuo momentu, kai tik gyvūnui pasireiškia ilgalaikiai didelio skausmo arba kančios požymiai (9). Poveikio grįžtamumui nustatyti gyvūnai paprastai stebimi 21 parą po bandomosios medžiagos davimo. Jei grįžtamumas pastebimas 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 nužudyti, o medžiaga atitinkamai įvertinta. Turi būti humaniškai nužudomi 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. Nužudyti reikia todėl, kad tokie pažeidimai paprastai yra negrįžtami.

Bandymas su gyvūnais, kuriems akių pažeidimų nepastebima, gali būti baigtas ne anksčiau kaip ketvirtą parą po įlašinimo. Gyvūnai su nedideliais ir vidutiniais pažeidimais turi būti stebimi tol, kol pažeidimai pranyksta, arba 21 parą, t. y. iki tyrimo pabaigos. Apžiūrėti reikia po 7, 14 ir 21 paros, kad būtų galima nustatyti pažeidimų tipą ir jų grįžtamumą arba negrįžtamumą.

Akių pažeidimo balai (junginės, ragenos ir rainelės) užrašomi kiekvienos apžiūros metu (1 lentelė). Be to, nurodomi visi kiti akies pažeidimai (pvz., panuso, dėmių atsiradimas) arba sisteminis neigiamas poveikis.

Reakcijos tikrinimą galima palengvinti naudojant binokulinę lupą, rankinę plyšinę lempą, biologinę mikroskopą arba kitokį tinkamą įtaisą. Užrašius 24 h stebėjimus, akys gali būti tiriamos naudojant fluoresceiną.

Akių reakcijos įvertinimas balais neišvengiamai yra subjektyvus. Siekiant labiau suderinti akių reakcijos įvertinimą balais ir padėti bandymo laboratorijoms ir visiems, kurie vykdo ir aiškina stebėjimus, juos vykdomas personalas turi būti atitinkamai mokomas taikyti įvertinimo balais sistemą.

2. DUOMENYS**2.2 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 absoliučiuoju įverčiu, kadangi dar įvertinamas kitas bandomosios medžiagos poveikis. Į šiuos atskirus rezultatus reikėtų žiūrėti kaip į pamatines vertes, reikšmingas tik tais atvejais, kai jas patvirtina išsamus visų kitų stebėjimų aprašymas ir įvertinimas.

▼B**3. ATASKAITOS RENGIMAS****3.1 BANDYMŲ ATASKAITA**

Bandymų 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 procedūras, rezultatus, gautus tiriant bandomąją ar etaloninę medžiagą,
- daryto *in vivo* odos dirginimo ar ėsdinimo tyrimo aprašymas, įskaitant gautus rezultatus,
- duomenų įrodomosios vertės analizė *in vivo* tyrimui daryti.

Bandomoji medžiaga:

- identifikavimo duomenys (pvz., CAS numeris, šaltinis, grynumas, žinomos priemaišos, siuntos numeris),
- fizikinė būseną ir fizikocheminės savybės (pvz., pH, lakumas, tirpumas, stabilumas, reagavimas su vandeniu),
- sudėtis ir komponentų procentinė dalis, jei tai mišinys,
- jei naudojama vietinio nuskausminimo priemonė: identifikavimas, grynumas, tipas, dozė ir galima sąveika su bandomąja medžiaga.

Nešiklis:

- identifikavimas, koncentracija (jei tinka), naudojamas tūris,
- nešiklio pasirinkimo pagrindimas.

Bandymo gyvūnai:

- naudota rūšis ar veislė, kitų nei baltųjų triušių naudojimo pagrindimas,
- kiekvieno gyvūno amžius tyrimo pradžioje,
- kiekvienos lyties gyvūnų skaičius bandymo ir kontrolinėje (jei reikia) grupėje,
- atskirų gyvūnų masė bandymo pradžioje ir pabaigoje,
- gyvūnų šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir kt.

Rezultatai:

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

▼B

- kiekvieno gyvūno dirginimo ar ėsdinimo reakcijos duomenų, gautų kiekvienu stebėjimo momentu iki gyvūno pašalinimo iš bandymo, lentelių sudarymas,
- stebimo dirginimo arba ėsdinimo tipo ir laipsnio pasakojamasis aprašymas,
- visų kitų akies pažeidimų aprašymas (pvz., vaskuliarizacija, panuso susidarymas, sąaugų, dėmių atsiradimas),
- bet kokio ne akims daromo neigiamo vietinio ir sisteminio poveikio aprašymas, visi histopatologinio tyrimo rezultatai, jei yra.

Rezultatų aptarimas.

3.2 REZULTATŲ AIŠKINIMAS

Akių dirginimo rezultatų, gautų laboratoriniams gyvūnams, ekstrapoliavimas žmonėms tinka tik tam tikru laipsniu. Daugeliu atvejų baltieji triušiai yra jautresni akis dirginančioms arba ėsdinančioms medžiagoms nei žmonės.

Aiškinant rezultatus reikia neįtraukti antrinės infekcijos sukkelto 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 Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 – 24 January 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).

▼B

- 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>).



I LENTELE.

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 pusiau skaidri 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: 4

PASTABOS

(*) Turi būti nurodyta ragenos drumsties sritis.

Rainelė

Normali	0
Labai pagilėjusios raukšlės, kongestija, pabrinkimas, vidutiniškai 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: 2

Junginė

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

Normali	0
Kai kurie kraujo indai aiškiai hiperemiški (išvirkšta)	1
Išsklaidyta tamsiai raudona spalva, atskiri indai sunkiai įžiūrimi	2
Išsklaidyta jautienos raudonumo spalva	3

Didžiausias įmanomas: 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: 4



PRIEDAS

Nuosekliųjų bandymų strategija akių dirginimui ir ėsdinimui nustatyti

BENDRIEJI KLAUSIMAI

Siekiant gauti nuodugnių mokslinių rezultatų ir rūpinantis gyvūnų gerove, svarbu be reikalo nenaudoti gyvūnų ir kiek įmanoma mažinti visus bandymus, kurie gyvūnams gali iššaukti sunkias reakcijas. Visa informacija apie medžiagą dėl jos galimo ėsdinamojo ar dirginamojo poveikio odai turėtų būti įvertinta prieš sprendžiant dėl *in vivo* bandymų. Jei jau yra pakankamai duomenų galimam bandomosios 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 tyrimus. 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 ribinės vertės), turėtų būti nagrinėjama visa turima informacija. 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* tyrimų reikėtų kiek įmanoma vengti. Toliau pateikiami bandymų strategijos veiksniai.

▼B

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) 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 giminingą struktūrą turinčių medžiagų bandymo rezultatai, jei tokie būtų. Kai tiriant žmones ir gyvūnus gautų duomenų apie giminingos struktūros medžiagas arba tokių medžiagų mišinius pakanką norint 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. Taikant nuosekliųjų bandymų strategiją, neigiami duomenys, gauti tiriant giminingos struktūros medžiagas arba tokių medžiagų mišinius, 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.

Fizikocheminės savybės ir cheminis reaktyvumas (3 pakopa). Medžiagos, turinčios ribines pH vertes, pvz., $\leq 2,0$ arba $\geq 11,5$, 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 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).

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.

▼B

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.

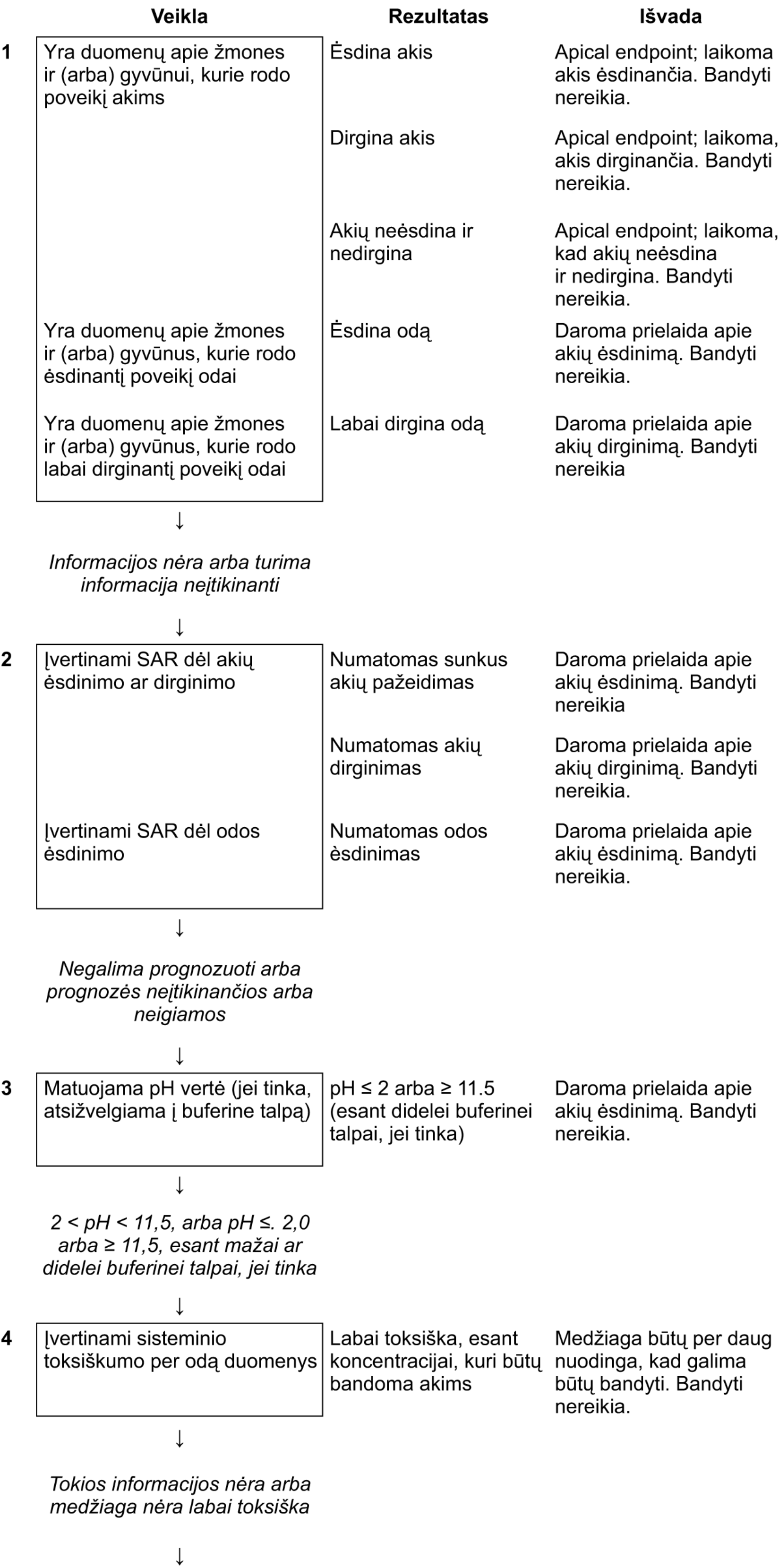
NUORODOS

- 1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- 2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- 3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 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.

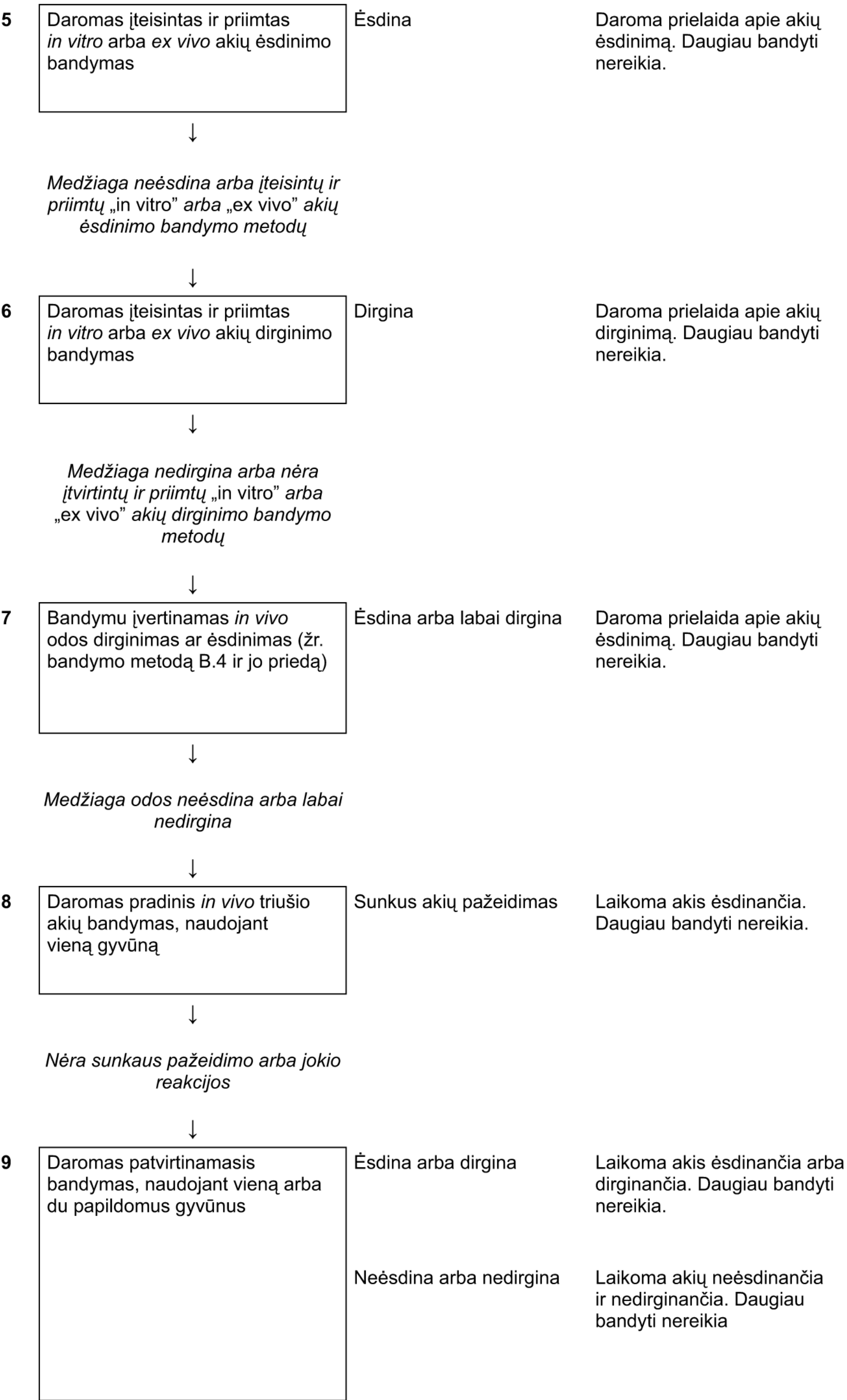


Schema

Akių dirginimo ar ėsdinimo bandymo ir įvertinimo strategija



▼ B



▼B**B.6. ODOS SENSIBILIZACIJA****1. METODAS****1.1. ĮVADAS***Pastabos*

Jautrūs ir galintys aptikti potencialius žmogaus odos alergenų tyrimai yra svarbūs klasifikuojant pavojus, kylančius žmonių sveikatai.

Nėra vieno tyrimo metodo, tiksliai nustatančio visas odą galinčias sensibilizuoti medžiagas bei tinkančio visoms medžiagoms.

Pasirenkant tyrimą, reikia atsižvelgti į medžiagos fizikines savybes, taip pat ir sugebėjimą prasiskverbti pro odą.

Sukurti dviejų tipų tyrimai, naudojant jūrų kiaulytes, t. y. adjuvantiniai tyrimai, kuriais alerginės reakcijos sustiprinamos tiriamąją medžiagą ištirpinant (ar padarant suspensiją) Freudo pilname adjuvante (FPA) ir neadjuvantiniai tyrimai.

Adjuvantiniai tyrimai tiksliau nustato žmogaus odą galinčias sensibilizuoti medžiagas negu tyrimai, kurie nenaudoja Freudo pilno adjuvanto.

Nors gali būti naudojami ir kiti metodai, nustatantys odą sensibilizuoti galinčias medžiagas, jūrų kiaulytės maksimizacijos tyrimas (JKMT) yra plačiausiai naudojamas adjuvantinis tyrimas.

Manoma, kad neadjuvantiniai tyrimai (plačiausiai naudojamas *Buehlerio* tyrimas) daugeliui medžiagų klasių yra mažiau jautrūs.

Kartais dėl svarių priežasčių pasirenkamas *Buehlerio* tyrimas, naudojantis antodines aplikacijas, o ne jūrų kiaulytės maksimizacijos tyrimas, naudojantis įodines injekcijas. Naudojant *Buehlerio* tyrimą, tai reikėtų moksliškai pagrįsti.

Šiame metode aprašyti jūrų kiaulytės maksimizacijos tyrimas (JKMT) ir *Buehlerio* tyrimas. Moksliškai pagrindus, galima naudoti ir kitus standartizuotus metodus.

Pripažintam atrankos tyrimui pateikus teigiamą rezultatą, tiriamoji medžiaga gali būti apibūdinama kaip potencialus alergenai, ir tolesnis jūrų kiaulytės tyrimas nebūtinai. Pateikus neigiamą rezultatą, turi būti atliktas jūrų kiaulytės tyrimas, remiantis šiame metode aprašyta procedūra.

Taip pat žiūrėkite Bendrojo įvado B dalį.

▼B

1.2. SAŲVOKOS

Odos sensibilizacija (alerginis kontaktinis dermatitas) – tai imuninės kilmės odos reakcija į medžiagą. Žmonėms atsakas gali pasireikšti odos niežėjimu, paraudimu, patinimu, spuogeliais, pūslėmis, pūslelėmis ar jų deriniu. Gyvūnų odos reakcijos skiriasi, jos pasireiškia paraudimu ir patinimu.

Indukcinis poveikis – eksperimentinis organizmo poveikis tiriamąja medžiaga, siekiant sukelti organizmo padidėjusio jautrumo būklę.

Indukcinis periodas – ne trumpesnis negu viena savaitė po indukcinio poveikio; jo metu gali išsivystyti organizmo padidėjusio jautrumo būklė.

Provokacinis poveikis – pakartotinis organizmo poveikis tiriamąja medžiaga po indukcinio periodo, siekiant nustatyti, ar organizmas reaguoja padidintai jautriai (alergiškai).

1.3. KONTROLINĖS MEDŽIAGOS

Naudojamos eksperimentinės technikos jautrumas ir rezultatų patikimumas turi būti įvertinamas kas šeši mėnesiai, naudojant medžiagas žinomas kaip silpno ar vidutinio stiprumo odos sensibilizatoriai.

Tinkamai atlikus tyrimą, adjuvantiniame bandyme mažiausiai 30 %, o neadjuvantiniame bandyme mažiausiai 15 % gyvūnų atsakų rodo silpną/vidutinio stiprumo sensibilizatorių (alergeną).

Yra naudojamos šios medžiagos:

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-merkaptobenzthiazolas)	kaptaksas
94-09-7	202-303-5	benzokainas	nordkainas

Esant svarioms priežastims, atitinkamai pagrindus, galima naudoti kitas kontrolines medžiagas.

1.4. TIRIAMOJO METODO PRINCIPAS

Iš pradžių tiriamieji gyvūnai paveikiami tiriamosios medžiagos įdinėmis injekcijomis ir (arba) antodinėmis aplikacijomis (indukcinis periodas). Praėjus 10-14 dienų poilsio laikotarpiui (indukciniam periodui), kurio metu gali pasireikšti imuninis atsakas, gyvūnai paveikiami provokacine doze. Tiriamųjų gyvūnų odos reakcijos į provokacinį poveikį apimtis ir laipsnis yra lyginami su kontrolinių gyvūnų, kurie patyrė imitacinį (nesensibilizuojančios medžiagos) indukcijos ir provokacijos poveikį.

1.5. TIRIAMOJO METODO APRAŠYMAS

Jeigu tiriamąją medžiagą būtina nuplauti, reikia naudoti vandenį ar tinkamą tirpiklį, kad nepakistų gautas atsakymas ar odos vientisumas.

▼B1.5.1. *Jūrų kiaulytės maksimizacijos tyrimas (JKMT)*

1.5.1.1. Pasiruošimas

Sveikos jaunos suaugę jūros kiaulytės mažiausiai 5 dienas prieš tyrimą aklimatizuojamos laboratorijos sąlygomis. Gyvūnai prieš tyrimą atsitiktinės atrankos būdu paskirstomi į tyrimo grupes. Kailis gali būti pašalinamas žirkklėmis, skutimu ar chemine depiliacija, stengiantis išvengti odos įbrėžimų. Gyvūnai pasveriami prieš tyrimo pradžią ir jo pabaigoje.

1.5.1.2. Tyrimo sąlygos

1.5.1.2.1. Tiriamieji gyvūnai

Naudojamos baltų jūros kiaulyčių įprastinės linijos.

1.5.1.2.2. Skaičius ir lytis

Gali būti naudojami patinai ir (arba) patelės. Patelės turi būti nevedusios jauniklių ir nepastojusios.

Tiriamajoje grupėje turi būti mažiausiai 10 gyvūnų, o kontrolinėje mažiausiai 5. Panaudojus mažiau negu 20 tiriamųjų ir 10 kontrolinių jūros kiaulyčių, neįmanoma padaryti išvados, kad tiriamoji medžiaga yra alergenai; tiriant papildomą gyvūnų skaičių, griežtai rekomenduojamas bendras tiriamųjų gyvūnų skaičius turi būti ne mažesnis už 20, kontrolinių – ne mažesnis už 10.

1.5.1.2.3. Dozių lygiai

Kiekvienam indukciniam poveikiui naudojama gerai organizmo toleruojama didžiausia tiriamosios medžiagos koncentracija, sukelianti nuo silpno iki vidutinio stiprumo odos sudirginimą. Provokaciniam poveikiui naudojama didžiausia nedaranti odos tiriamosios medžiagos koncentracija. Jeigu būtina, tinkamos koncentracijos nustatomos parengtiniu tyrimu, naudojant du ar tris gyvūnus. Šiam tikslui galima būtų panaudoti ir FPA paveiktus gyvūnus.

1.5.1.3. Procedūra

1.5.1.3.1. Indukcija

0 diena – tiriamoji grupė

Menčių srityje atliekamos 0,1 ml tūrio trys poros įodinių injekcijų. Menčių srityje kailis pašalinamas taip, kad kiekvienos poros dalis yra kitoje nugaros vidurio pusėje.

1 injekcija: FPA/vandens ar fiziologinio tirpalo mišinys santykiu 1:1

2 injekcija: tiriamosios medžiagos, ištirpintos tinkamame tirpiklyje, pasirinkta koncentracija

3 injekcija: tiriamosios medžiagos pasirinkta koncentracija, pagaminta panaudojant mišinį -FP A/vanduo ar fiziologinis tirpalas santykiu 1:1.

Ruošiant 3 injekciją, vandenyje tirpios medžiagos tirpinamos vandenyje, po to maišomos su FPA. Kai medžiagos tirpios riebaluose ir netirpios vandenyje, pirmiausia padaroma suspensija su FPA, po to įpilama vandens. Tiriamosios medžiagos galutinė koncentracija turi būti tokia pati, kaip ir antrojoje injekcijoje.

▼B

1 ir 2 injekcijos suleidžiamos arčiau galvos viena šalia kitos, tuo tarpu 3 injekcija suleidžiama arčiau uodegos esančiame tiriamajame plote.

0 diena – kontrolinė grupė

Tose pat vietose kaip ir tiriamiesiems gyvūnams atliekamos 0,1 ml tūrio trys poros įodinių injekcijų.

1 injekcija: FPA/vandens ar fiziologinio tirpalo mišinys santykiu 1:1

2 injekcija: neskiestas tirpiklis

3 injekcija: tirpiklio 50 % tirpalas, pagamintas panaudojant mišinį – FP A/vanduo ar fiziologinis tirpalas santykiu 1:1.

5–7 diena – tiriamoji ir kontrolinės grupės

Jeigu tiriamoji medžiaga nedirgina odos, apytikriai 24 valandas prieš antodines indukcinės aplikacijos, nuo tų pačių odos plotelių nukirpus ir (ar) nuskutus kailį, tepamas 0,5 ml 10 % natrio laurilo sulfato tirpalas vazeline (siekiant sukelti vietinį dirginimą).

6–8 diena – tiriamoji grupė

Nuo tiriamojo ploto vėl pašalinamas kailis. Filtravimo popierius (2 × 4 cm) sudrėkinamas (padengiamas) tiriamąja medžiaga, ištirpinta tirpiklyje, uždedamas ant tiriamojo ploto ir fiksuojamas okliuzine (nepralaidžia) tvarstomąja medžiaga 48 valandoms. Tirpiklio pasirinkimą reikia pagrįsti. Kietosios medžiagos yra susmulkinamos ir sumaišomos tirpiklyje. Skysčiai gali būti naudojami neskiesti.

6-8 diena – kontrolinė grupė

Nuo tiriamojo ploto vėl pašalinamas kailis. Viskas atliekama tai pat kaip ir tiriamojoje grupėje, vietoj tiriamosios medžiagos naudojant tirpiklį; vėliau viskas fiksuojama okliuzine (nepralaidžia) tvarstomąja medžiaga 48 valandoms.

1.5.1.3.2. Provokacija

20–22 diena – tiriamoji ir kontrolinė grupės

Nuo tiriamųjų ir kontrolinių gyvūnų šonų pašalinamas kailis. Lopas, sudrėkintas (padengtas) tiriamąja medžiaga, uždedamas ant vieno šono odos plotelio. Jeigu reikia, ant kito šono uždedamas lopas, sudrėkintas tirpikliu. Lopas yra fiksuojamos okliuzine tvarstomąja medžiaga 24 valandoms.

1.5.1.3.3. Stebėjimas ir vertinimas: tiriamoji ir kontrolinė grupės

— praėjus maždaug 21 valandai po lopo nuėmimo, provokacinis plotas nuvalomas, nukerpamas ir (arba) nuskutamas, o jeigu būtina, depiliuojamas,

— maždaug po 3 valandų (praėjus maždaug 48 valandoms nuo provokacinės aplikacijos pradžios) apžiūrima odos reakcija ir įvertinama balais, taip kaip paaiškinta priede,

— praėjus maždaug 24 valandoms po šio apžiūrėjimo, odos reakcija apžiūrima antrą kartą (72 valandos) ir įvertinama balais.

Skatinamas tiriamųjų ir kontrolinių gyvūnų vertinimas aklu būdu.

Jeigu būtina išryškinti pirmoje provokacijoje pastebėtus rezultatus, praėjus maždaug vienai savaitei, atliekama antra provokacija (t. y. reprovokacija) su atitinkama nauja kontrolės grupe. Reprovokaciją taip pat galima atlikti su pradine kontroline grupe.

▼B

Dėl indukcinų ir provokacinių procedūrų kilusios visos odos ir bet kokios neįprastos, taip pat ir somatinės, reakcijos, stebimos ir įvertinamos pagal Magnussono/Kligmano skalę (žiūrėti priedą). Kitos procedūros, pvz., histopatologinis tyrimas, odos raukšlės sustorėjimo matavimas, gali būti atliekamos tik išryškėjus neaiškioms reakcijoms.

1.5.2. *Buehlerio tyrimas*

1.5.2.1. Pasiruošimas

Sveikos jaunos suaugusios jūros kiaulytės mažiausiai 5 dienas prieš tyrimą aklimatizuojamos laboratorijos sąlygomis. Gyvūnai prieš tyrimą atsitiktinės atrankos būdu paskirstomi į tyrimo grupes. Kailis gali būti pašalinamas žirkklėmis, skutimu ar chemine depiliacija, stengiantis išvengti odos įbrėžimų. Gyvūnai pasveriami prieš tyrimo pradžią ir jo pabaigoje.

1.5.2.2. Tyrimo sąlygos

1.5.2.2.1. Tiriamieji gyvūnai

Naudojamos baltų jūros kiaulyčių įprastinės linijos.

1.5.2.2.2. Skaičius ir lytis

Gali būti naudojami patinai ir (arba) patelės. Patelės turi būti nevedusios jauniklių ir nepastojusios.

Mažiausiai 20 gyvūnų naudojama tiriamojoje ir mažiausiai 10 gyvūnų kontrolinėje grupėse.

1.5.2.2.3. Dozių lygiai

Kiekvienam indukciniam poveikiui naudojama didžiausia tiriamosios medžiagos koncentracija, sukelianti silpną ne pernelyg didelį odos sudirginimą. Provokaciniam poveikiui naudojama didžiausia nedirginanti odos tiriamosios medžiagos koncentracija. Jeigu būtina, tinkamos koncentracijos nustatomos parengtiniu tyrimu, naudojant du ar tris gyvūnus.

Vandenyje tirpioms tiriamosioms medžiagoms tirpikliu naudojamas vanduo ar atskiestas nedirginantis ploviklio (detergento) tirpalas. Kitoms tiriamosioms medžiagoms indukcijai tirpikliu naudojamas 80 % etanolis, o provokacijai acetonas.

1.5.2.3. Procedūra

1.5.2.3.1. Indukcija

0 diena – tiriamoji grupė

Nuo vieno gyvūno šono pašalinamas kailis. Tyrimui naudojamas lopus turi būti pilnai prisigėręs tiriamosios medžiagos, ištirpintos tirpiklyje (tirpiklio pasirinkimą reikia pagrįsti; skystos tiriamosios medžiagos gali būti neskiedžiamos).

Tyrimui naudojamas lopus (kompresas) pridedamas prie bandomojo ploto ir 6 h laikomas prispaustas prie odos okliuziniu lopu arba gaubtelio ir tinkama tvarstomąja medžiaga.

▼B

Tyrimui naudojamas lopus turi būti okliuzinis. Jam tinka vatos sluoksnis, jis gali būti apvalus ar kvadratinis, maždaug 4-6 cm . Nepralaidi medžiaga geriausiai užtikrina okliuziją. Naudojant kitokią medžiagą, lopą reiktų ilgiau laikyti.

0 diena – kontrolinė grupė

Nuo vieno gyvūno šono pašalinamas kailis. Viskas atliekama tai pat kaip ir tiriamojoje grupėje, vietoj tiriamosios medžiagos naudojant tik tirpiklį. Tyrimui naudojamas lopus fiksuojamas tinkama tvarstomąja medžiaga 6 valandoms. Jeigu parodoma, kad imitacinė kontrolinė grupė nebūtina, gali būti naudojama paprasta kontrolinė grupė.

6–8 ir 13–15 diena – tiriamoji ir kontrolinė grupė

6–8 ir 13–15 dienomis ant to paties šono tiriamojo ploto (jei būtina, pašalinus kailį) atliekamos tokios pačios pakartotinos aplikacijos kaip ir 0 dieną.

1.5.2.3.2. Provokacija

27–29 diena – tiriamoji ir kontrolinė grupė

Nuo netirto tiriamųjų ir kontrolinių gyvūnų šono pašalinamas kailis. Ant tiriamųjų ir kontrolinių gyvūnų užpakalinio netirto šono dedamas prisigėręs reikiamo kiekio tiriamosios medžiagos okliuzinis lopus. Medžiaga turi būti didžiausios nedirginančios koncentracijos.

Kada reikia, ant tiriamųjų ir kontrolinių gyvūnų priekinio netirto šono dedamas okliuzinis lopus, prisigėręs tik tirpiklio. Viskas fiksuojama tinkama tvarstomąja medžiaga 6 valandoms.

1.5.2.3.3. Stebėjimas ir vertinimas

— praėjus maždaug 21 valandai po lopo nuėmimo, nuo provokacinio ploto pašalinamas kailis,

— maždaug po 3 valandų (praėjus maždaug 30 valandų nuo provokacinės aplikacijos) apžiūrima odos reakcija ir įvertinama balais, taip kaip paaiškinta priede,

— praėjus maždaug 24 valandoms po 30 valandų apžiūrėjimo (maždaug 54 valandoms po provokacinės aplikacijos), odos reakcija apžiūrima antrą kartą ir įvertinama balais.

Skatinamas tiriamųjų ir kontrolinių gyvūnų vertinimas akluoju būdu.

Jeigu būtina išryškinti pirmoje provokacijoje pastebėtus rezultatus, praėjus maždaug vienai savaitei, atliekama antra provokacija (t. y. reprovokacija) su atitinkama nauja kontrolės grupe. Reprovokaciją taip pat galima atlikti su pradine kontrole grupe.

▼B

Dėl indukcinų ir provokacinių procedūrų kilusios visos odos ir bet kokios neįprastos, tame tarpe somatinės, reakcijos, stebimos ir įvertinamos pagal Magnussono/Kligmano skalę (žiūrėti priedėlį). Kitos procedūros, pvz., histopatologinis tyrimas, odos raukšlės sustorėjimo matavimas, gali būti atliekamos tik išryškėjus neaiškioms reakcijoms.

2. **DUOMENYS (JKMT IR BUEHLERIO)**

Duomenys turi būti pateikti lentelės forma, parodant kiekvieno gyvūno odos reakciją kiekvieno stebėjimo metu.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS (JKMT IR BUEHLERIO)**

Jeigu prieš bandymą su jūrų kiaulytėmis buvo atliktas atrankos tyrimas, jo aprašymas ir šaltiniai (pvz., vietinio limfinio mazgo tyrimas, pelės akies patinimo tyrimas) turi būti pateikiami kartu su tiriamosios ir kontrolinės medžiagų gautais rezultatais.

Tyrimo ataskaita (JKMT ir Buehlerio)

Tyrimo ataskaitoje turėtų būti ši informacija.

Tiriamieji gyvūnai:

- panaudotos jūrų kiaulyčių linijos,
- skaičius, amžius ir gyvūnų lytis,
- gavimo šaltinis, laikymo sąlygos, pašarai ir kt.,
- kiekvieno gyvūno kūno masė tyrimo pradžioje.

Tyrimo sąlygos:

- ploto aplikacijai paruošimo technika,
- detalės apie lopui panaudotas medžiagas ir techniką,
- atrankos tyrimo rezultatai su išvada apie indukcijai ir provokacijai naudotinas koncentracijas,
- detalės apie tiriamosios medžiagos paruošimą, aplikaciją ir nuėmimą,
- tirpiklio parinkimo pagrindimas,
- tirpiklio ir tiriamosios medžiagos koncentracijos, naudotos indukcijai ir provokacijai poveikiui bei bendras medžiagos kiekis, sunaudotas indukcijai ir provokacijai.

Rezultatai:

- rezultatų suvestinė su paskutiniu jautrumo ir patikimumo patikrinimu (žr. 1.3), be to, informacija apie panaudotą medžiagą, koncentraciją ir tirpiklį,

▼B

- kiekvieno gyvūno įvertinimas balais kartu su vertinimo sistema,
- sukeltų poveikių prigimties ir laipsnio pasakojamasis aprašymas,
- histopatologiniai duomenys.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

4. **LITERATŪRA**

Šis metodas yra analogiškas EBPO 406 tyrimo gairėms.

▼B

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

▼B**B.7. PAKARTOTINĖS DOZĖS (28 DIENŲ) TOKSIŠKUMAS (PER VIRŠKINAMĄJĮ TRAKTĄ)****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žiūrėti Bendrojo įvado B dalį.

1.2. SĄVOKOS

Žiūrėti Bendrojo įvado B dalį.

1.3. TIRIAMOJO METODO PRINCIPAS

Tiriamosios medžiagos dozės duodamos 28 dienas kasdien paeiliui kelioms eksperimentinių gyvūnų grupėms – po vieną dozės lygį vienai grupei. Kiekvieną dieną medžiagos davimo periodu gyvūnai atidžiai stebimi toksiškumo požymiams nustatyti. Tyrimo metu žuvę arba nužudyti gyvūnai skrodžiami, o tie, kurie išgyveno, nužudomi ir skrodžiami tyrimo pabaigoje.

Šio tiriamojo metodo specifinis tikslas yra medžiagos neurologinio poveikio nustatymas, o tai reikalauja labai atidžių gyvūnų klinikinių stebėjimų. Šis metodas nustato potencialiai neurotoksinius chemikalus, kas sąlygoja vėlesnius tyrimus šiuo aspektu. Be to šis metodas gali suteikti duomenų apie medžiagos imunologinį poveikį bei poveikį reproduktivumui.

1.4. TIRIAMOJO METODO APRAŠYMAS**1.4.1. Pasiruošimas**

Sveiki jauni suaugę gyvūnai atsitiktinės atrankos principu suskirstomi į kontrolinę ir tiriamąsias grupes. Galimas narvų išdėstymo poveikis tyrimo rezultatams turėtų būti minimalus. Kiekvienas gyvūnas individualiai pažymimas ir mažiausiai 5 dienas prieš tyrimą aklimatizuojamas narvuose laboratorijos sąlygomis.

Tiriamoji medžiaga leidžiama zonu arba duodama su pašarais ar geriamu vandeniu. Medžiagos patekimo į virškinamąjį traktą kelias priklauso nuo tyrimo tikslų bei fizikinių ir cheminių medžiagos savybių.

Jeigu būtina, tiriamoji medžiaga yra ištirpinama arba padaroma jos suspensija tirpiklyje. Pirmiausia rekomenduojamas vandens tirpalas/suspensija, esant svarioms priežastims naudojamas aliejaus (pvz., kukurūzų) tirpalas/suspensija ir tik po to galimi tirpalai kituose tirpikliuose. Naudojamo tirpiklio (ne vandens) toksinės savybės turi būti žinomos. Turėtų būti nustatytas tiriamosios medžiagos pastovumas tirpiklyje.

1.4.2. Tyrimo sąlygos**1.4.2.1. Tiriamieji gyvūnai**

Nors gali būti naudojamos ir kitos graužikų rūšys, pirmenybė teikiama žiurkėms. Naudojamos jaunų sveikų suaugusių gyvūnų įprastos laboratorinės linijos. Patelės turi būti nevedę jauniklių ir nepastojusios. Medžiagos dozavimas prasideda tuoj po nujunkymo, bet ne vėliau nei gyvūnams sueina devynios savaitės.

▼B

Tyrimo pradžioje gyvūnų kūno masės skirtumai turi būti minimalūs ir neviršyti tos lyties kūno masės vidurkio $\pm 20\%$.

Jeigu prieš ilgalaikį atliekamas preliminarinis pakartotinos dozės per virškinamąjį traktą tyrimas, abiejuose tyrimuose naudojami gyvūnai turi būti tos pačios linijos ir gauti iš to paties šaltinio.

1.4.2.2. *Skaičius ir lytis*

Kiekvienam dozės lygiui turėtų būti panaudota mažiausiai 10 gyvūnų (penki patinai ir penkios patelės). Jeigu bandymo eigoje planuojamas dalies gyvūnų žudymas, tai pradinis jų skaičius turėtų būti tiek pat padidintas.

Tam, kad 14 dienų po dozavimo būtų galima tirti toksinių poveikių grįžtamumą, pastovumą ar uždelstumą gali būti sudaryta papildoma 10 gyvūnų grupė (po penkis kiekvienos lyties gyvūnus), 28 dienas gaunanti didelę medžiagos dozę. Tokiais atvejais naudojama ir papildoma 10 gyvūnų kontrolinė grupė (po penkis kiekvienos lyties gyvūnus).

1.4.2.3. *Dozių lygiai*

Iš viso turėtų būti panaudotos mažiausiai trys tiriamosios ir viena kontrolinė grupės. Su kontrolinės grupės gyvūnais reikia elgtis lygiai taip pat kaip ir su tiriamaisiais gyvūnais, išskyrus tai, kad jie negauna tiriamosios medžiagos. Jeigu duodant tiriamąją medžiagą naudojamas tirpiklis, kontrolinė grupė turėtų gauti didžiausią tiriamojėje grupėje panaudotą tirpiklio tūrį.

Jeigu įvertinus turimus duomenis, nesitikima jokio 1 000 mg/kg k. m./d medžiagos dozės poveikio, galima atlikti ribinį bandymą. Jeigu dozių nustatymui nėra tinkamų duomenų, galima atlikti papildomus tyrimus.

Dozės lygius reikia parinkti atsižvelgiant į jau turimus tiriamosios ar jai giminingos medžiagos toksiškumo ir (toksiko-) kinetinius duomenis. Pasirinktas aukščiausias dozės lygis turi sukelti toksinius poveikius, tačiau nesukelti gyvūno žūties ar nepakeliamų kančių. Kiti mažesni dozių lygiai turėtų sukelti atitinkamai mažesnius pokyčius (atsakus), o mažiausias dozės lygis turi turėti nepastebimą neigiamą poveikį (NNPL). Mažėjančia tvarka einantys dozių lygiai vienas nuo kito turėtų skirtis du-keturis kartus, tik ketvirtai papildomai tiriamajai grupei dažnai parenkamas didesnis intervalas tarp dozių (pvz., faktoriškai didesnis negu 10).

Tiriamosios medžiagos, duodamos su pašarais ar geriamu vandeniu turi netrukdyti normaliam gyvūnų maitinimuisi ar vandens balansui. Kai tiriamoji medžiaga duodama su pašarais, jos dozė gali būti išreiškiama kaip pastovi pašarų koncentracija (ppm) arba kaip pastovus dozės lygis gyvūno kūno masės vienetui; kitus pasirinktus dozės išraiškos būdus reikėtų tiksliai apibrėžti. Zondu medžiagas reikia suleisti kasdien tuo pačiu laiku, be to, medžiagos dozės lygis gyvūno kūno masės vienetui turėtų būti pastovus.

Jeigu prieš ilgalaikį atliekamas preliminarus pakartotinos dozės tyrimas, abiejuose tyrimuose gyvūnams turi būti duodami panašūs pašarai.

▼B1.4.2.4. *Ribinis bandymas*

Jeigu vieno dozės lygio, ne žemesnio negu 1 000 mg/kg k. m./d, ir atitinkamo procento pašaruose ar geriamame vandenyje (nustatant pagal gyvūno kūno masę, gaunant su pašarais ar geriamu vandeniu), tyrimas nesukelia pastebimų toksinių poveikių ir jeigu iš turimų duomenų apie struktūriškai panašias medžiagas nesitikima toksiškumo, pilnas trijų dozių lygių tyrimas nebūtinas. Ribinis bandymas neatliekamas tais atvejais, kai nustatant poveikį žmogui, reikia naudoti didesnes dozes.

1.4.2.5. *Stebėjimo periodas*

Stebėjimo periodas turėtų trukti 28 dienas. Papildoma gyvūnų grupė dar mažiausiai 14 dienų po tiriamosios medžiagos gavimo galėtų būti stebima, nustatant poveikių uždelstumą, pastovumą ar atsigavimą nuo jų.

1.4.3. **Procedūra**

Gyvūnams tiriamoji medžiaga duodama 28 dienas kasdien septynias dienas savaitėje; jeigu laikomasi penkių dienų savaitėje režimo, tai reikia pagrįsti. Vienkartinė tiriamosios medžiagos dozė suleidžiama zondų, naudojant skrandžio vamzdelį ar tinkamą intubavimo (įleidimo) kaniulę. Maksimalus vienkartinis suleidžiamo skysčio tūris priklauso nuo tiriamojo gyvūno dydžio. Tiriamosios medžiagos tirpalo tūris neturi viršyti 1 ml/100 g kūno masės, tačiau naudojant vandeninį tiriamosios medžiagos tirpalą galima suleisti 2 ml/100 g kūno masės. Dirginamųjų ir ardančiųjų medžiagų, kurių didelės koncentracijos sukelia sunkius poveikius, tūrio svyravimai turi būti minimalūs.

1.4.3.1. *Bendri stebėjimai*

Bendrus klinikinius stebėjimus reikia atlikti mažiausiai kartą per dieną geriausiai – tuo pačiu dienos metu, atsižvelgiant į laukiamų poveikių piką. Gyvūnų sveikatos būklę reikia registruoti. Mažiausiai du kartus per dieną visi gyvūnai turėtų būti patikrinami – ar sveiki, ar nepadvėsę. Dvesiantys ar patiriantys dideles kančias ir skausmą gyvūnai turi būti iškeliami iš narvų, pažymimi, humaniškai nužudomi ir skrodžiami.

Prieš viso tyrimo pradžią atliekami atidesni klinikiniai visų gyvūnų stebėjimai (individo palyginimui), o vėliau mažiausiai kartą per savaitę. Kiekvieną kartą šie stebėjimai atliekami tuo pačiu metu, perkėlus gyvūną iš narvo į tam skirtą vietą. Geriausia, kai stebėjimai yra kruopščiai registruojami pagal toje laboratorijoje tiksliai apibūdintą vertinimo sistemą. Tyrimo aplinkybių svyravimas turi būti minimalus ir stebėtojai apie tyrimą turėtų nežinoti. Stebėjimo metu nereikėtų apsiriboti odos, kailio, akių, gleivinės pakitimų, išskyrų atsiradimų, autonominio aktyvumo (pvz., ašarojimo, plaukų pašaušimo, vyzdžio dydžio, neįprastų kvėpavimo pakitimų) registravimu. Reikėtų registruoti eisenos, pozos, reakcijos į paėmimą rankomis pakitimus, kloninių ar toninių judesių atsiradimą bei stereotipinių (pvz., besaikį valymąsi, pasikartojantį sukimąsi ratu) ar keistą (pvz., savęs luošinimą, vaikščiojimą atbulomis) elgesį.

▼ B

Ketvirtą poveikio savaitę turėtų būti įvertintas juntamasis reaktyvumas į skirtingų tipų stimulą (pvz., klausos, regėjimo ir proprioceptorinį), jėgos (spaudimo) stiprumas bei judamasis aktyvumas. Procedūrų papildomos detalės pateiktos Bendrojo įvado B dalyje.

Jeigu prieš subchroninį (90 dienų) atliekamas preliminarinis pakartotinos dozės tyrimas, funkciniai stebėjimai ketvirtą savaitę gali būti neatliekami. Tokiu atveju šie stebėjimai atliekami subchroninio tyrimo metu. Iš kitos pusės, tokie funkciniai stebėjimai pakartotinos dozės tyrime padidina galimybę geriau parinkti dozių lygius tolesniam subchroniniam tyrimui.

Išimtiniais atvejais funkciniai stebėjimai neatliekami ir tose grupėse, kuriose toksiškumo požymiai nustatomi tokio laipsnio, kad reikšmingai trukdo funkciniam tyrimams.

1.4.3.2. *Kūno masė ir maisto/vandens suvartojimas*

Visus gyvūnus mažiausiai vieną kartą per savaitę reikia pasverti. Mažiausiai vieną kartą per savaitę reikia išmatuoti maisto ir vandens suvartojimą. Jeigu tiriama medžiaga yra duodama su geriamu vandeniu, vandens suvartojimas taip pat turi būti išmatuojamas neregčiau kaip kartą per savaitę.

1.4.3.3. *Hematologija*

Tyrimo pabaigoje nustatoma: hematokritas, hemoglobino koncentracija, eritrocitų kiekis, bendras ir atskiras leukocitų kiekis, trombocitų kiekis ir kraujo krešėjimo laikas/potencialas.

Kraujo pavyzdžius reikėtų paimti iš nurodomų vietų dar prieš arba gyvūnų žudymo metu ir saugoti atitinkamomis sąlygomis.

1.4.3.4. *Klinikinė biochemija*

Tam, kad ištirti pagrindinius toksinius poveikius audiniams, o ypač inkstams ir kepenims, dar prieš arba gyvūnų žudymo metu (neskaitant dvesiančių gyvūnų ar nužudytų bandymo metu), reikėtų atlikti kraujo klinikinius biocheminius tyrimus. Prieš kraujo pavyzdžių paėmimą rekomenduojama iš vakaro gyvūnams badauti ⁽¹⁾. Kraujo plazmoje arba serume tiriama: natris, kalis, bendras cholesterolis, šlapalas, kreatininas, bendras baltymas ir albuminas, mažiausiai du fermentai, rodantys poveikį kepenų ląstelėms (tokie kaip alaninaminotransferazė, aspartataminotransferazė, šarminė fosfatazė, gamaglutamiltranpeptidazė ir sorbitoldehidrogenazė). Tam tikromis aplinkybėmis papildomi fermentų (hepatinės ar kitos kilmės) ir tulžies rūgščių tyrimai gali suteikti naudingos informacijos.

Jeigu paskutinę tyrimų savaitę atliekami neprivalomi šlapimo tyrimai, jis surenkamas per nurodytą laiko tarpą bei nustatoma: šlapimo tūris, išvaizda, kvapas, lyginamasis svoris, pH, baltymai, gliukozė ir kraujo ląstelės.

⁽¹⁾ Kai kuriems serumo ir plazmos tyrimams, ypač gliukozės, ypač svarbus gyvūnų badavimas iš vakaro. Maistą gaunant, neišvengiami rodiklių svyravimai, o tai apsunkina duomenų interpretavimą. Tačiau iš kitos pusės šis badavimas gali pakeisti gyvūnų bendrą medžiagų apykaitą, o mitybos tyrimuose tai ypač gali pakeisti tiriamosios medžiagos poveikį. Klinikiniai biocheminiai tyrimai turi būti atliekami tik ketvirtą tyrimų savaitę atlikus funkcinis stebėjimus.

▼B

Galima atlikti papildomus serumo rodiklių, rodančių pagrindinių audinių pažeidimus, tyrimus. Jeigu žinomas ar įtariamas tiriamosios medžiagos poveikis organizmo medžiagų apykaitai, galima tirti kalcį, fosforą trigliceridus badavus, specifinius hormonus, methemoglobina bei cholinesterazę. Tam tikrų grupių medžiagoms arba pastebėjus kai kuriuos neigiamus pakitimus tokie tyrimai būtini.

Naudojamos gyvūnų rūšys, pastebėti ir (ar) laukiami tiriamos medžiagos sukelti pokyčiai verčia lanksčiai pasirinkti tiriamuosius rodiklius.

Jeigu turimi duomenys apie medžiagą yra prieštaringi, pagrindinį dėmesį dar prieš dozavimo pradžią reikėtų kreipti į hematologinių ir klinikinių biocheminių kintamųjų nustatymo kokybę.

1.4.3.5. *Bendrasis skrodimas*

Kiekvienas tiriamasis gyvūnas turi būti skrodžiamas, atidžiai ištiriamas jo kūno paviršius bei visos jo angos, kaukolė, krūtinės ląsta, pilvo ertmės bei jų turinys. Vengiant išdžiuvimo, visų gyvūnų kepenys, inkstai, antinksčiai, sėklidės, prielipai, užkrūčio liauka, blužnis, smegenys bei širdis turi būti nuvalyti nuo prigludusių pašalinių audinių ir kuo greičiau pasverti.

Audinius reikia konservuoti geriausiai jiems tinkamoje fiksavimo terpėje. Histopatologiškai reikėtų ištirti visus bendruosius pakencimus, smegenis (jų būdingiausias dalis – didžiausias smegenis, smegenėles ir smegenų tiltą), nugaros smegenis, skrandį, mažąsias ir didžiausias žarnas (taip pat Peyerio plokšteles), kepenis, inkstus, antinksčius, blužnį, širdį, užkrūčio liauką skydliaukę, trachėją ir plaučius (pripučiant fiksuojamosios medžiagos, o po to panardinant), lytines liaukas, papildomus lytinius organus (pvz., gimdą, prostatą), šlapimo pūslę, limfinius mazgus (vienas limfinis mazgas turėtų atspindėti medžiagos patekimo kelią o kitas, esantis tolėliau, turėtų atspindėti sisteminius poveikius), esantį arčiau raumens periferinį nervą (sėdimąjį arba blauzdikaulio) bei kaulų čiulpų dalį (arba šviežiai paruoštą kaulų čiulpų punkciją). Gauti klinikiniai ir kitokie duomenys gali pareikalausiti ištirti papildomus audinius. Be to, turėtų būti konservuojami visi numanomi tiksliniai organai.

1.4.3.6. *Histopatologinis ištyrimas*

Visų kontrolinės ir didžiausios dozės grupių gyvūnų organus ir audinius reikia visiškai histopatologiškai ištirti. Jeigu didžiausios dozės gyvūnų grupėje dėl medžiagos poveikio kilo pakitimai, histopatologiškai ištirti galima ir kitų grupių gyvūnus.

Visus bendruosius pakencimus reikia ištirti.

Papildomos grupės gyvūnų pakentus audinius ir organus taip pat reikia histopatologiškai ištirti.

2. **DUOMENYS**

Turėtų būti pateikiami kiekvieno gyvūno duomenys. Be to visi duomenys turėtų būti sutraukti į lenteles, pateikiant kiekvienos tiriamosios grupės gyvūnų skaičių tyrimų pradžioje, padvėsusių gyvūnų ar tyrimo metu humaniškumo sumetimais nužudytų bei gyvūnų su toksinio poveikio požymiais skaičių, kiekvienos žūties ar nužudymo laiką, pastebėtų toksinio poveikio požymių apibūdinimą, tame tarpe jų pasireiškimo pradžią, trukmę ir sunkumo laipsnį, gyvūnų su pakencimais skaičių, pakencimų tipą ir gyvūnų su įvairių tipų pakencimais procentą.

▼B

Jeigu įmanoma, skaitmeniniai rezultatai turėtų būti apdoroti tinkamai ir priimtinais statistiniais metodais. Statistiniai metodai turėtų būti pasirinkti planuojant tyrimą.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

Tyrimo ataskaita

Tyrimo ataskaitoje turėtų būti ši informacija:

Tiriamieji gyvūnai:

- panaudotos rūšys/linijos,
- gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,
- gavimo šaltinis, laikymo sąlygos, pašarai ir kt.,
- kiekvieno gyvūno kūno masė tyrimo pradžioje, kiekvieną savaitę ir tyrimo pabaigoje.

Tyrimo sąlygos:

- pagrindimas, jeigu tirpikliu pasirinktas ne vanduo,
- dozių lygių parinkimo paaiškinimas,
- detalės apie tiriamosios medžiagos mišinio su pašarais paruošimą, preparato gauta koncentracija, pastovumas ir homogeniškumas,
- poveikio tiriamąja medžiaga detalės,
- perskaičiavimas tiriamosios medžiagos koncentracijos maiste/-vandenyje (ppm) į faktinę dozę (mg/kg k. m./d), jeigu įmanoma,
- maisto ir vandens kokybė.

Rezultatai:

- kūno masė/kūno masės pokyčiai,
- maisto ir vandens suvartojimas, jeigu įmanoma,
- duomenys apie atsaką į toksinį poveikį, taip pat ir toksiškumo požymius, pagal lytį ir dozės lygį,
- klinikinių stebėjimų tipas, sunkumo laipsnis ir trukmė (kurie grįžtami, kurie ne),
- juntamojo aktyvumo, spaudimo (jėgos) stiprumo ir judamojo aktyvumo įvertinimas,
- hematologiniai tyrimai su svarbiausiomis palyginamosiomis reikšmėmis;
- klinikiniai biocheminiai tyrimai su svarbiausiomis palyginamosiomis reikšmėmis,
- kūno masė nužudymo metu bei organų masė,
- skrodimo duomenys,
- visų histopatologinių duomenų smulkus aprašymas,
- absorbcijos duomenys, jeigu yra,
- statistinis rezultatų apdorojimas ten, kur tinka.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

4. **LITERATŪRA**

Šis metodas yra analogiškas EBPO 407 tyrimo gairėms.

▼B**B.8. KARTOTINIŲ DOZIŲ (28 DIENOS) TOKSIŠKUMAS (INHALIACINIS)****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Naudinga turėti išankstinę informaciją apie medžiagos dalelių dydžio pasiskirstymą, garų slėgį, lydymosi temperatūrą, virimo temperatūrą, pliūpsnio temperatūrą ir sprogumą (atitinkamais atvejais).

Taip pat žr. bendrąją įvadinę B(A) dalį.

1.2. SĄVOKOS

Žr. bendrąją įvadinę B(B) dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Kelios eksperimentinių gyvūnų grupės kiekvieną dieną apibrėžtu laikotarpiu yra paveikiamos tiriamąja medžiaga suskirstytomis koncentracijomis, viena koncentracija naudojama vienai grupei 28 dienas. Jeigu tirpiklis naudojamas tam, kad būtų lengviau gaunama atitinkama tiriamosios medžiagos koncentracija aplinkoje, turėtų būti naudojama kontrolinė tirpiklio grupė. Medžiagos įvedimo laikotarpiu gyvūnai stebimi kiekvieną dieną toksiškumo požymiams nustatyti. Gyvūnams, kurie nugaišta bandymo metu, atliekama autopsija, o bandymui pasibaigus, išlikusiems gyviems gyvūnams daroma autopsija.

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 randomizuojami ir suskirstomi į reikalingą skaičių grupių. Tam tikrais atvejais į tiriamąją medžiagą gali būti dedama atitinkamo tirpiklio, kad būtų lengviau gaunama atitinkama medžiagos koncentracija aplinkoje. Jeigu tirpiklis arba kiti priedai naudojami dozavimui palengvinti, turi būti žinoma, kad jie nesukelia toksiško poveikio. Atitinkamais atvejais gali būti naudojami ankstesnių bandymų duomenys.

1.6.2. Bandymo sąlygos**1.6.2.1. Eksperimentiniai gyvūnai**

Jeigu nėra kontraindikacijų, pirmenybė atiduodama žiurkėms. Naudojamos įprastų laboratorinių veislių jauni, sveiki gyvūnai.

Bandymą užbaigus naudotų gyvūnų svorio pokyčiai neturėtų viršyti $\pm 20\%$ atitinkamo vidutinio svorio.

▼B1.6.2.2. *Skaičius ir lytis*

Kiekvienoje bandymo grupėje turėtų būti naudojama ne mažiau 10 gyvūnų (penkios patelės ir penki patinėliai). Patelės turėtų būti neturėjusios jauniklių ir būti nevaikingos. Jeigu planuojami tarpiniai nužudymai, gyvūnų skaičius turėtų būti padidinamas tokiu gyvūnų skaičiumi, kuris buvo planuojamas nužudyti iki bandymo pabaigos. Be to, papildoma 10 gyvūnų grupė (po penkis kiekvienos lyties gyvūnus) gali būti paveikiama didele koncentracija 28 dienas ir po poveikio 14 dienų stebimi toksinių poveikių grįžtamumo, stabilumo arba uždelsto atsiradimo požymiai. Taip pat naudojama papildoma kontrolinė 10 gyvūnų grupė (po penkis kiekvienos lyties gyvūnus).

1.6.2.3. *Poveikio koncentracija*

Turi būti ne mažiau kaip trys tiriamosios medžiagos koncentracijos ir viena kontrolinė arba tirpiklio kontrolinė grupė (atitinkanti didžiausios dozės tirpiklio koncentraciją), jeigu naudojamas tirpiklis. Išskyrus tuos atvejus, kai paveikiama tiriamąja medžiaga, su kontrolinės grupės gyvūnais turėtų būti elgiamasi visiškai taip pat, kaip su bandomosios grupės gyvūnais. Didžiausia koncentracija turėtų sukelti toksiškumo, poveikį, bet neturi būti mirštamumo arba tik kelių tokių atvejų priežastimi. Mažiausia koncentracija neturėtų sukelti jokio toksiškumo požymio. Jeigu yra praktinis poveikio žmogui įvertinimas, mažiausia dozė jį turėtų viršyti. Geriausia, jeigu vidurinė dozė galėtų sukelti mažiausius pastebimus toksiškumo poveikius. Jeigu naudojama daugiau negu viena tarpinė dozė, dozės turėtų būti išskirstomos intervalais taip, kad toksiškus poveikius būtų galima grupuoti. Mažų ir tarpinių dozių bei kontrolinėje grupėje žūties atvejų paplitimas turėtų būti nedidelis, kad būtų galima prasmingai įvertinti rezultatus.

1.6.2.4. *Poveikio trukmė*

Kiekvienos dienos poveikio trukmė turėtų būti šešios valandos, bet gali būti reikalingi kitokie laikotarpiai, kad atitiktų specialius reikalavimus.

1.6.2.5. *Įrenginiai*

Gyvūnai turėtų būti bandomi inhaliacinėje įrangoje, sukonstruotoje taip, kad būtų išlaikomas dinaminis oro srautas, kuriam esant per valandą oras pasikeičia ne mažiau kaip 12 kartų, užtikrinant pakankamą deguonies kiekį ir vienodą poveikio atmosferos pasiskirstymą. Jeigu naudojama kamera, ji turėtų būti taip suprojektuota, kad bandomieji gyvūnai nesibūriuotų ir kad įkvepiant tiriamosios medžiagos būtų kiek įmanoma padidintas poveikis. Paprastai, norint užtikrinti kameros atmosferos pastovumą, visas bandomųjų gyvūnų „tūris“ neturėtų viršyti 5 proc. bandymo kameros tūrio. Gali būti naudojamas burnos ir nosies, tik galvos arba atskirai viso kūno poveikis kameroje; du pirmieji sumažins kitais dviem atvejais sunaudojamą kiekį.

1.6.2.6. *Stebėjimo laikotarpis*

Toksiškumo požymiai eksperimentiniams gyvūnams turėtų būti stebimi kiekvieną dieną viso poveikio metu ir sveikimo laikotarpiu. Nugaišimo laikas ir tas laikas, kai pasireiškia ir išnyksta toksiškumo požymiai, turėtų būti registruojamas.

▼B**1.6.3. Darbo eiga**

Gyvūnai 28 dienų laikotarpiu nuo penkių iki septynių dienų per savaitę kiekvieną dieną yra veikiami tiriamąja medžiaga. Gyvūnai, esantys bet kurioje papildomoje grupėje, kuri toliau stebima, turėtų būti laikomi dar 14 dienų neatliekant bandymų, kad būtų galima nustatyti atsigavimą po toksiškų poveikių arba tokių poveikių išsilaikymą. Temperatūra, kuriai esant vykdomas bandymas, turėtų būti palaikoma 22 ± 3 °C.

Tinkamiausias santykinis drėgnumas yra tarp 30 ir 70 %, bet tam tikrais atvejais (pvz., atliekant tam tikrų aerozolių bandymus) tai gali būti neįgyvendinama. Išlaikant kameros viduje nedidelį neigiamą slėgį (≤ 5 mm vandens), tiriamoji medžiaga negalės patekti į aplinką. Poveikio metu neturi būti duodama pašaro ir vandens.

Turėtų būti naudojama dinaminė inhaliacijos sistema, kartu su atitinkama analizės koncentracijos kontrolės sistema. Tinkamas poveikio koncentracijas rekomenduojama nustatyti bandomuoju tyrimu. Oro srautas turėtų būti nustatomas taip, kad poveikio kameroje būtų užtikrinamos vienerūšės sąlygos. Tokia sistema turėtų užtikrinti, kad kaip galima greičiau būtų nustatomos pastovios poveikio sąlygos.

Turėtų būti matuojama arba kontroliuojama:

- a) oro srauto greitis (nenutrūkstamai);
- b) tikroji tiriamosios medžiagos koncentracija, matuojama kvėpavimo zonoje. Kasdieninio poveikio laikotarpiu koncentracija neturėtų svyruoti daugiau negu ± 15 % vidutinės vertės. Tačiau tam tikrų aerozolių atveju šio kontrolės lygio neįmanoma pasiekti, tada būtų priimtinas platesnis intervalas. Viso bandymo metu kiekvienos dienos koncentracijos turėtų būti, kiek tai praktiškai įmanoma, išlaikomos pastovios. Aerozoliams ne mažiau kaip viena dalelių dydžio analizė turėtų būti atliekama kiekvienai bandomajai grupei per savaitę;
- c) temperatūra ir drėgnumas, jeigu įmanoma nenutrūkstamai.

Poveikio metu ir po jo vykdomi nuolatiniai stebėjimai ir registravimas; kiekvienam gyvūnui turėtų būti daromi atskiri įrašai. Visi gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną, o toksiškumo požymiai registruojami nurodant pasireiškimo laiką, jų 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, somatomotorinės veiklos 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 kiek įmanoma bus stengiamasi bandymo metu neprarasti gyvūnų dėl tokių priežasčių kaip kanibalizmas, audinių autolizė arba dėl netinkamo taikymo metodo. Bandymo laikotarpio pabaigoje išlikusiems gyviems nepagalbinio poveikio grupių gyvūnams atliekama autopsija. Gaištantys gyvūnai ir gyvūnai, kenčiantys dideles kančias ar skausmą, kai tai pastebima, turėtų būti pašalinami, humaniškai nužudomi ir atliekama autopsija.

Bandymo pabaigoje visiems gyvūnams, taip pat ir kontroliniams, atliekami tokie tyrimai:

- i) hematologija, taip pat bent jau kraujo kūnelių, hemoglobino koncentracijos, eritrocitų kiekio apskaičiavimas, visas ir diferencinis leukocitų kiekis ir krešėjimo matavimas;

▼B

- ii) klinikinė kraujo biochemija, taip pat įtraukiant ne mažiau kaip vieną kepenų ir inkstų funkcijų parametą: alanino aminotransferazės serumas (anksčiau žinomas kaip glutamo piruvo transaminazė), aspartate aminotransferazės serumas (anksčiau žinomas kaip glutamo oksalato transaminazė), šlapimo azotas, albuminas, kraujo kreatininas, visas bilirubino kiekis ir visas serumo baltymų kiekis;

Kitus nustatymus, kurie gali būti reikalingi kompetentingam toksikologiniam įvertinimui atlikti, sudaro kalcio, fosforo, chloro, natrio, kalio, badavimo gliukozės nustatymas, lipidų, hormonų, rūgščių ir šarmų pusiausvyros, methemoglobino, cholinesterazės aktyvumo analizė.

Atitinkamais atvejais gali būti naudojama papildoma klinikinė biochemija stebėtų toksiškumo poveikių tyrinėjimui išplėsti.

1.6.3.1. *Bendroji nekroskopija*

Visiems bandymo gyvūnams turi būti atliekama visa bendroji nekroskopija. Bent jau kepenys, inkstai, antinksčiai, plaučiai ir sėklidės turėtų būti pasveriami drėgni tuojau pat po skrodimo, kad neišdžiūtų. Organai ir audiniai (kvėpavimo traktas, kepenys, inkstai, blužnis, sėklidės, antinksčiai, širdis ir visi kiti organai, kurie turi didelių matomų pažeidimų arba kurių dydis pasikeitęs) turėtų būti konservuojami atitinkamoje terpėje galimam histopatologiniam ištyrimui ateityje. Plaučiai turėtų būti išimami sveiki, pasveriami ir apdorojami atitinkamu fiksatyvu užtikrinant, kad bus išsaugota plaučių struktūra.

1.6.3.2. *Histopatologinis ištyrimas*

Didelių koncentracijų grupėje ir kontrolinėje grupėje (-se) turėtų būti atliekamas užkonservuotų organų ir audinių histologinis ištyrimas. Organai ir audiniai, pažeisti tiriamosios medžiagos, kuri įvesta didžiausiomis dozėmis, turėtų būti ištiriami visose mažesnių dozių grupėse. Visų papildomų grupių gyvūnai turėtų būti ištiriami histologiškai, ypatingą dėmesį skiriant tiems organams ir audiniams, kuriems nustatyta, kad kitose paveiktose grupėse tie poveikiai pasireiškė.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti apibendrinami lentelėse, nurodant gyvūnų skaičių kiekvienos grupės bandymo pradžioje ir gyvūnų, kuriems atsirado kiekvienos rūšies pakenkimų, skaičių.

Visi stebėti rezultatai turėtų 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:

— rūšis, veislė, gyvūnų tiekėjas, aplinkos sąlygos, pašaras ir pan.;

— bandymo sąlygos.

▼B

Poveikio aparato apibūdinimas bei brėžinys, tipas, matmenys, taip pat oro šaltinis, aerozolių generavimo sistema, oro kondicionavimo metodas ir gyvūnų laikymo sąlygų bandymo kameroje, jeigu tokia naudojama, apibūdinimas. Turėtų būti apibūdinama temperatūra, drėgnumo matavimo įranga ir atitinkamais atvejais aerozolio koncentracijų pastovumas ir dalelių dydžio pasiskirstymas.

Duomenys apie poveikį

Jie turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant vidutines vertes ir kintamumo vienetus (t. y. standartinis nuokrypis) ir, jeigu įmanoma, į juos turėtų būti įtraukiami:

- a) oro srauto, tekančio per inhaliacijos įrenginį, greitis;
- b) oro temperatūra ir drėgnumas;
- c) nominalios koncentracijos (visas tiriamos medžiagos kiekis, įdėtas į inhaliacijos įrenginį, padalytas iš oro tūrio);
- d) tirpiklio rūšis, jeigu naudotas;
- e) faktinės koncentracijos bandymo kvėpavimo zonoje;
- f) masės medianinis aerodinaminis skersmuo (MMAD) ir geometrinis standartinis nuokrypis (GSD);

- duomenys apie toksinę reakciją pagal lytį ir koncentraciją;
- nugaišimo laikas poveikio metu arba nurodant, ar gyvūnai išgyveno iki pabaigos;
- toksiškų arba kitokių poveikių apibūdinimas; poveikių nesukeliančios koncentracijos;
- kiekvieno ypatingo požymio stebėjimo laikas ir tolesnė jo eiga;
- duomenys apie maistą ir kūno svorį;
- naudoti hematologiniai bandymai ir jų rezultatai;
- naudoti klinikiniai biocheminiai bandymai ir jų rezultatai;
- autopsijos duomenys;
- išsamus visų histopatologinių duomenų aprašymas;
- statistinis duomenų apdorojimas, jeigu įmanomas;
- duomenų aptarimas;
- duomenų aiškinimas.

3.2. DUOMENŲ APSKAIČIAVIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(D) dalį.

4. LITERATŪRA

Žr. bendrąją įvadinę B(E) dalį.

▼B**B.9. KARTOTINIŲ DOZIŲ (28 DIENOS) TOKSIŠKUMAS (PER ODA)****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. bendrąją įvadinę B(A) dalį.

1.2. SĄVOKOS

Žr. bendrąją įvadinę B(B) dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. BANDYMO METODO ESMĖ

Tiriamoji medžiaga 28 dienas kiekvieną dieną dedama ant odos pamatuotomis dozėmis kelioms eksperimentinių gyvūnų grupėms, viena dozė – vienai grupei. Poveikio metu gyvūnai stebimi kiekvieną dieną toksiškumo požymiams nustatyti. Gyvūnams, kurie nugaišta bandymo metu, atliekama autopsija, bandymą užbaigus likusiems gyviems gyvūnams atliekama autopsija.

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 randomizuojami 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 nenubrūžinti odos. Tiriamajai medžiagai uždėti turėtų būti nukerpama ne mažiau kaip 10 % proc. kūno paviršiaus. Turėtų būti atsižvelgiama į gyvūno kūno svorį, nusprendžiant, koks plotas turėtų būti be kailio, ir į apdangalo dydį. Jeigu bandomos kietosios medžiagos, kurios prireikus gali būti pulverizuojamos, tiriamoji medžiaga turėtų būti pakankamai sudrėkinama vandeniu arba, tam tikrais atvejais, atitinkamu tirpikliu, kad būtų užtikrinamas geras sąlytis su oda. Skystos tiriamosios medžiagos paprastai naudojamos neskiestos. Dedamos nuo penkių iki septynių kartų per savaitę.

1.6.2. Bandymo sąlygos**1.6.2.1. Eksperimentiniai gyvūnai**

Gali būti naudojamos suaugusios žiurkės, triušiai arba jūrų kiaulytės. Gali būti naudojamos kitos rūšys, bet jų naudojimas turėtų būti pagrįdžiamas.

▼B

Bandymo pradžioje naudojamų gyvūnų svorio pakitimo intervalas neturėtų viršyti $\pm 20\%$ atitinkamo vidutinio svorio.

1.6.2.2. *Skaičius ir lytis*

Kiekvienai dozei turėtų būti naudojama ne mažiau 10 gyvūnų (penkios patelės ir penki patinėliai), turinčių sveiką odą. Patelės turėtų būti neturėjusios jauniklių ir būti nevaikingos. Jeigu planuojami tarpiniai nužudymai, gyvūnų skaičius turėtų būti padidinamas tokiu gyvūnų skaičiumi, kuris buvo planuojamas nužudyti iki bandymo pabaigos. Be to, papildoma 10 gyvūnų grupė (po penkis kiekvienos lyties gyvūnus) gali būti veikiamą didele doze 28 dienas ir po poveikio 14 dienų stebimi toksinio poveikio grįžtamumo, stabilumo arba uždelsto atsiradimo požymiai. Taip pat naudojama papildoma 10 kontrolinių gyvūnų grupė (po penkis kiekvienos lyties gyvūnus).

1.6.2.3. *Dozės*

Reikalingos ne mažiau kaip trys dozės, kontrolinė grupė arba tirpiklio kontrolinė grupė, jeigu naudojamas tirpiklis. Poveikio laikas turėtų būti ne trumpesnis kaip šešios valandos per dieną. Tiriamoji medžiaga turėtų būti uždedama panašiu laiku kiekvieną dieną ir intervalai (kas savaitę arba kas dvi savaites) suderinami taip, kad gyvūno kūno svorio atžvilgiu būtų išlaikoma pastovi dozė. Išskyrus tuos atvejus, kai paveikiama tiriamąja medžiaga, su kontrolinės grupės gyvūnais turėtų būti elgiamasi visiškai taip pat, kaip ir su bandomosios grupės objektais. Jeigu dozavimui palengvinti naudojamas tirpiklis, kontrolinei grupei turi būti skiriamos tokios pat dozės su tirpikliu, kokio skiriamos veikiamai grupei, ir ji turi gauti tokį patį tirpiklio kiekį, kurį gauna didžiausios dozės grupė. Didžiausia dozė turėtų sukelti toksiškumo poveikį, bet neturi būti mirštamumo arba tik kelių tokių atvejų priežastimi. Mažiausia dozė neturėtų sukelti jokių toksiškumo požymių. Jeigu yra praktini poveikio žmogui įvertinimas, mažiausia dozė jį turėtų viršyti. Geriausia, jeigu vidurinė dozė galėtų sukelti mažiausius pastebimus toksiškus poveikius. Jeigu naudojama daugiau negu viena tarpinė dozė, dozės turėtų būti išskirstomos intervalais taip, kad susidarytų toksiškų poveikių intensyvumo vertinimo skalė. Mažų ir tarpinių dozių bei kontrolinėse grupėse nugaišimo atvejų dažnumas turėtų būti nedidelis, kad būtų galima prasmingai įvertinti rezultatus.

Jeigu tiriamoji medžiaga sukelia stiprų odos dirginimą, koncentracijos turėtų būti sumažinamos, ir dėl to, naudojant dideles dozes, turėtų susilpnėti kiti toksiški poveikiai arba jų nebūti. Be to, jeigu oda labai stipriai pažeidžiama, reikia bandymą nutraukti ir pradėti naują bandymą naudojant mažesnių koncentracijų dozes.

1.6.2.4. *Ribinis bandymas*

Jeigu išankstinis bandymas naudojant 1 000 mg/kg dozę arba didesnę dozę, susijusią su tikėtiniu poveikiu žmogui, jeigu toks žinomas, nesukelia aiškaus toksiškumo, laikoma, kad bandymo nereikia tęsti.

1.6.2.5. *Stebėjimo laikotarpis*

Eksperimentiniai gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną, ar neatsiranda toksiškumo požymių. Turėtų būti registruojamas nugaišimo laikas ir laikas, kada atsirado ir išnyko toksiškumo požymiai.

▼B**1.6.3. Darbo eiga**

Gyvūnai turėtų būti laikomi atskiruose narveliuose. Gyvūnai yra paveikiami tiriamąja medžiaga, geriausiai – 28 dienas septynias dienas per savaitę. Gyvūnai, esantys bet kurioje papildomoje grupėje, kuri toliau stebima, turėtų būti laikomi dar 14 dienų neatliekant bandymų, kad būtų galima nustatyti atsigavimą po toksiškų poveikių arba tokių poveikių išsilaikymą. Poveikio laikas neturėtų būti trumpesnis kaip šešios valandos per dieną.

Tiriamoji 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 kiek įmanoma plonesniu ir vienodu sluoksniu.

Tiriamoji medžiaga turėtų liestis su oda akytu marlės tvarsčiu ir nedirginančia lipnia juoste. Tiriamoji vieta ir toliau turėtų būti atitinkamai padengta, kad būtų išsaugotas marlės tvarstis ir tiriamoji medžiaga bei užtikrinama, kad gyvūnai nepraris tiriamosios medžiagos. Gali būti naudojami ribotuvai, kad tiriamoji medžiaga nebūtų praryjama, bet visiško imobilizavimo metodas nerekomenduojamas. Gali būti taikomas ir „apsauginio antkaklio“ metodas.

Poveikio laikotarpio pabaigoje tiriamosios medžiagos likutis turėtų būti nuimamas, jeigu tai praktiškai įvykdoma – naudojant vandenį ar kokią kitą atitinkamą odos valymo būdą.

Visi gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną, o toksiškumo požymiai registruojami nurodant pasireiškimo laiką, jų 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, somatomotorinės veiklos 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 kiek įmanoma bus stengiamasi neprarasti gyvūnų dėl tokių priežasčių kaip kanibalizmas, audinių autolizė arba dėl netinkamo taikymo metodo. Bandymo laikotarpio pabaigoje išlikusiems gyviems nepagalbinio poveikio grupių gyvūnams atliekama autopsija. Gaištantys gyvūnai ir gyvūnai, kenčiantys dideles kančias ar skausmą, kai tai pastebima, turėtų būti pašalinami, humaniškai nužudomi ir atliekama autopsija.

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, taip pat įtraukiant ne mažiau kaip vieną kepenų ir inkstų funkcijų parametą: alanino aminotransferazės serumas (anksčiau žinomas kaip glutamo piruvo transaminazė), aspartate aminotransferazės serumas (anksčiau žinomas kaip glutamo oksalato transaminazė), 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.

▼B

Atitinkamais atvejais gali būti naudojama papildoma klinikinė biochemija stebėtų toksiškumo poveikių tyrinėjimui išplėsti.

1.6.4. **Bendroji nekroskopija**

Visiems bandomiems gyvūnams turėtų būti atliekama visa bendroji nekroskopija. Bent jau kepenys, inkstai, antinksčiai ir sėklidės turėtų būti pasveriami drėgni tuojau pat po skrodimo, 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**

Didelių dozių grupėje ir kontrolinėje grupėje turėtų būti atliekamas užkonservuotų organų ir audinių histologinis ištyrimas. Organai ir audiniai, kurie turi defektų, atsirandančių įvedus didžiausias tiriamosios medžiagos dozes, turėtų būti ištiriami visose mažesnių dozių grupėse. Papildomos grupės gyvūnai turėtų būti ištiriami histologiškai, ypatingą dėmesį skiriant tiems organams ir audiniams, jeigu nustatyta, kad kitose paveiktose grupėse tie poveikiai pasireiškė.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti apibendrinami lentelėse, kiekvienai bandomai grupei nurodant gyvūnų skaičių bandymo pradžioje ir gyvūnų, kuriems atsirado kiekvienos rūšies pakenkimų, 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, gyvūnų tiekėjas, aplinkos sąlygos, pašaras ir pan.);
- bandymo sąlygos (taip pat tvarstymo būdas: uždaras ar neuždaras);
- dozės (nurodant tirpiklį, j 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;
- toksiški arba kitokie poveikiai;
- visų nenormalių požymių pastebėjimo laikas ir tolesnė eiga;
- duomenys apie pašarą ir kūno svorį;
- naudoti hematologiniai bandymai ir jų rezultatai;

▼B

- naudoti klinikiniai biocheminiai bandymai ir jų rezultatai;
- nekroskopijos duomenys;
- išsamus visų histopatologinių duomenų aprašymas;
- statistinis duomenų apdorojimas, jeigu įmanomas;
- duomenų aptarimas;
- duomenų aiškinimas.

3.2. DUOMENŲ APSKAIČIAVIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. bendrąją įvadinę B(D) dalį.

4. LITERATŪRA

Žr. bendrąją įvadinę B(E) dalį.

▼B**B.10. MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ CHROMOSOMŲ
ABERACIJŲ TYRIMAS *IN VITRO*****1. METODAS**

Šis metodas pakartoja OECD TG 473 Žinduolių chromosomų aberacijos tyrimą *in vitro* (1997).

1.1. ĮVADAS

Chromosomų aberacijų tyrimo tikslas – identifikuoti agentus, sukeliančius žinduolių ląstelių, kultivuojamų *in vitro*, 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. Poliploidiskumo reiškimosi intensyvumas rodo, 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 sugebėjimą augti kultūroje, kariotipų stabilumą, chromosomų skaičių, chromosomų įvairovę ir spontaninį chromosomų aberacijų dažnį.

Atliekant tyrimus *in vitro* reikia naudoti egzogeninį metabolinės aktyvacijos šaltinį. Ši metabolinės aktyvacijos sistema negali visiškai pakeisti žinduolių *in vivo* sąlygų. Reikia stengtis išvengti tokių sąlygų, kurioms esant būtų gaunami teigiami rezultatai, neatspindintys vidinio mutageniškumo ir galintys atsirasti pakeitus pH, osmosinį slėgį arba ypač padidėjus citotoksiškumui (4) (5).

Šis tyrimas atliekamas, kai ieškoma galimų žinduolių mutagenų ar karcinogenų. Daugelis cheminių junginių, naudojant šį tyrimą, duodančių teigiamus rezultatus, yra žinduolių karcinogenai; tačiau nėra aiškaus ryšio tarp šio tyrimo ir karcinogeniškumo. Ryšys priklauso nuo cheminių medžiagų klasės; yra neginčijamų įrodymų kad šio tyrimo metu negalima nustatyti tam tikrų karcinogenų, nes pasirodo, jog jie veikia kitaip, ne tiesiogiai suardo DNR.

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. SĄVOKOS

Chromatidinė aeracija – struktūrinis chromosomos pakenkimas, pasireiškiantis kaip pavienių chromatidžių suardymas arba kaip chromatidžių suardymas ir susijungimas.

Chromotidinė aeracija – struktūrinis chromosomos pakenkimas, pasireiškiantis kaip abiejų seserinių chromatidžių trūkis arba arba kaip jų abiejų trūkis ir susijungimas toje pačioje vietoje.

▼ **B**

Endoreduplikacija – procesas, kurio metu pasibaigus DNR replikacijos S (sintezės) periodui, branduolys nepradedą 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 – itozės 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 jų skaičiumi, būdingu panaudotoms ląstelėms.

Poliploidiskumas – haploidinio chromosomų skaičiaus (n), išskyrus diploidinį skaičių (t. y. $3n$, $4n$ ir t. t.), kartotinis.

Struktūrinė aeracija – 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 TYRIMO METODO PRINCIPAS

Ląstelių kultūros veikiamos tiriamąja chemine medžiaga esant metabolinei aktyvacijai arba jos nesant. Ląstelių kultūras paveikus tiriamąja 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 TYRIMO 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 reikiams inkubacijos sąlygoms (kultivavimui skirtuose induose, esant reikiamai CO_2 koncentracijai, temperatūrai ir drėgmei). Pastoviai tikrinama, ar gerai žinomų 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 nesusiliėtų, po to jos inkubuojamos $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

▼ B

Limfocitai: į kultūrinę terpę, turinčią mitogeno (pvz., fitohemagliutino), 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 tiriamąja chemine medžiaga tiek esant atitinkamai metabolinės aktyvacijos sistemai, tiek ir nesant. Plačiausiai naudojama sistema yra iš graužikų kepenų, paveiktų tokiais fermentinių aktyvumą skatinančiais agentais kaip AROCLOR 1254 (6) (7) (8) (9) ar fenobarbitono ir β-naftoflavono mišiniu (10) (11) (12), postmitochondrinė frakcija, praturtinta kofaktoriumi.

Post-mitochondrinė frakcija paprastai naudojama tokių koncentracijų, kurių intervalas tyrimo metu naudojamoje galutinėje terpėje siekia 1–10 % (v/v). Metabolinės aktyvacijos sistema gali priklausyti nuo tiriamosios 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. Tyrime naudojamų ląstelių linijų pasirinkimas turėtų būti moksliskai pagrįstas (pvz., pagal citochromo P450 izofermento svarbą tiriamos cheminės medžiagos metabolizmui).

1.4.1.5 *Tiriama cheminė medžiaga/preparatas*

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

1.4.2 **Tyrimo sąlygos**

1.4.2.1 *Tirpiklis/tirpinantysis įrenginys*

Neturėtų būti manoma, kad tirpiklis/tirpinantysis įrenginys chemiškai reaguos su tiriamąja chemine medžiaga ir turėtų būti užtikrinta, kad ląstelės liks išsaugotos bei bus išlaikytas S9 aktyvumas. Jeigu naudojami kiti nežinomi tirpikliai/tirpinantieji įrenginiai, tai juos naudojant, reikia pateikti jų tinkamumą įrodančius duomenis. Jei įmanoma, tai pirmiausia rekomenduojama naudoti skystosios fazės tirpiklį arba tirpinantįjį įrenginį. Kai tiriamos vandenyje netirpios cheminės medžiagos, tai naudojamuose organiniuose tirpikliuose neturėtų būti vandens. Vandenį galima pašalinti molekulinio filtru.

1.4.2.2 *Veikimo koncentracijos*

Parenkant pačią didžiausią koncentraciją, vadovaujamasi tokiais kriterijais, kaip citotoksiškumu, tirpumu tiriamojoje sistemoje ir pH arba osmosinio slėgio pokyčiais.

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 ekperimento metu būtų naudinga nustatyti toksiškumą ir tirpumą.

▼B

Turėtų būti naudojamos bent trys koncentracijos. Jei nustatomas citotoksiškumas, tai šios koncentracijos turėtų svyruoti nuo maksimalaus iki minimalaus citotoksiškumo laipsnio arba jo apskritai neturėtų būti; tai reikš, kad koncentracijos turės būti atskirtos tiktai faktoriu, esančiu tarp 2 ir $\sqrt{10}$. Ląstelių surinkimo metu didžiausia koncentracija turėtų parodyti, kad gerokai sumažėjo ląstelių kolonijų susilieimo laipsnis ir ląstelių skaičius arba mitozinis indeksas (visi sumažėjo daugiau nei 50 %). Mitozinis indeksas yra tik netiesioginis citotoksinių/citostatinių efektų įvertinimo matas ir priklauso nuo laiko praėjusio po tiriamosios medžiagos poveikio. Tačiau mitozinis indeksas tinka ląstelių auginamų suspensijoje, kultūroms, kuriose kiti toksiškumo tyrimai gali būti sudėtingi ir nepraktiški. 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 necitotoksinės, tai didžiausia tiriamoji 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 nėra toksiškos, o jų koncentracijos yra mažesnės už tas, kurioms esant medžiagos netirpsta, tai baigiantis veikimui tiriamąją medžiagą, 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 tiriamąją chemine medžiagą, ir po jo, kadangi veikiant tiriamąją medžiagą, tirpumas gali pakisti dėl ląstelių ir S9 serumo, esančių tiriamojoje 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 jos nesant, tuo pačiu metu naudojami teigiami ir neigiami (tirpikliai, tirpinntysis įrenginys) kontroliniai mėginiai. Kai naudojamosi 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 tiriamąją medžiagą, būtų galima nesunkiai sumažinti pašalinį foną pakartotinai, o tai parodo tiriamosios sistemos jautrumą.

Pasirenkamos tokios teigiamos kontrolinės dozės, kad gaunami efektai būtų ryškūs, bet tyrėjas ne iš karto atskleistų užkoduotas skaidres. 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

▼B

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
	ciklofosfamid	50-18-0	200-015-4
	ciklofosfamido-monohidratas	6055-19-2	

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 tirpinančiojo įrenginio 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 Tyrimo atlikimo metodika

1.4.3.1 Veikimas tiriamąja chemine medžiaga

Proliferaujančios ląstelės veikiamos tiriamąja medžiaga esant metabolinės aktyvacijos sistemai arba jos nesant. Limfocitai veikiami tiriamąja 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 minimalus skirtumai 13, 14, tada pavienės kultūras bus galima tirti, terpėje esant skirtingoms tiriamosios 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 jos nesant tiriamąja 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 jos nesant ir gaunami neigiami rezultatai, tai reikia atlikti papildomą poveikio tiriamąja 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 tiriamąja 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.

▼B1.4.3.4 *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, visos skaidrės, įskaitant teigiamus ir neigiamus kontrolinius mėginius, yra atskirai koduojamos. 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 $\neq 2$. 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 tyrimo tikslas yra nustatyti chromosomų struktūrinės aberacijos, svarbu poliploidiją bei endoduplikaciją registruoti tada, kai tai yra matoma.

2. **DUOMENYS**2.1. **REZULTATŲ APDOROJIMAS**

Ląstelė yra eksperimentinis vienetas, todėl nustatomas ląstelių, turinčių struktūrinės aberacijos, išreiškiamas procentais. Reikia išvardinti chromosomų struktūrinių aberacijų skirtingus tipus, nurodant jų skaičių bei pasireiškimo dažnį tiriamose 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 būtų patvirtintas aiškus teigiamas atsakas. Abejotini rezultatai patvirtinami, atliekant toliau tyrimą, o pirmiausia pakeičiant eksperimento sąlygas, įsitikinama tuo, kad anksčiau gauti rezultatai yra abejotini. 1.4.3.3 skyriuje buvo aptarta būtinybė patvirtinti, kad buvo gauti neigiami rezultatai. Vėlesnių eksperimentų metu reikia apsvarstyti tiriamų parametrų pakeitimus, tam, kad ištirtų sąlygų spektras būtų praplėstas. Koncentracijų intervalo išretinimas bei metabolinės aktyvacijos sąlygos priklauso tiriamiesiems parametrams, kuriuos galima keisti.

2.2. **REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR INTERPRETAVIMAS**

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

▼B

Poliploidinių ląstelių skaičiaus padidėjimas gali rodyti, kad tiriamoji medžiaga gali slopinti mitozę ir sukelti chromosomų skaičiaus ląstelėje pakitimus. Ląstelių, turinčių endoreduplikuotas chromosomas, skaičiaus padidėjimas gali parodyti, kad tiriamoji 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 tiriamosios medžiagos aktyvumą. Net ir daug kartų pakartojus eksperimentą, rezultatai gali likti abejotini ar neaiškūs.

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

3. **ATASKAITA**

TYRIMO ATASKAITA

Tyrimo ataskaitoje turi būti pateikta tokia informacija:

Tirpiklis/tirpinantysis įrenginys:

- priežastys, dėl kurių buvo pasirinktas tirpinantysis įrenginys,
- tiriamosios medžiagos, esančios tirpiklyje/tirpinančiajame įrenginyje, tirpumas ir stabilumas, jei toks yra žinomas.

Ląstelės:

- ląstelių tipas ir šaltinis,
- panaudoto ląstelių tipo kariotipo ypatybės ir tinkamumas,
- ar ląstelės neužsikrėtusios mikoplazmomis, jei tai įmanoma nustatyti,
- 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 tai įmanoma nustatyti,
- ląstelių kultivavimo metodai, jei tai galima nustatyti,
- modalinis chromosomų skaičius.

Tyrimo sąlygos:

- metafazę sustabdančios cheminės medžiagos prigimtis, koncentracija bei laiko tarpas, per 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 CO₂ koncentracija, jei tai įmanoma nurodyti,

▼B

- tiriamosios medžiagos koncentracija,
- tirpinančiojo įrenginio darbinė talpa bei į jį įneštos tiriamosios medžiagos tūris,
- inkubacijos temperatūra,
- inkubacijos laikas,
- veikimo tiriamąją medžiagą trukmė,
- ląstelių tankis pasėjimo metu, jei tai įmanoma nurodyti,
- metabolinės aktyvacijos sistemos tipas ir sudėtis, įskaitant tinkamumo kriterijus,
- teigiami ir neigiami kontroliniai mėginiai,
- skaidrių paruošimo būdai,
- aberacijų vertinimo kriterijai,
- ištirtų metafazių skaičius,
- toksiškumo įvertinimo būdai,
- kriterijai, pagal kuriuos sprendžiama, ar tyrimų metu gauti rezultatai teigiami, neigiami bei abejotini.

Rezultatai:

- toksiškumo požymiai, pvz., ląstelių kultūrų kolonijų susilieimo 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 tiriamąją medžiagą veiktose bei kontrolinėse kolonijose ir turinčių chromosomų aberacijas, skaičius bei chromosomų aberacijų tipas,
- ploidiskumo pokyčiai, jei pastebimi,
- dozės ir atsako tarpusavio ryšys, jei tai įmanoma,
- statistinės analizės, jei tokios buvo atliktos,
- vienu metu gauti neigiamų (tirpiklis/tirpinantysis įrenginys) ir teigiamų kontrolinių mėginių tyrimų duomenys,
- duomenys, gauti anksčiau atliktų tyrimų metu išanalizavus neigiamus (tirpiklis/tirpinantysis prietaisas) 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, M.Jr. 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.

▼ **B**

- 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. *Environ. 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., Tate, A.D., van Buul, P.P.W., Meijers, M. and de Voei, 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 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.

▼B

- 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.

▼B**B.11. MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ KAULŲ ČIULPŲ CHROMOSOMŲ ABERACIJOS TYRIMAS *IN VIVO*****1. METODAS**

Šis metodas pakartoja OECD TG 475, Žinduolių kaulų čiulpų chromosomų aberacijos tyrimą (1997).

1.1 ĮVADAS

Žinduolių chromosomų aberacijų tyrimas *in vitro* naudojamas nustatyti struktūrinėms chromosomų aberacijoms, kurias tiriamoji cheminė medžiaga sukelia žinduolių, paprastai griaužikų, kaulų čiulpų ląstelėse (1) (2) (3) (4). Chromosomų struktūrinės aberacijos gali būti dviejų tipų – chromosominės arba chromatidinės. Poliploidiskumo 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 tyrimui paprastai naudojamas griaužikų stuburo skliautas. Pagrindinis tiriamasis audinys yra kaulų čiulpai, kadangi jie yra išvogti daugybės kraujagyslių, o be to, kaulų čiulpuose yra daug greitai besidauginančių ląstelių, kurios yra lengvai išskiriamos ir apdorojamos. Šio tyrimo metu nėra tiriami kitų rūšių žinduoliai bei jų audiniai.

Šis chromosomų aberacijos tyrimas ypač svarbus, kai įvertinama mutagenų daroma žala, nes šio tyrimo metu galima ištirti metabolizmo, farmakokinetikos ir DNR pažaidų reparacinių procesų veiksmus *in vivo*, nors jie gali varijuoti tarp skirtingų žinduolių rūšių ir skirtingų audinių. Tyrimas *in vivo* naudingas ir tuo, kad vėliau galima ištirti mutageninius efektus, nustatytus *in vitro*.

Jeigu įrodoma, kad tiriamoji cheminė medžiaga arba reaktyvus metabolitas neįsiskverbia į audinį, į kurį buvo nukreiptas, jis nėra naudojamas šiam tyrimui.

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2 SAVOKOS

Chromatidinė aeracija – struktūrinis chromosomos pakenkimas, pasireiškiantis kaip pavienių chromatidžių suardymas arba kaip chromatidžių suardymas ir susijungimas.

Chromotidinė aeracija – struktūrinis chromosomos pakenkimas, pasireiškiantis kaip abiejų seserinių chromatidžių trūkis arba arba kaip jų abiejų trūkis ir susijungimas toje pačioje vietoje.

Endoreduplikacija – procesas, kurio metu pasibaigus DNR replikacijos S (sintezės) periodui, branduolys nepradedą 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 aeracija – ląstelėse esančių chromosomų skaičiaus pokytis palyginus su normalių jų skaičiumi, būdingu panaudotoms ląstelėms.

▼ **B**

Poliploidiškumas – haploidinio chromosomų skaičiaus (n), išskyrus diploidinį skaičių (t. y. $3n$, $4n$ ir t. t.), kartotinis.

Struktūrinė aeracija – 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 TYRIMO METODO PRINCIPAS

Gyvūnai veikiami tiriamąja chemine medžiaga pagal atitinkamą poveikio chemine medžiaga procedūrą ir atitinkamais laiko tarpais, praėjusiais po veikimo yra numarinami. Prieš numarinimą gyvūnai paveikiami agentu, sustabdančiu 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 TYRIMO 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 panaudoti dažniausiai vartojamus jaunų sveikų suaugusių gyvūnų laboratorinius kamienus. Turimo pradžioje gyvūnų svorio variacijos turi būti minimalios ir neperžengti ± 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 tiriamąją (kuriai priskirti individai bus veikiami medžiaga) grupes. Narvai išdėstomi taip, kad būtų iki minimumo sumažinti aplinkos poveikiai, susiję su narvų laikymu. Kiekvienas gyvūnas turi savo identifikacijos ženklą. Gyvūnams ne mažiau kaip 5 dienas leidžiama prisitaikyti prie laboratorinių sąlygų.

1.4.1.4 *Dozių paruošimas*

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

1.4.2 Tyrimo sąlygos

1.4.2.1 *Tirpiklis/tirpinantysis įrenginys*

Neturėtų būti manoma, kad tirpiklis/tirpinantysis įrenginys chemiškai reaguos su tiriamąja chemine medžiaga ir turėtų būti užtikrinta, kad ląstelės liks išsaugotos bei bus išlaikytas S9 aktyvumas. Jeigu naudojami kiti nežinomi tirpikliai/tirpinantieji įrenginiai, tai juos naudojant, reikia pateikti jų tinkamumą įrodančius duomenis. Jei įmanoma, tai pirmiausia rekomenduojama naudoti skystosios fazės tirpiklį arba tirpinantįjį įrenginį. Kai tiriamos vandenyje netirpios cheminės medžiagos, tai naudojamuose organiniuose tirpikliuose neturėtų būti vandens. Vandenį galima pašalinti molekulinio filtru.

▼B

1.4.2.2 Kontroliniai mėginiai

Kiekvieno tyrimo metu turi būti tiriami iš kiekvienai lyčiai priklausančių gyvūnų paimti bei tuo pačiu metu naudojami teigiami ir neigiami (tirpiklis/tirpinantysis įrenginys) kontroliniai mėginiai. Išskyrus tą atvejį, kai gyvūnai yra veikiami tiriamąja chemine medžiaga, kontrolinės grupės gyvūnai turi būti laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip ir gyvūnai, paveikti tiriamąja chemine medžiaga (tiriamoji grupė).

Teigiamuose kontroliniuose mėginiuose, paveiktuose tokia pačia tiriamosios cheminės medžiagos doze *in vivo*, turi būti aptinkamos struktūrinės aberacijos, kurioms esant, bei veikiant tiriamąja medžiaga, būtų galima nesunkiai sumažinti pašalinį foną pakartotinai, o tai parodo tiriamosios sistemos jautrumą. Pasirenkamos tokios teigiamos kontrolinės dozės, kad gaunami efektai būtų ryškūs, bet tyrėjas ne iš karto atskleistų užkoduotas skaidres. Priimtina, kad teigiami kontroliniai mėginiai būtų suleisti gyvūnams tokiu būdu, kuris skiriasi nuo tiriamosios cheminės medžiagos suleidimo būdo bei būtų tik viena kartą 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 nitroslapalas	759-73-9	212-072-2
mitomicinas C	50-07-7	200-008-6
ciklofosfamidą	50-18-0	200-015-4
ciklofosfamido monohidratas	6055-19-2	
trietilenmelaminas	51-18-3	200-083-5

>Neigiami kontroliniai mėginiai, paveikti arba vien tirpikliu arba vien tik tirpinančiuoju įrenginiu arba kiti mėginiai paveikti tuo pačiu būdu kaip ir tiriamosios grupės, turi būti paimami kiekvieną kartą nekreipiant dėmesio į anksčiau atliktų tyrimų 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 tirpinantysis įrenginys nesukėlė jokio žalingo ar mutageninio poveikio.

1.5 BANDYMO ATLIKIMO METODIKA

1.5.1 Gyvūnų skaičius ir lytis

Kiekvienoje tiriamojoje ir kontrolinėje grupėje turi būti ne mažiau kaip 5 vienos lyties gyvūnai. Jei tyrimo metu galima gauti anksčiau atliktų tyrimų, kai buvo panaudota ta pati gyvūnų rūšis ir tas pats poveikio tiriamą medžiaga būdas, duomenis, kurie rodo, kad toksiskumo tarp atskirų lyčių skirtumai yra labai nedideli, tai tada užteks ištirti vienos lyties gyvūnus. Jeigu žmogaus jautrumas cheminėms medžiagoms, kuriomis jis yra veikiamas, priklauso nuo lyties, pvz., jautrumas kai kurioms farmakologiškai aktyvioms medžiagoms, tai reikia ištirti atitinkamos lyties gyvūną.

1.5.2 Veikimo tvarkaraštis

Pirmiausia tik vieną kartą veikiama tiriamosiomis cheminėmis medžiagomis. Tiriamosiomis cheminėmis medžiagomis galima veikti, taikant vadinamąją išskaidytą dozę, kai tą pačią dieną du kartus paveikiama tiriamąja medžiaga ir padarius ne daugiau kaip keleto valandų pertrauką tam, kad būtų paveikta pakankamai dideliu tiriamosios medžiagos tūriu. Kitų dozių davimo tvarka turi būti moksliai pagrįdžiama.

▼B

Veikiant tiriamąją medžiagą vienos dienos bėgyje, prieš tai reikia dukart atskirai paimti mėginius. Tiriant graužikus, pirmasis mėginys paimamas, praėjus maždaug 1,5 ląstelinio ciklo (šis normaliai trunka 12–18 valandų) po veikimo. Kadangi tiriamosios medžiagos įsiskverbimas bei metabolizmas o taipogi jos įtaka ląsteliniam ciklui gali paveikti optimalų laiką per kurį nustatomos chromosomų aberacijos, tai rekomenduojama, kad antrasis mėginys būtų paimamas būtų atliekamas praėjus 24 valandoms po veikimo. Jei dozės duodamos daugiau nei vieną dieną tai mėginys paimamas, praėjus po veikimo laiko tarpui, lygiam maždaug normalaus 1,5 ląstelinio ciklo trukmės.

Prieš numarinant, atitinkama dozė metafazę sustabdančio agento (pvz., Kolcemido® ar kolchicino) suleidžiama gyvūnams į pilvo plėvę. Po atitinkamo intervalo iš gyvūnų paimami mėginiai. Pelėms tas intervalas yra maždaug 3–5 valandos, kuniškiams žiurkėnams – 4–5 valandos. Iš kaulų čiulpų išskiriamos ląstelės ir analizuojamos, siekiant nustatyti chromosomų aberacijas.

1.5.3 **Dozės dydis**

Jeigu tyrimas atliekamas, siekiant surasti intervalą, nes nėra apie tai duomenų, tai jis turi būti atliekamas to pačioje laboratorijoje, naudojant tos pačios rūšies, kamieno ir lyties gyvūnus bei veikiant juos tiriamąją chemine medžiaga pagal tą patį tvarkaraštį, kuris buvo naudojamas pagrindinio tyrimo metu (5). Jeigu nustatomas toksiškumas, tai pirmąkart imant mėginius, naudojami trys doziniai lygiai. Šie doziniai lygmenys 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 dozė vadinama tokia dozė, kuriai esant, išryškėja toksiškumo, priklausomo nuo dozės požymiai, pasirodantys, kai naudojant tokį pat dozavimo tvarkaraštį, yra suleidžiama didžiausia dozė ir spėjama, kad ji bus mirtina. Cheminės medžiagos, kurios pasižymi specifiniu biologiniu aktyvumu, kai jų dozės būna mažos ir netoksinės (pavyzdžiui tokios kaip hormonai ir mitogenai) gali būti laikomos išimtimi, kai joms taikomi dozę nustatantys kriterijai ir tada jos tiriamos kiekvienu atveju atskirai. Didžiausia dozė vadinama tokia dozė, kurią suleidus į kaulų čiulpus, pasireiškia kai kurie toksiškumo požymiai (pavyzdžiui, mitozinis indeksas sumažėja daugiau nei 50 %).

1.5.4 **Ribų paieškos tyrimas**

Jeigu tyrimas atliekamas, esant vienam dozės lygmeniui, kuris, per vieną dieną atliekant pavienį arba du poveikius tiriamąją medžiagą, mažiausiai sudaro 2 000 mg/kg kūno masės ir jei nepastebima jokių toksinių efektų bei, remiantis struktūriškai panašių cheminių medžiagų tyrimų duomenimis, nebus tikimasi užregistruoti genotoksiškumo, tai tada laikomasi nuostatos, kad yra tikslinga atlikti pilną tyrimą panaudojant tris dozinius lygmenis. Atliekant ilgiau trunkančius tyrimus ir tiriamąją medžiagą veikiant iki 14 dienų, ribinė dozė turi siekti 2 000 mg/kg kūno masės, tuo atveju kai tiriamąją medžiagą veikiama ilgiau nei 14 dienų - 1 000 mg/kg kūno masės. Numatomas tiriamosios medžiagos poveikis žmogui gali parodyti, kad atliekant ribų paieškos tyrimą reikalingas aukštesnis dozinis lygmuo.

1.5.5 **Dozių davimas**

Tiriamoji medžiaga paprastai yra duodama, priverstinai maitinant per vamzdelį, įstatant jį į skrandį, tinkamai įvedant kanulę per vamzdelį arba injekciją į pilvą. Tiriamąją medžiagą galima įterpti ir kitais būdais, jei jie yra pagrindžiami. Maksimalus skysčio, priverstinai duodamo per vamzdelį arba išvirkščiamo į pilvą vienu metu, tūris priklauso nuo tiriamojo gyvūno dydžio. Tūris neturi viršyti 2 ml/100 mg kūno masės. Didesnių nei šitų tūrių davimas turi būti pagrindžiamas. Išskyrus sujaudrinančias ar irimą sukeliančias medžiagas, kurios, būdamos didesnių koncentracijų, sukelia žalingus reiškinius, tiriamosios medžiagos tūrio kitimas turi būti sumažinamas iki minimumo, koncentraciją taip sureguliuojant, kad esant visiems dozės lygiams, tūris būtų pastovus.

▼ B**1.5.6 Chromosomų paruošimas**

Kai tik gyvūnai numarinami, iš jų iškart išimami kaulų čiulpai, pamerkami į hipotoninį tirpalą ir fiksuojami. Vėliau kaulų čiulpų ląstelės išsklaidomos ant tepinėlių ir nudažomos.

1.5.7 Analizė

Mitozinis indeksas nustatomas įvertinant citotoksiškumą mažiausiai 1 000 ląstelių, gautų iš 1 gyvūno ir tai atliekama, ištiriant visus tiriamąją medžiagą 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. Visos skaidrės (įskaitant teigiamų ir neigiamų kontrolinių mėginių skaidres) turi būti užkoduojamos nepriklausomai viena nuo kitos tam, kad jas būtų galima ištirti mikroskopu. Kadangi ruošiant skaidres, 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 tyrimų 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 tiriamąją chemine medžiagą, grupėse. Atskirai registruojami plyšiai, tačiau į juos neatsižvelgiama, nustatant absoliutų aberacijos dažnį. Jeigu tarp atskirų lyčių nenustatoma jokių skirtumų pagal atsaką, tai abiejų lyčių tyrimo duomenys apjungiami tam, kad būtų galima atlikti statistinę analizę.

2.2 REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR INTERPRETAVIMAS

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 tyrimo rezultatus, galima taikyti statistinius metodus⁶. Statistinis reikšmingumas neturėtų būti vienintelis faktorius, pagal kurį sprendžiama, ar gautas atsakas teigiamas ar neigiamas. Abejotini rezultatai turėtų būti išsiaiškinti toliau tęsiant tyrimą ir pirmiausia pakeičiant eksperimento sąlygas.

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

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

▼B

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

Tiriant chromosomų aberacijas *in vitro*, teigiami rezultatai, gauti atlikus tyrimą, rodo, kad tiriamoji medžiaga sukelia chromosomų aberacijas tirtos gyvūnų rūšies kaulų čiulpų ląstelėse. Neigiami rezultatai rodo, kad esant tyrimo sąlygoms, tiriamoji medžiaga nesukelia chromosomų aberacijų tirtos gyvūnų rūšies kaulų čiulpų ląstelėse.

Reikia aptarti tą galimybę, ar tiriamoji medžiaga ar jos metabolitai pasieks bendrąją cirkuliaciją ar specifiniu būdu tą audinį, į kurį jie yra nukreipti (pvz., sisteminio toksiškumo atveju).

3. ATASKAITA

3.1. TYRIMO ATASKAITA

Tyrimo ataskaitoje turi būti pateikiama tokia informacija:

Tirpiklis/tirpinantysis įrenginys:

- priežastys, dėl kurių buvo pasirinktas tirpinantysis įrenginys,
- tiriamosios cheminės medžiagos, esančios tirpiklyje/tirpinančiajame įrenginyje, tirpumas ir stabilumas, jei toks yra žinomas.

Tiriamieji gyvūnai:

- panaudota rūšis ar kamienas,
- gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,
- šaltinis, laikymo sąlygos, maitinimas ir pan.,
- kiekvieno gyvūno svoris prieš pradedant tyrimą ir kiekvienos grupės svorio intervalas, vidurkiai bei standartinis nukrypimas.

Tyrimo sąlygos:

- teigiami ir neigiami (tirpiklis/tirpinantysis įrenginys) kontroliniai mėginiai,
- ribų paieškos tyrimo, jei jis buvo vykdomas, duomenys,
- pagrindinė priežastis, nulėmusios arti ribos esančio lygio pasirinkimą
- tiriamosios medžiagos paruošimo apibūdinimas,
- tiriamosios medžiagos davimo apibūdinimas,
- priežastys, nulėmusios davimo būdo pasirinkimą
- metodai, kuriais patvirtinama, kad tiriamoji cheminė medžiaga pateko į bendrąją cirkuliaciją ar audinį, į kurį ji buvo nukreipta, jei tai buvo padaryta,
- tiriamosios cheminės medžiagos, esančios pašaruose ir geriamajame vandenyje, koncentracijos (pm) perversimas į tikrąją dozę (mg/kūno masės kg/dienai), jei tai įmanoma,
- duomenys apie pašarų ir geriamojo vandens kokybę,
- detalus veikimo tiriamąja medžiaga atlikimo ir mėginio paėmimo tvarkaraščio aprašymas,
- metodai toksiškumui įvertinti,

▼B

- metafazę sustabdančios medžiagos prigimtis, jos koncentracija bei veikimo ja trukmė,
- skaidrių 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,
- ląstelėse esančių aberacijų skaičius, kartu nurodant vidurkius ir standartinius nukrypimus,
- ploidiskumo pasikeitimai, jei buvo tokie stebimi,
- 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.

▼B

- 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.

▼B**B. 12. MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ ERITROCITŲ MAŽŲJŲ BRANDUOLIŲ TYRIMAS *IN VIVO*****1. METODAS**

Šis metodas pakartoja OECD TG 474, žinduolių eritrocitų mažųjų branduolių tyrimą (1997).

1.1 ĮVADAS

Žinduolių mažųjų branduolių tyrimas *in vivo* naudojamas, kad analizuojant gyvūnų, paprastai graužikų, kaulų čiulpų eritrocitus bei periferinio kraujo ląsteles būtų galima nustatyti tiriamosios cheminės medžiagos pažeidimus, padarytus eritroblastų chromosomose arba mitoziniame aparate.

Mažųjų branduolių tyrimo tikslas – identifikuoti chemines medžiagas, kurios sukeliančias citogenetinius pažeidimus, dėl kurių susiformuoja mažieji branduoliai, kai chromosomų fragmentai ar ištisos chromosomos įgyja pirminę struktūrą („išnyksta“).

Kai kaulų čiulpų eritroblastas vystydamasis metu virsta polichromatininiu 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 gyvūnuose, paveiktuose tiriamąja chemine medžiaga, padaugėja polichromatinių eritrocitų, turinčių mažuosius branduolius, tai šitai rodo, kad chromosomos buvo „pažeistos“.

Atliekant šį tyrimą paprastai naudojami graužikų kaulų čiulpai, nes būtent šiame audinyje susiformuoja polichromatiniai eritrocitai. Periferinio kraujo polichromatinių (nesubrendusių, turinčių mažuosius branduolius) eritrocitų tyrimą galima atlikti su bet kuria rūšimi, kurios blužnis nesugebėjo pašalinti eritrocitų, turinčių mažuosius branduolius, arba kuri buvo pakankamai jautri nustatytiems agentams, sukeliantiems chromosomų aberacijas, atžvilgiu. Mažuosius branduolius galima atskirti, pagal daugelį kriterijų. Vienas jų yra kinetochorų arba centromerinės DNR, esančios arba nesančios mažuosiuose branduoliuose, nustatymas. Tyrimo, kai gyvūnai veikiami tiriamąja chemine medžiaga kelias ar daugiau savaičių, pagrindinis tikslas taipogi gali būti periferiniame kraujyje esančių subrendusių (normochromatinių) eritrocitų, turinčių mažuosius branduolius, skaičiaus, palyginimas su subrendusių eritrocitų skaičiumi.

Šis žinduolių mažųjų branduolių tyrimas *in vivo* yra ypač svarbus, įvertinant mutagenų daromą žalą, pagal kurią galima spręsti apie metabolizmą, farmakokinetiką bei DNR pažaidų reparaciją *in vivo* nulemiančius veiksnius, nors jie gali skirtis pagal gyvūnų rūšį, audinį ir genetinį lygmenį. Tyrimas *in vivo* taip pat naudingas toliau tiriant mutageninius efektus, nustatytus *in vitro*.

Jeigu nustatoma, kad tiriamoji medžiaga ar reaktyvus metabolitas neįsiskverbė į audinį, į kurį buvo nukreiptas, tai atliekant šį tyrimą, jis nebenaudojamas.

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼ **B**

1.2 SĄVOKOS

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

Mažieji branduoliai – branduoliai, kurie yra atskirti nuo didžiojo ląstelės branduolio, tačiau jie yra papildomi branduoliai, susidarantys tada, kai mitozės telofazės metu chromosomų fragmentai ar ištisos chromosomos įgauna pirminę struktūrą („išnyksta“).

Normochromatinis eritrocitas – subrendęs, neturintis ribosomų eritrocitas, kuris skiriasi nuo nesubrendusio polichromatinio eritrocito pagal taip, kaip dažais, ribosomų dažosi specifiniais dažais.

Polichromatinis eritrocitas – nesubrendęs, tarpinėje vystymosi stadijoje esantis eritrocitas, kuris vis dar tebeturi ribosomas ir gali būti atskirtas nuo subrendusio normochromatinio eritrocito pagal kaip ribosomų atžvilgiu dažosi specifiniais dažais.

1.3 TYRIMO METODO PRINCIPAS

Gyvūnai veikiami tiriamąja medžiaga pasirinktu būdu. Jeigu naudojami kaulų čiulpai, tai praėjus tam tikriems laiko tarpams po veikimo tiriamąja medžiaga, gyvūnai numarinami, iš jų išimami kaulų čiulpai, paruošiami ir nudažomi jų preparatai (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Kai naudojamas periferinis kraujas, tai po veikimo tiriamąja medžiaga praėjus atitinkamiems laiko tarpams, paruošiami tepinėliai, kurie vėliau nudažomi (4) (8) (9) (10). Tiriant periferinį kraują, kaip galima mažiau laiko turi praeiti tarp paskutinio veikimo ir ląstelių surinkimo. Preparatai analizuojami, siekiant identifikuoti mažuosius branduolius.

1.4 TYRIMO METODO APIBŪDINIMAS

1.4.1 **Preparatai**1.4.1.1 *Gyvūno rūšies pasirinkimas*

Kai naudojami kaulų čiulpai, rekomenduojama pasirinkti peles ar žiurkes, nors galima pasirinkti ir bet kokias kitas žinduolių rūšis. Kai naudojamas periferinis kraujas, rekomenduojama pasirinkti peles. Tačiau galima naudoti bet kokias kitas žinduolių rūšis, jeigu parodoma, kad tos rūšies žinduolio blužnis nesugeba pašalinti eritrocitus, turinčius mažuosius branduolius arba tos rūšies žinduolis pakankamai jautrus žinomiems agentams, struktūrines chromosomų aberacijas arba chromosomų skaičiaus viename chromosomų rinkinyje pakitimus. Rekomenduojama panaudoti įprastinius jaunų ir sveikų gyvūnų laboratorinius kamienus. Tyrimo pradžioje gyvūnų svorio variacijos turi būti minimalios ir neperžengti ± 20 % kiekvienos lyties gyvūno vidutinio svorio.

1.4.1.2 *Laikymo ir maitinimo sąlygos*

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

▼ **B**

1.4.1.3 *Gyvūnų paruošimas*

Sveiki jauni subrendę gyvūnai pasirinktinai suskirstomi į kontrolinę bei tiriamąją (kuriai priskirti individai bus veikiami chemine medžiaga) grupes. Narvai išdėstomi taip, kad būtų iki minimumo sumažinti aplinkos efektai, susiję su narvų laikymu. Kiekvienas gyvūnas turi savo identifikacijos ženklą. Gyvūnams leidžiama aklimatizuotis prie laboratorinių sąlygų mažiausiai per 5 dienas.

1.4.1.4 *Dozių paruošimas*

Kietosios tiriamosios cheminės medžiagos ištirpinamos arba suspenduojamos atitinkamuose tirpikliuose ar tirpinamuosiuose įrenginiuose ir jei reikia, tai, prieš paruošiant jų dozes, skirtas gyvūnams, jos praskiedžiamos. Skystųjų tiriamųjų medžiagų dozės ruošiamos iškart arba prieš dozių paruošimą, jos praskiedžiamos. Prieš kiekvieną bandymą šviežiai paruošiami tiriamosios cheminės preparatai ir neatšizvelgiama į stabilumo tyrimo metu gautus duomenis, rodančius, kad medžiaga atitinka jos laikymui keliamus reikalavimus.

1.4.2 **Tyrimo sąlygos**

1.4.2.1 *Tirpiklis/tirpinantysis įrenginys*

Tirpiklis ar tirpinantysis prietaisas neturėtų sukelti jokio toksinio efekto, atitinkančio vartojamas dozes ir neturėtų kilti spėlionių, kad jis gali chemiškai reaguoti su tiriamąja medžiaga. Jeigu naudojami kiti, skirtingai nei žinomi, tirpikliai/tirpinantieji įrengimai, tai prieš pradėdant juos vartoti, reikia pateikti jų tinkamumą įrodančius duomenis. Jei yra įmanoma, tai pirmiausia rekomenduojama naudoti skystosios fazės tirpiklį arba tirpinantįjį įrenginį.

1.4.2.2 *Kontroliniai mėginiai*

Kiekvieno tyrimo metu turi būti tiriami iš kiekvienai lyčiai priklausančių gyvūnų paimti tarpusavyje sutampantys teigiami ir neigiami (tirpiklis/tirpinantysis įrenginys) kontroliniai mėginiai. Išskyrus tą atvejį, kai gyvūnai veikiami tiriamąja chemine medžiaga, kontrolinės grupės gyvūnai turi būti laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip ir gyvūnai, paveikti tiriamąja chemine medžiaga (tiriamoji grupė).

Teigiamuose mėginiuose *in vivo* sąlygomis turi susidaryti mažieji branduoliai, esant tokiam veikimui, kuris kaip tikimasi, užgoš pašalinį foną. Pasirenkamos tokios teigiamos kontrolinės dozės, kad gaunami efektai būtų ryškūs, bet kad tyrėjas ne iškart atskleistų užkoduotas skaidres. Priimtina, kad teigiamas kontrolinis mėginys būtų duodamas kitu būdu nei tiriamoji cheminė medžiaga ir mėginiai būtų tik viena kartą paimami. Be to, jei įmanoma, tai galima apsvastyti teigiamų kontrolinių cheminių medžiagų, priklausančių konkrečiai cheminių medžiagų klasei, panaudojimą. Žemiau pateikiami teigiamų kontrolinių medžiagų pavyzdžiai:

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

▼B

Neigiami kontroliniai mėginiai, paveikti arba vien tirpikliu arba vien tik tirpinamuoju įrenginiu arba kiti mėginiai paveikti tuo pačiu būdu kaip ir tiriamosios grupės turi būti kiekvieną kartą paimami, nekreipiant dėmesio į anksčiau atliktų tyrimų metu gautus kontrolinius duomenis, rodančius, kad variacijos laipsnis tarp gyvūnų ir ląstelių, turinčių mažuosius branduolius, yra priimtini. Jei neigiami kontroliniai mėginiai paimami tik vieną kartą tai pirmojo paėmimo laikas yra pats priimtiniausias. Be to reikia papildomai panaudoti tiriamąją medžiagą nepaveiktus kontrolinius mėginius, nekreipiant dėmesio į anksčiau atliktų tyrimų bei išspausdintus duomenis, rodančius, kad pasirinktas tirpiklis ar tirpinantysis įrenginys nesukėlė jokių žalingų ar mutageninių efektų.

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

1.5 TYRIMO ATLIKIMO METODIKA

1.5.1 Gyvūnų skaičius ir lytis

Kiekvienoje tiriamojoje ir kontrolinėje grupėje turi būti mažiausiai 5 vienos lyties gyvūnai. Jei tyrimo metu galima gauti anksčiau atliktų tyrimų, panaudojant tą pačią gyvūnų rūšį ir tą patį veikimo tiriamąją medžiagą būdą, duomenis, kurie rodo, toksiškumo tarp atskirų lyčių skirtumai yra labai nedideli, tai tada užteks ištirti vienos lyties gyvūnus. Jeigu žmogaus jautrumas cheminėms medžiagoms, kuriomis jis veikiamas, priklauso nuo lyties, kaip antai jautrumo kai kurioms farmakologiškai aktyvioms medžiagoms atveju, tai reikia ištirti atitinkamą gyvūnų rūšį.

1.5.2 Veikimo tvarkaraštis

Nerekomenduojama laikytis veikimo tiriamąją chemine medžiaga atlikimo standartinio tvarkaraščio (t. y. 1, 2 ar daugiau veikimų atliekami kas 24 valandos). Geriau naudoti mėginius, kurių dozės davimo trukmė yra prailginta iki tol, kol šio tyrimo metu buvo nustatytas teigiamas efektas arba atliekant neigiamą kontrolinį tyrimą tol, kol buvo nustatytas toksiškumas arba buvo panaudota ribota dozė buvo duodama iki mėginio paėmimo. Tiriamosios cheminės medžiagos gali būti duodamos ir esant išskaidytai jų doze, t. y. per 1 dieną atliekami 2 poveikiai tiriamąją medžiagą ir abi procedūras skiria ne ilgesnis kaip kelių valandų laikotarpis tam, kad būtų duotas didelis medžiagos tūris.

Tyrimas gali būti atliekamas 2 būdais:

- a) gyvūnai vieną kartą veikiami tiriamąją chemine medžiaga. Kaulų čiulpų mėginiai paimami mažiausiai 2 kartus, ne anksčiau kaip praėjus 24 valandoms po veikimo tiriamąją medžiagą, bet ne vėliau kaip praėjus 48 valandoms po veikimo ir be to mėginiai paimami atitinkamu laiko momentu. Jeigu mėginiai imami anksčiau nei praėjus 24 valandoms po veikimo, tai turi būti nurodomos priežastys, paskatinusios imtis tokių veiksmų. Periferinio kraujo mėginiai imami mažiausiai 2 kartus, ne anksčiau kaip praėjus 36 valandoms po veikimo, atitinkamais laiko, praėjusio nuo to, kai buvo paimtas pirmasis mėginys, intervalais, bet ne ilgesniu kaip 72 valandų laikotarpiu. Kai paėmus vieną mėginį, nustatomas teigiamas atsakas, tai papildomas mėginio paėmimas nėra būtinas;

▼B

- b) jei per dieną atliekami du ir daugiau veikimų (pavyzdžiui, atliekami du ir daugiau veikimų kas 24 valandos), tai mėginiai paimami vieną kartą, praėjus 18–24 valandoms po paskutinio kaulų čiulpų paveikimo tiriamąja medžiaga vieną kartą, praėjus 36–48 valandoms po paskutinio periferinio kraujo ląstelių paveikimo tiriamąja medžiaga (12).

Mėginiai gali būti papildomai paimami ir kitu laiko metu, jeigu tai manoma esą svarbu.

1.5.3 Dozės dydis

Jeigu atliekamas tyrimas, siekiant surasti intervalą, nes nėra duomenų apie tai, tai jis turi būti atliekamas to pačioje laboratorijoje, naudojant tos pačios rūšies, kamieno ir lyties gyvūnus bei veikiant juos tiriamąja chemine medžiaga pagal tą patį tvarkaraštį, kuris buvo naudojamas pagrindinio tyrimo metu (13). Jeigu nustatomas toksiškumas, tai pirmą kartą imant mėginius, naudojami 3 doziniai lygiai. Šie doziniai lygmenys 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 dozė vadinama tokia doze, 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. Cheminės medžiagos, kurios pasižymi specifiniu biologiniu aktyvumu, kai jų dozės būna žemos ir netoksinės (pavyzdžiui tokios kaip hormonai ir mitogenai) gali būti laikomos išimtimi, kai joms taikomi dozę nustatantys kriterijai ir tada jos tiriamos kiekvienu atveju atskirai. Didžiausia dozė vadinama tokia doze, kurią suleidus į kaulų čiulpus, pasireiškia kai kurie toksiškumo požymiai (nesubrendusių eritrocitų skaičius, lyginant su absoliučiu visų eritrocitų, esančių kaulų čiulpuose ir periferiniame kraujyje, skaičiumi, sumažėja).

1.5.4 Ribų paieškos tyrimas

Jeigu tyrimas atliekamas, esant vienam doziniam lygmeniui, kuris, per vieną dieną atliekant pavienį arba du poveikius tiriamąja medžiaga, mažiausiai sudaro 2 000 mg/kūno/kg ir jei nepastebima jokių toksinių efektų bei, remiantis struktūriškai panašių cheminių medžiagų tyrimų duomenimis, nebus tikimasi užregistruoti genotoksiškumo, tai tada laikomasi nuostatos, kad yra tikslinga atlikti pilną tyrimą, panaudojant 3 dozinius lygmenis. Atliekant ilgiau užtrunkančius tyrimus ir tiriamąja medžiaga veikiant iki 14 dienų, ribinė dozė turi siekti 2 000 mg/kūno/kg, tuo atveju kai tiriamąja medžiaga veikiama ilgiau nei 14 dienų – 1 000 mg/kūno/kg. Numatomas tiriamosios medžiagos poveikis žmogui gali parodyti, kad, atliekant ribų paieškos tyrimą reikia naudoti aukštesnį dozinį lygmenį.

1.5.5 Dozių davimas

Tiriamoji medžiaga yra paprastai duodama, priverstinai maitinant per vamzdelį, įstatant jį į skrandį, tinkamai įvedant kanulę per vamzdelį arba injekciją į pilvą. Tiriamąją medžiagą galima įvesti ir kitais būdais, jei jie yra pagrindžiami. Maksimalus skysčio, priverstinai duodamo per vamzdelį arba išvirkščiamo į pilvą vienu metu, tūris priklauso nuo tiriamojo gyvūno dydžio. Tūris neturi viršyti 2 ml/100 mg kūno masės. Didesnių nei šitų tūrių davimas turi būti pagrindžiamas. Išskyrus suaudrinančias ar irimą sukeliančias medžiagas, kurios, būdamos didesnėmis koncentracijomis, sukelia žalingus efektus, tiriamosios medžiagos tūrio kitimas turi būti sumažinamas iki minimumo, koncentraciją taip sureguliuojant, kad esant visiems doziniam lygmenims, tūris būtų pastovus.

▼ B**1.5.6 Kaulų čiulpų/kraujo paruošimas**

Kaulų čiulpų ląstelės paprastai gaunamos iš 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 šis privalumas neatmeta galimybės naudoti ir įprastinius dažus (pavyzdžiui, Giemsa dažą). Galima naudoti ir papildomas sistemas, tokias kaip celiulioze užpildytas chromatografinės kolonėlės, skirtas branduolius turinčioms ląstelėms pašalinti (16), kadangi buvo parodyta, kad naudojant šias sistemas, mažuosius branduolius galima tinkamai išskirti laboratorinėmis sąlygomis.

1.5.7 Analizė

Nustatomas kiekvieno gyvūno nesubrendusių ir subrendusių eritrocitų santykis, suskaičiuojant mažiausiai 200 eritrocitų, esančių kaulų čiulpuose ir 1 000 eritrocitų, esančių periferiniame kraujyje (17). Prieš pradedant mikroskopinę analizę, visos skaidrės, įskaitant teigiamus ir neigiamus kontrolinius mėginius, užkoduojamos nepriklausomai vienos nuo kitų. Tam, kad identifikuoti nesubrendusius, mažuosius branduolius turinčius eritrocitus, reikia suskaičiuoti mažiausiai 2 000 eritrocitų, gautų iš vieno gyvūno. Papildoma informacija gali būti gaunama, kai skaičiuojami subrendę eritrocitai, turintys mažuosius branduolius. Kai skaidrės analizuojamos, tai nesubrendusių ir subrendusių eritrocitų santykis turi būti ne mažesnis kaip 20 % kontrolinė vertė. Tuo atveju, kai gyvūnai buvo veikiami tiriamąja medžiaga mėnesį ir ilgiau, tai reikia suskaičiuoti mažiausiai 2 000 eritrocitų, gautų iš vieno gyvūno tam, kad galima būtų identifikuoti ląsteles, turinčias 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 tyrimų rezultatai turi būti pateikiami lentelėse. Gyvūnas yra eksperimentinis vienetas. Turi būti nustatytas kiekvieno gyvūno nesubrendusių eritrocitų ir subrendusių eritrocitų, turinčių mažuosius branduolius, skaičius bei nesubrendusių ir subrendusių eritrocitų skaičiaus santykis. Jeigu gyvūnai pastoviai veikiami tiriamąja medžiaga mėnesį ar ilgiau, tai 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 tyrimo duomenys sujungiami tam, kad būtų galima atlikti statistinę analizę.

▼B**2.2 REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR INTERPRETAVIMAS**

Teigiamą rezultatą galima įvertinti keletu kriterijų, tokiais kaip nuo dozės priklausomas ląstelių, turinčių mažuosius branduolius skaičiaus padidėjimas arba akivaizdus ląstelių, turinčių mažuosius branduolius ir priklausančių pavienės dozės grupei pagal vienkartinį mėginio paėmimo laiką, skaičiaus padidėjimas. Pirmiausia reikia aptarti biologinę rezultatų reikšmę. Įvertinant tyrimo metu gautus rezultatus, galima pasinaudoti statistiniais metodais (18) (19). Statistinis reikšmingumas turėtų būti vienintelis faktorius, pagal kurį sprendžiama, ar atsakas teigiamas, ar ne. Abejotini rezultatai turėtų būti išaiškinti, toliau tęsiant tyrimą ir pirmiausia pakeičiant eksperimentines sąlygas.

Jei tiriant medžiagą gaunami rezultatai, neatitinkantys aukščiau išvardytų kriterijų, ši tiriamoji medžiaga laikoma nemutageniška.

Nors daugumos eksperimentų metu buvo gauti aiškiai teigiami ar neigiami rezultatai, išimtiniais atvejais gautų rezultatų rinkinys neleidžia padaryti teisingos išvados apie tiriamosios medžiagos aktyvumą. Rezultatai gali likti abejotini ar neaiškūs, nepriklausomai nuo atliktų eksperimentų skaičiaus.

Tiriant mažuosius branduolius *in vitro*, gauti teigiami rezultatai rodo, kad tiriamoji medžiaga sukelia mažųjų branduolių, kuriuos sąlygoja tiriamosios rūšies gyvūnų eritroblastų chromosomų ar mitozinio aparato pažeidimai, pasireiškimą. Neigiami rezultatai rodo, kad tiriamoji medžiaga nesukelia mažųjų branduolių atsiradimo tiriamos rūšies gyvūnų nesubrendusiuose eritroblastuose.

Reikia aptarti tą galimybę, kai tiriamoji medžiaga arba jos metabolitai specifiniu būdu pasieks bendrąją cirkuliaciją ar tą audinį, į kurį jie yra nukreipti (pavyzdžiui, sisteminio toksiškumo atveju).

3. ATASKAITA***TYRIMO ATASKAITA***

Tyrimo ataskaitoje turi būti pateikiama tokia informacija:

Tirpiklis/tirpinantysis įrenginys:

- priežastys, dėl kurių buvo pasirinktas šis įrenginys,
- tiriamosios cheminės medžiagos, esančios tirpiklyje/tirpinančiajame įrenginyje, tirpumas ir stabilumas, jei toks yra žinomas.

Tiriamieji gyvūnai:

- panaudota rūšis ar kamienas,
- gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,
- šaltinis, laikymo sąlygos, maitinimas ir pan.,
- kiekvieno gyvūno svoris prieš pradedant tyrimą ir kiekvienos grupės svorio riba, vidurkiai bei standartinis nukrypimas.

Tyrimo sąlygos:

- teigiami ir neigiami (tirpiklis/tirpinantysis įrenginys) kontroliniai mėginiai,
- ribų paieškos tyrimo, jei jis buvo vykdomas, rezultatai,

▼B

- pagrindinė priežastis, nulėmusi arti ribos esančio lygio pasirinkimą
- duomenys apie tiriamosios medžiagos paruošimą,
- duomenys apie tiriamosios medžiagos davimą,
- pagrindinė priežastis, nulėmusi davimo būdo pasirinkimą
- metodai, kuriais patvirtinama, kad tiriamoji cheminė medžiaga pateko į bendrąją cirkuliaciją ar audinį, į kurį ji buvo nukreipta, jei tai buvo padaryta,
- tiriamosios cheminės medžiagos, esančios pašaruose ir geriamajame vandenyje, koncentracijos (pm) perversimas į tikrąją dozę (mg/kūno masės kg/dienai), jei tai įmanoma,
- duomenys apie pašarų ir geriamojo vandens kokybę,
- detalus veikimo tiriamąja medžiaga atlikimo ir mėginio paėmimo tvarkaraščio aprašymas,
- skaidrių paruošimo metodai,
- metodai toksiškumui įvertinti,
- 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, turinčių mažuosius branduolius, eritrocitų skaičius,
- kiekvienos grupės nesubrendusių, mažuosius branduolius turinčių eritrocitų skaičiaus vidurkis ir standartinis nukrypimas,
- dozės ir atsako tarpusavio ryšys, jei tai įmanoma nurodyti,
- statistinės analizės, jei bet kokios buvo atliktos,
- vienu metu naudojamų neigiamų kontrolinių mėginių tyrimo duomenys,
- vienu metu naudojamų teigiamų kontrolinių mėginių tyrimo 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.

▼ **B**

- 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 Erythrocytes. *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.

▼B

- 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.

▼B**B.13/14. MUTAGENIŠKUMAS. GRĮŽTAMŲJŲ MUTACIJŲ BAKTERIJOSE TYRIMAS****1. METODAS**

Šis metodas pakartoja OECD TG 471, grįžtamųjų mutacijų bakterijose tyrimą (1997).

1.1. ĮVADAS

Tiriant grįžtamasias mutacijas bakterijose, naudojami aminorūgščių reikalaujantys *Salmonella typhimurium* ir *Escherichia coli* kamienai tam, kad būtų galima nustatyti taškinės mutacijos, tokias kaip vienos ar kelių DNR bazių porų pakaitos, intarpai ar delecijos (1) (2) (3). Šio grįžtamųjų mutacijų bakterijose tyrimo principas yra tai, kad jo metu nustatomos mutacijos, kurios pakeičia tiriamuosiuose kamienuose esančias mutacijas taip, kad atkuria bakterijų funkcinę sugebėjimą sintetinti pagrindinę amino rūgštį. Bakterijos-revertantai aptinkamos pagal savo sugebėjimą augti terpėje, kurioje nėra amino rūgšties, reikalingos jų tėviniam tiriamajam kamienui.

Daugelio žmonių genetiškai paveldimų ligų priežastis yra taškinės mutacijos bei su jomis susiję įvykiai ir egzistuoja pakankamai įrodymų, kad žmonių ir eksperimentinių gyvūnų vėžį sukelia somatinėse ląstelėse esančių onkogenų bei navikų supresorinių genų struktūriniai pokyčiai, atsiradę dėl taškinių mutacijų. Grįžtamųjų mutacijų bakterijose tyrimas yra nebrangus ir greitai bei pakankamai lengvai atliekamas. Dauguma tiriamųjų kamienų pasižymi keletu ypatybių, pagal kurias juos galima lengvai nustatyti, analizuojant mutacijas, 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 agentų sukeltų mutacijų tipus. Tiriant chemines medžiagas, tarp jų ir lakius junginius, pasižyminčius skirtingomis fizikinėmis bei cheminėmis savybėmis, buvo sukaupta didelė duomenų apie įvairiausias struktūras bazė, kuri vartojama, vykdant grįžtamųjų mutacijų bakterijose tyrimus bei naudojantis visuotinai pripažintais metodais.

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. SAVOKOS

Grįžtamųjų mutacijų tyrimas *Salmonella typhimurium* arba *Escherichia coli* kamienuose nustato kamieno, kuriam reikalinga aminorūgštis (atitinkamai histidinas ar triptofanas), mutaciją, dėl kurios atsiranda kamienas, kuriam nereikalinga aminorūgštis, tiekama egzogeniniu būdu.

Mutagenai, sukeliantys bazių porų pakaitas – agentai, sukeliantys DNR bazių porų pakaitas. Atliekant reversijos tyrimą nustatoma, kad pakaita gali vykti pradinės mutacijos ar kitoje bakterijos genomo vietoje.

Mutagenai, sukeliantys skaitymo rėmelio pasislinkimą – agentai, sukeliantys vienos ar kelių DNR bazių porų intarpus ar delecijas, o dėl to pasislenka RNR molekulėje esantis skaitymo rėmelis.

▼B

1.3. PRADINIAI SVARSTYMAI

Atliekant grįžtamųjų mutacijų bakterijose tyrimą naudojamos prokariotinės ląstelės, kurios skiriasi nuo žinduolių ląstelių pagal tokius faktorius, kaip medžiagų transportas į ląstelę, metabolizmas, chromosomų struktūra bei DNR pažeidimų atstatymo procesai. Paprastai atliekant tyrimus *in vitro*, reikia naudoti metabolinės aktyvacijos egzogeninį šaltinį. Metabolinės aktyvacijos sistemos *in vitro* negali absoliučiai imituoti žinduolių metabolinės aktyvacijos sąlygų *in vivo*. Taigi atliekant tyrimą negaunama tiesioginės informacijos apie žinduolių cheminių medžiagų mutageniškumą ir karcinogeniškumą.

Grįžtamųjų mutacijų bakterijose tyrimas paprastai naudojamas pirmiausia atrankai pagal genotoksiškumą o konkrečiai, pagal sugebėjimą sukelti taškinės mutacijas. Gausi duomenų bazė parodė, kad daugelio cheminių medžiagų genotoksiškumas buvo nustatytas tiek grįžtamųjų mutacijų bakterijose tyrimo tiek ir kitų tyrimų metu. Tačiau šio tyrimo metu negalima nustatyti keletų mutagenų ir šito priežastis yra dėl grįžtamųjų mutacijų bakterijose tyrimo pagrindinio tikslo savitumo, metabolinės aktyvacijos skirtumų bei mutagenų paplitimo gamtoje skirtumų. Kita vertus, atsižvelgus į faktorius, padidinančius grįžtamųjų mutacijų bakterijose tyrimo jautrumą, galima pervertinti mutageninį medžiagų aktyvumą.

Grįžtamųjų mutacijų bakterijose tyrimas 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 tirti žinduolių mutacijas.

Nors vykdant šį tyrimą nustatoma, kad daugelis junginių karcinogeniški žinduolių atveju, tačiau šio tarpusavio ryšio nereikia suabsoliutinti. Tai priklauso nuo cheminių medžiagų klasės ir atliekant šį tyrimą neįmanoma nustatyti tam tikrų karcinogenų, kadangi jų veikimo mechanizmas nesiremia genotoksiškumu arba jie veikia visai kitaip nei bakterinėse ląstelėse.

1.4. TYRIMO METODO PRINCIPAS

Bakterinės ląstelės veikiamos tiriamąja medžiaga esant arba nesant egzogeninės metabolinės aktyvacijos sistemos. 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.

Atliekant grįžtamųjų mutacijų bakterijose tyrimą dažniausiai naudojama keletas procedūrų, tokių kaip 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 tyrimo modifikacijos (12).

▼ **B**

Tyrimo metodo aprašyme pateiktos bandymo atlikimo metodikos pirmiausia siejasi su inkorporacijos į lėkštelę ir išankstinės inkubacijos metodais. Šios dvi bandymo atlikimo metodikos tinka, atliekant eksperimentus, kai naudojama arba nenaudojama metabolinė aktyvacijos sistema. Kai kurios medžiagos priklauso tokioms cheminių medžiagų klasėms, kaip alifatiniai aminai, turintys trumpąją grandinę, divalenčiai metalai, turintys NO grupę, alkaloidai, turintys pirolizidiną, alilo grupę turintys junginiai bei azoto junginiai (3). Taip pat pripažįstama, kad naudojant tokias standartines tyrimo metodikas, kaip inkorporacijos į lėkštelę bei išankstinės inkubacijos metodus, ne visada galima nustatyti tam tikroms klasėms priklausančius mutagenus. Šie mutagenai yra laikomi „ypatingais atvejais“ ir ypač rekomenduojama, kad jų nustatymui būtų panaudojamos ir kitos, alternatyvios bandymo atlikimo metodikos. Šiuos „ypatingus atvejus“ galima identifikuoti, kartu pateikiant ir jų nustatymo metodikas: azodažai, diazo grupę turintys junginiai (3) (5) (6) (13), dujos bei lakiosios medžiagos (12) (14) (15) (16) ir glikozidai (17) (18). Nukrypimas nuo standartinės bandymo atlikimo metodikos turi būti moksliskai pagrįstas.

1.5. TYRIMO METODO APRAŠYMAS

1.5.1. **Preparatai**1.5.1.1. *Bakterijos*

Grynos bakterijų kultūros auginamos tol, kol pasiekia vėlyvąją eksponentinę ir ankstyvąją plato augimo fazę (apie 10^9 ląstelių/ml). Kultūros, pasiekusios vėlyvąją plato augimo fazę, neturi būti naudojamos. Svarbu yra tai, kad bakterijų kultūrose, kurios naudojamos eksperimentams, būtų didelis gyvų bakterijų ląstelių titras. Titrą 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 sekantis 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 (pKM101) arba *S. typhimurium* TA102.

Tam, kad kryžmiškai surišantys mutagenai būtų nustatyti, reikia papildomai panaudoti *S. typhimurium* TA 102 arba *E. coli* WP 2 ar WP 2 (pKM 101) kamienus, sugebančius taisyti DNR pažaidas.

▼B

Reikia naudoti gerai žinomas pagrindinės kultūros paruošimo, žymės patvirtinimo bei saugojimo metodikas. Reikia parodyti, kad aminorūgštis yra būtina kiekvieno preparato, paruošto iš užšaldytos pradinės kultūros, augimui (histidinas – *S. typhimurium* kamienams, o triptofanas – *E. coli* kamienams). Kitos fenotipinės charakteristikos, o būtent plazmidžių, turinčių R-faktorių, egzistavimas arba neegzistavimas, jei tai yra reikalinga (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), būdingos mutacijos (*S. typhimurium* rfa mutacija, apsprendžianti jautrumą violetinei šviesai, *E. coli* uvr A mutacija arba *S. typhimurium* uvr B mutacija, nulemianti jautrumą ultravioletinei šviesai) (2) (3). Kamienai turi spontaniškai sukurti revertantų kolonijas, kurių skaičius turi atitikti dažnumo ribas, numatomas, remiantis anksčiau gautais laboratorijoje duomenimis ir pirmiausia turi atitikti 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 keletas ląstelių dalijimasis (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Metabolinė aktyvacija*

Bakterijos turi būti veikiamos tiriamąja medžiaga, tiek esant tiek ir nesant atitinkamai metabolinės aktyvacijos sistemai. Plačiausiai vartojama sistema yra iš graužikų kepenų, paveiktų tokiais fermentinių aktyvumą skatinančiais agentais kaip AROCLOR 1254 (1) (2) ar fenobarbitono ir P-naftoflavono mišiniu (18) (20) (21), post-mitochondrinė frakcija, praturtinta kofaktoriais. Post-mitochondrinė frakcija paprastai vartojama koncentracijomis, kurių intervalas S9 mišinyje siekia nuo 5 iki 30 % (v/v). Metabolinės aktyvacijos sistema pasirenkama priklausomai nuo tiriamosios cheminės medžiagos klasės. Kai kuriais atvejais tikslinga varoti daugiau nei post-mitochondrinės frakcijos koncentraciją. Tiriant azodažus ir diazo grupę turinčius junginius, labiau tikslinga naudoti redukcinę metabolinę aktyvacijos sistemą (6) (13).

1.5.1.4. *Tiriamoji medžiaga/preparatas*

Kietosios tiriamosios medžiagos turi būti ištirpinamos arba suspenduojamos atitinkamuose tirpikliuose ar tirpinančiuosiuose įrenginiuose ir, jei reikia, tai prieš paveikiant jomis bakterijas, jos praskiedžiamos. Skystosios tiriamosios medžiagos įnešamos tiesiogiai į tyrimo sistemas ir/ar praskiedžiamos prieš veikiant jomis bakterijas. Kiekvieno bandymo metu turi būti paruošiami švieži preparatai, nekreipiant dėmesio į stabilumo tyrimo duomenis, rodančius, kad tiriamosios medžiagos atitinka saugojimui keliamus reikalavimus.

Neturi kilti abejonių dėl to, kad tirpiklis/tirpinantysis įrenginys gali chemiškai reaguoti su tiriamąja medžiaga ir be to tirpiklis ar tirpinantysis įrenginys turi būti suderintas su bakterijų išgyvenimu bei S9 aktyvumu (22). Jeigu naudojami kiti, skirtingai nei žinomi, tirpikliai/tirpinantieji įrenginiai, tai prieš pradėdant juos vartoti, reikia pateikti jų tinkamumą įrodančius duomenis. Jei yra įmanoma, tai pirmiausia rekomenduojama naudoti skystosios fazės tirpiklį arba tirpinantįjį įrengimą. Kai tiriamos vandenyje netirpios cheminės medžiagos, tai naudojamuose organiniuose tirpikliuose neturi būti vandens.

▼ B

1.5.2. **Tyrimo sąlygos**

1.5.2.1. *Tiriamieji kamieniai (žr. 1.5.1.1.)*

1.5.2.2. *Veikimo koncentracija*

Kriterijai, į kuriuos reikia atsižvelgti, nustatant didžiausią tiriamosios medžiagos koncentraciją, yra medžiagos citotoksiškumas ir tirpumas galutiniame veikimo mišinyje.

Būtų naudinga nustatyti toksiškumą bei netirpumą preliminarinio eksperimento metu. Citotoksiškumas gali būti nustatomas pagal revertantų skaičiaus sumažėjimą, šalutinės terpės praskaidrėjimą ar sunykimą arba pagal kultūrų, paveiktų tiriamąja medžiaga, išgyvenimo laipsnį. Medžiagos citotoksiškumas gali kisti dėl metabolinės aktyvacijos sistemų egzistavimo. Netirpumas gali būti įvertinamas plika akimi stebint precipitato susidarymą galutiniame reakciniame mišinyje, esant šiuo metu atliekamo eksperimento sąlygoms.

Maksimali rekomenduojama tiriamų tirpių medžiagų, nepasižyminčių citotoksiškumu, koncentracija yra 5 mg/lėkštelėje arba 5 µl/lėkštelėje. Jei medžiagos, nepasižyminčios citotoksiškumu, netirpsta, jų koncentracijoms esant 5 mg/lėkštelėje arba 5 µl/lėkštelėje, tai esant vienai ar daugiau tirtų koncentracijų, tos medžiagos visai netirpsta galutiniame reakciniame mišinyje, skirtame, paveikti bakterijas. Tiriamosios medžiagos, kurios yra citotoksiškos, kai jų koncentracijos yra mažesnės nei 5 mg/lėkštelėje arba 5 µl/lėkštelėje, turi būti tiriamos tol, kol nustatoma koncentracija, kuriai esant, medžiagos pasižymi citotoksiniu aktyvumu. Precipitato susidarymas neturi trukdyti įvertinti duomenis.

Reikia panaudoti mažiausiai 5 išanalizuojamas tiriamosios medžiagos koncentracijas, kurių vertės pradinio eksperimento metu skirtų intervalai, lygūs pusei log (V 10). Mažesni skiriamieji intervalai tinka tada, kai tirama atsako priklausomybė nuo koncentracijos. Koncentracija, mažesnė už 5 mg/lėkštelėje arba 5 µl/lėkštelėje, pasirenkama tuo atveju, jei tiriamųjų medžiagų mutageniškumas yra gana neaiškus.

1.5.2.3. *Neigiami ir teigiami kontroliniai mėginiai*

Atliekant kiekvieną eksperimentą kartu su metaboline aktyvacija arba be jos būtina vienu metu naudoti neigiamus (tirpiklis ar tirpinantysis įrenginys) bei teigiamus kontrolinius mėginius, specifiskus bakterijų kamienui.

Kai bandymų metu naudojama metabolinės aktyvacijos sistema, tai teigiama kontrolinė etaloninė medžiaga pasirenkama pagal naudojamą bakterinio kamieno tipą.

Žemiau pateikiami tinkamų teigiamų kontrolinių medžiagų, naudojamų, esant metabolinei aktyvacijai, 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

▼**B**

CAS Nr.	EINECS Nr.	Medžiaga
50-18-0		ciklofosfamid
6055-19-2	200-015-4	ciklofosfamido monohidratas

Žemiau pateikiama tinkama teigiama kontrolinė medžiaga, kai naudojamas redukcinės metabolinės aktyvacijos metodas:

CAS Nr.	EINECS Nr.	Medžiaga
573-58-0	209-358-4	Kongo raudonasis

22-aminoantracenas neturi būti naudojamas kaip vienintelis S9 mišinio veikimo efektyvumo indikatorius. Jei 2-aminoantracenas yra naudojamas, tai kiekviena S9 mišinio partija išanalizuojama, panaudojant mutageną, kuriam yra reikalinga metabolinė aktyvacija mikrosominių fermentų pagalba, pavyzdžiui, benzpireną ar dimetil-benzaantraceną.

Toliau pateikiami tinkamų teigiamų kontrolinių medžiagų, specifškų bakterijų kamienui, naudojamų, nesant 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-nitrozoguani-dinas	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, tai apsvarstomas konkrečios klasės cheminių medžiagų, kaip teigiamų kontrolinių mėginių, panaudojimas.

Reikia panaudoti ir neigiamus kontrolinius mėginius, sudarytus vien tik iš tirpiklio ar tirpinančiojo įrenginio ir neturinčius tiriamosios medžiagos bei veiktus tokiu pat būdu kaip ir tiriamieji mėginiai. Be to reikia naudoti ir tiriamąją medžiaga neveiktus neigiamus kontrolinius mėginius, nekreipiant dėmesio į anksčiau gautus kontrolinius duomenis, rodančius, kad pasirinktas tirpiklis nėra žalingas ir mutageniškas.

▼B**1.5.3. Bandymo atlikimo metodika**

Atliekant bandymą pagal inkorporacijos į lėkštelę metodą (1) (2) (3) (4), 2 ml padengiančiojo agaro sumaišoma su 0,05 ar 0,1 ml šviežiai išaugintos bakterijų kultūros (turinčios apie 10^8 gyvų ląstelių) ir 0,5 ml sterilaus buferio. Įprastiniu atveju atliekant bandymą, kai naudojama metabolinė aktyvacija, 0,5 ml metabolinės aktyvacijos mišinio, turinčio pakankamą post-mitochondrinės frakcijos kiekį (intervalo 5–30 % v/v ribose, metabolinės aktyvacijos mišinyje), sumaišoma su 2 ml padengiančiojo agaro, bakterijomis ir tiriamąja medžiaga/tiriamuoju 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), tiriamoji medžiaga/tiriamasis tirpalas iš anksto inkubuojamas su tiriamuoju bakteriniu kamienu (turinčiu apie 10^8 gyvų ląstelių) ir steriliu buferiu arba metabolinės aktyvacijos sistema (0,5 ml) ir įprastiniu atveju 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 tiriamosios medžiagos/tiriamąjo tirpalo, 0,1 ml bakterijų ir 0,5 ml S9 mišinio ar sterilaus buferio. Atliekant išankstinę inkubaciją, mėgintuvėliai purtomi ant kratytuvo, 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 moksliskai pagrindžiamas. Atsitiktinis lėkštelės praradimas nereiškia, kad bandymas nepavyko.

Dujinės bei lakios medžiagos turi būti tiriamos atitinkamais metodais, jas laikant užsandarintuose induose (12) (14) (15) (16).

1.5.4. Inkubacija

Atliekant konkretų 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 tiriamąja medžiaga neveiktas kontrolinis mėginys) kontrolinėse lėkštelėse, skaičių. Pateikiant duomenis apie tiriamąją medžiagą ir teigiamus bei neigiamus (tirpiklio kontrolinis mėginys ir (ar) tiriamąja medžiaga neveiktas kontrolinis mėginys) kontrolinius mėginius, nurodomas revertantų kolonijų, esančių kiekvienoje lėkštelėje, skaičius, jo vidurkis bei standartinis nukrypimas.

Nėra reikalaujama, kad būtų patvirtinta, jog buvo gautas aiškus teigiamas rezultatas. Abejotini rezultatai išaiškinami, tęsiant tyrimus, modifikuojant eksperimento sąlygas. Neigiami rezultatai patvirtinami kiekvienu atskiru atveju. Tais atvejais, kai manoma, jog nebūtina patvirtinti, kad buvo gauti neigiami rezultatai, šitai turi būti pagrįsta. Tęsiant eksperimentus apsvairstoma, ar reikia modifikuoti tiriamus parametrus tam, kad būtų išplėstas įvertinamų sąlygų intervalas. Tiriamieji parametrai, kuriuos galima modifikuoti, yra ribos, skiriamosios koncentracijos, bandymo atlikimo metodai (inkorporacijos į lėkštelę bei išankstinės inkubacijos) bei metabolinės aktyvacijos sąlygos.

▼B**2.2. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR INTERPRETAVIMAS**

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 ją atkartojant, kai naudojama viena ar daugiau koncentracijų (23). Pirmiausia reikia aptarti biologinę rezultatų reikšmę. Įvertinant tyrimo rezultatus, galima pasinaudoti statistiniais metodais (24). Tačiau statistikos 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 tiriamos medžiagos aktyvumą. Rezultatai gali likti abejotini ir neaiškūs, nepriklausomai nuo to, kiek kartų eksperimentas buvo pakartotas.

Tiriant grįžtamas mutacijas bakterijose, gauti rezultatai rodo, kad tiriamoji medžiaga sukelia taškinės mutacijas (bazių pakaitas arba skaitymo rėmelio pasislinkimą) arba *Salmonella typhimurium* ir (arba) *Escherichia coli* genome. Neigiami rezultatai rodo, kad esant tyrimo sąlygoms, tiriamoji medžiaga nesukelia mutacijų tiriamose bakterijų rūšyse.

3. ATASKAITA***ATASKAITA APIE TYRIMĄ***

Ataskaitoje apie tyrimą turi būti pateikiama tokia informacija:

Tirpiklis/tirpinantysis įrenginys:

- priežastys, dėl kurių buvo pasirinktas šis įrenginys,
- tiriamosios cheminės medžiagos, esančios tirpiklyje/tirpinančiajame įrenginyje, tirpumas ir stabilumas, jei toks yra žinomas.

Kamienai:

- panaudoti kamienai,
- ląstelių, esančių vienoje kultūroje, skaičius,
- kamieno charakteristikos.

Tyrimo sąlygos:

- tiriamosios medžiagos kiekis vienoje lėkštelėje (mg/lėkštelė arba µl/lėkštelė), 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 tiriamąją medžiagą atlikimo metodiką.

Rezultatai:

- toksiškumo požymiai,
- precipitacijos požymiai,
- kolonijų vienoje lėkštelėje skaičius,

▼B

- revertantų kolonijų vienoje lėkštelėje skaičiaus vidurkis bei standartinis nukrypimas,
- dozės ir atsako tarpusavio ryšys, jei jį įmanoma nurodyti,
- bet kokios statistinės analizės,
- vienu metu naudojamų neigiamų (tirpiklis/tirpinantysis įrenginys) ir teigiamų kontrolinių mėginių tyrimo duomenys, nurodant intervalus, vidurkius bei standartinius nukrypimus,
- anksčiau gauti neigiamų (tirpiklis/tirpinantysis įrenginys) 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*, 1, 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.

▼B

- 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, 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.
- 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.

▼B

- 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.

▼ B**B.15. MUTAGENIŠKUMO TYRIMAS IR ATRANKA PAGAL KARCINOGENIŠKUMĄ GENŲ MUTACIJOS – *SACCAROMYCES CEREVISIAE*****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. SĄVOKOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. TYRIMO METODO PRINCIPAS

Siekiant įvertinti cheminių agentų (esant arba nesant metabolitinės aktyvacijos sistemos) sukeliamas genų mutacijas, gali būti naudojami įvairiausi haploidiniai ir diploidiniai *Saccharomyces cerevisiae* kamieniai.

Haploidiniuose kamienuose gali būti naudojamos tiesioginės mutacinės sistemos, tokios kaip mutacinis virsmas iš raudonos spalvos mutantų, kurių augimui reikalingas adeninas (*ade-1*, *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 tyrimo 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* –beprasnę 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 *i lv 1-92*.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. TYRIMO METODO APIBŪDINIMAS*Pasiruošimas tyrimui*

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

▼B**Metabolitinė aktyvacija**

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

Grauzikų, iš anksto paveiktų fermentus skatinančiais agentais, kepenų postmitochondrinė frakcija, praturtinta kofaktoriais yra plačiausiai naudojama metabolitinė aktyvacijos sistema. Metabolitinei aktyvacijai galima naudoti ir kitų rūšių bei audinių postmitochondrines frakcijas bei procedūras.

*Tyrimo sąlygos***Tiriamieji kamieniai**

Atliekant genų mutacijų tyrimus labiausiai yra naudojami haploidinis kamienas XV 185-14C ir diploidinis kamienas D₇. 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 tiriamąją medžiagą ir tirpiklio kontroles. Nustatant kiekvieną specifinę galutinę mutaciją, naudojamos atitinkamos teigiamos kontrolės.

Veikimo koncentracija

Reikėtų naudoti mažiausiai penkias, tinkamai atskirtas tiriamosios medžiagos koncentracijas. Toksinių medžiagų atveju, didžiausia tiriamoji 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.

▼B**Tikslių kopijų skaičius**

Atliekant prototrofų, atsirandančių dėl genų mutacijų bei ląstelių gyvybingumo tyrimą, 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 lėkščių tam, kad gaunami duomenys būtų statistiškai patikimi.

Procedūra

S. cerevisiae kamienai paprastai veikiami tiriamąja medžiaga, ląstelėms esant stacionarinėje arba augimo stadijoje skystoje terpėje. Iš pradžių eksperimentai atliekami su ląstelėmis, esančiomis augimo stadijoje; 1-5x10 ląstelių/ml veikiamos tiriamąja medžiaga 18 valandų 28–37 °C temperatūroje ant kratyklės; jeigu reikia, veikimo metu į terpę įnešamas atitinkamas metabolinės 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. TYRIMO ATASKAITA**

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

- panaudotas kamienas,
- tyrimo sąlygos: ląstelių stacionarioji ar augimo fazė, terpės sudėtis, inkubacijos temperatūra ir trukmė, metabolinės 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 interpretavimas.

3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. NUORODOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼ B**B.16. MITOZINĖ REKOMBINACIJA – *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. SAVOKOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. TYRIMO 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 krosingoveriu, kurio metu susiformuoja atvirkštiniai produktai, tuo tarpu, kai rekombinacijos genų viduje metu susidaro neatvirkštiniai produktai, vadinami genų konversijomis. Apskritai, krosingoveris įvertinamas pagal homozigotinių kolonijų arba sektorių, turinčių recesyvinius genų alelius, produkcijos laipsnį heterozigotiniame kamienne, tuo tarpu genų konversija vertinama pagal prototrofinių revertantų, susiformavusių auktotrofiniame heteroaleliniame kamienne, turinčiame du neveiklius to paties geno alelius, skaičių. Siekiant nustatyti mitozinio geno konversiją, dažniausiai naudojami šie kamieniai: D4 (heteroalelinis pagal *ade 2* ir *trp 5*), D7 (heteroalelinis pagal *trp 5*), BZ34 (heteroalelinis pagal *org 4*) ir JD1 (heteroalelinis 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. TYRIMO METODO APIBŪDINIMAS*Pasiruošimas tyrimui*

Prieš pradėdant tyrimą, panaudojant atitinkamą prietaisą, reikėtų paruošti tiriamųjų ir kontrolinių medžiagų tirpalus. Jei tiriami 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 tiriamosiomis medžiagomis, esant arba nesant egzogeninės metabolinės aktyvacijos sistemos. Grauzikų, iš anksto paveiktų fermentus skatinančiais agentais, kepenų postmitochondrinė frakcija praturtinta kofaktoriais yra plačiausiai naudojama metabolinė aktyvacijos sistema. Metabolinei aktyvacijai galima naudoti ir kitų rūšių bei audinių postmitochondrines frakcijas bei procedūras.

▼B*Tyrimo sąlygos*

Tiriamieji kamieniai

Dažniausiai naudojami diploidiniai D₄, D₅, D₇ 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 tiriamąją medžiagą ir tirpiklio kontroles. Nustatant kiekvieną specifinę galutinę rekombinaciją, naudojamos atitinkamos teigiamos kontrolės.

Veikimo koncentracijos

Reikėtų naudoti mažiausiai penkias, tinkamai atskirtas tiriamosios medžiagos koncentracijas. Reikėtų apsvarstyti citotoksiškumą ir tirpumą. Mažiausia koncentracija neturi įtakoti ląstelių gyvybingumo. Toksinių medžiagų atveju, didžiausia tiriamoji 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 krosingoverio, 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.

▼B**Tikslių kopijų skaičius**

Atliekant prototrofų, atsirandančių dėl mitozinio geno konversijos bei ląstelių gyvybingumo tyrimą, 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.

Procedūra

S. cerevisiae kamienai paprastai veikiami tiriamąja medžiaga, ląstelėms esant stacionarinėje arba augimo stadijoje skystoje terpėje. Iš pradžių eksperimentai atliekami su ląstelėmis, esančiomis augimo stadijoje; $1-5 \times 10^7$ ląstelių/ml veikiamos tiriamąja 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. TYRIMO ATASKAITA**

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

- panaudotas kamienas,
- tyrimo 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 interpretavimas.

▼B

3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼B**B.17. MUTAGENIŠKUMAS – ŽINDUOLIŲ LĄSTELIŲ GENŲ MUTACIJŲ TYRIMAS *IN VITRO*****1. METODAS**

Šis metodas pakartoja OECD TG 476, žinduolių ląstelių genų mutacijų tyrimą *in vitro* (1997).

1.1 ĮVADAS

Žinduolių ląstelių genų mutacijų tyrimas *in vitro* gali būti naudojamas siekiant aptikti cheminių medžiagų sukeltas mutacijas. Tinkamoms ląstelių linijoms priklauso pelių limfomos ląstelių linija L5178Y, kuniškojo žiurkėno ląstelių linijos CHO, CHO-ASS2 bei V79 ir žmogaus limfoblastų linija TK (1). Naudojant šias linijas, dažniausiai įvertinamos timidinkinazė (TK) bei hipoksantinguanin-fosforiboziltransferazė (HFRT) koduojančių genų bei ksantinguanin-fosforiboziltransferazė (KFRT) koduojančio transgeno mutacijos. Atliekant TK, KFRT bei HFRT koduojančių genų mutacijų tyrimus, 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 tyrimą *in vitro*, galima naudoti gerai žinomas ląstelių linijas ar kamienus. Tyrimo metu naudojamos ląstelės atrenkamos pagal sugebėjimą augti kultūroje bei stabilumą spontaniškai vykstančių mutacijų atžvilgiu.

Bendru atveju, kai tyrimai atliekami *in vitro*, reikia naudoti egzogeninę 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 tyrimas naudojamas atrinkti galimus žinduolių mutagenus bei karcinogenus. Daugelis junginių, kurie šio tyrimo metu pasirodo esą teigiami, yra žinduolių karcinogenai, tačiau nėra aiškaus tarpusavio ryšio tarp šio tyrimo ir karcinogeniškumo. Tarpusavio ryšys priklauso nuo cheminių medžiagų klasės ir vis daugėja įrodymų, kad šio tyrimo metu negalima nustatyti kai kurių karcinogenų, galbūt dėl to, kad jie nepasižymi genotoksiškumu arba bakterinėse ląstelėse veikia visiškai kitaip (6).

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2 SĄVOKOS

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 tarpus ar iškritas.

▼ B

Fenotipinės ekspresijos laikas – laiko periodas, per kurį nepakitusio geno produktai pašalinami iš naujai mutavusių ląstelių.

Mutavimo dažnis – mutantinių ir gyvų ląstelių skaičiaus santykis.

Absolūtus 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 tiriamąja medžiaga, kloninio augimo efektyvumas tuo metu, kai, pasibaigus ekspresijai, jos pasėjamos į terpę, esant sąlygoms, naudojamoms atrankai.

Išgyvenimas – ląstelių, paveiktų tiriamąja medžiaga, kloninio augimo efektyvumas tuo metu, kai baigiantis veikimui tiriamąja medžiaga, jos pasėjamos į terpę; bendru atveju išgyvenimas lyginamas su kontrolinės ląstelių populiacijos išgyvenimu.

1.3 TYRIMO METODO PRINCIPAS

Ląstelės, nesugebančios sintetinti timidinkinazės (TK) dėl mutacijos $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$, yra atsparios pirimidino analogo – trifluortimidino (TFT) – sukeliamiems citotoksiniams efektams. 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 atrinkamos pagal atsparumą 6-tioguaninui (TG) arba 8-azaguaninui (AG). Jeigu žinduolių genų mutacijos yra tiriamos, panaudojant agentą, kuris yra naudojamas ląstelių atrankai ir yra bazių analogas arba cheminis junginys, tai reikia ypač atkreipti dėmesį į tiriamosios cheminės medžiagos savybes. Pavyzdžiui, reikia tirti bet kokią įtarimą keliantį tiriamosios medžiagos toksiškumą mutantinių ir normalių ląstelių atžvilgiu. Taigi atrankos sistemos arba atrankos agento parinkimas turi būti patvirtinamas tada, kai tiriamos cheminės medžiagos, savo struktūra panašios į agentą (8).

Ląstelės, esančios suspensijoje arba vienasluoksnėje kultūroje, veikiamos tiriamąja medžiaga, esant arba nesant metabolinės aktyvacijos sistemos ir prieš pradedant tyrimą 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 tiriamąja medžiaga. Kultūros, paveiktos tiriamąja 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 naudojamą agentą tam, kad, siekiant įvertinti kloninio augimo efektyvumą, būtų identifikuotos mutantinės ląstelės, esančios terpėje, neturinčioje atrankai naudojamą agentą. Pasibaigus inkubacijai, suskaičiuojamos kolonijos. Mutavimo dažnis nustatomas, suskaičiavus kolonijas, kuriose įvyko mutacijos ir kurios buvo auginamos terpėje, turinčioje arba neturinčioje atrankai naudojamą agentą.

▼B

1.4 TYRIMO METODO APRAŠYMAS

1.4.1 **Preparatai**1.4.1.1 *Ląstelės*

Šio tyrimo metu galima naudoti įvairius ląstelių tipus, įskaitant L5171Y, CHO, CHO-AS52, V79 klonus arba TK6 ląsteles. Tyrimo 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 tyrimą, jos nėra naudojamos.

Tyrimas parengiamas taip, kad jis būtų atliekamas, esant kuo didesniai nustatymo jautrumui bei visapusiškumui. Naudojamų ląstelių bei jų kultūrų skaičius ir tiriamosios medžiagos koncentracijos turi atspindėti šiuos apibrėžtus parametrus (14). Minimalus, gyvų ląstelių, išlikusių po veikimo tiriamąja medžiaga bei naudojamų kiekviename tyrimo 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 tyrimas atliekamas nuosekliai.

1.4.1.2 *Terpė ir kultivavimo sąlygos*

Reikia naudoti atitinkamą terpę, skirtą kultivavimui bei laikytis atitinkamų inkubavimo sąlygų (kultivavimo indai, temperatūra, CO₂ koncentracija ir drėgmė). Terpė turi būti parinkta atsižvelgiant į šio tyrimo 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 pradėdant šį tyrimą, kultūros turi būti išgryninamos, kad būtų atsikratyta jau anksčiau esančių mutantinių ląstelių.

1.4.1.4 *Metabolinė aktyvacija*

Ląstelės inkubuojamos su tiriamąja chemine medžiaga, tiek esant, tiek ir nesant atitinkamos metabolinės aktyvacijos sistemos. Plačiausiai vartojama sistema yra post-mitochondrinė frakcija, išskirta iš griaužikų kepenų, paveiktų tokiais fermentinį aktyvumą skatinančiais agentais 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 tyrimo metu naudojamoje galutinėje terpėje siekia nuo 1–10 % (v/v). Metabolinės aktyvacijos sistema pasirenkama priklausomai nuo tiriamosios cheminės medžiagos klasės. Kai kuriais atvejais tikslinga varoti daugiau nei post-mitochondrinės frakcijos koncentraciją.

▼B

Endogeninę aktyvaciją gali pagerinti daug tuo tikslu padarytų pasiekimų, įskaitant ir genetinės inžinerijos pagalba gautos ląstelių linijas, kurios gamina specifinius fermentus, dalyvaujančius aktyvacioje. Tyrime naudojamos ląstelių linijos pasirenkamos moksliai pagrįstai (pavyzdžiui pagal citochromo P450 izofermento svarbą tiriamos cheminės medžiagos metabolizmui).

1.4.1.5 *Tiriamosios medžiagos/Paruošimas*

Kietosios tiriamosios medžiagos turi būti ištirpinamos arba suspenduojamos atitinkamuose tirpikliuose arba tirpinamuosiuose įrenginiuose ir, jeigu reikia, tai prieš tai, kai šia medžiaga bus paveiktos ląstelės, jos yra praskiedžiamos. Prieš paveikiant ląsteles skystosiomis tiriamosiomis medžiagomis arba po veikimo, šios medžiagos gali būti tiesiogiai įnešamos į tiriamąsias sistemas ir praskiedžiamos. Tiriamosios medžiagos preparatai gaminami prieš kiekvieną tyrimą, neatsižvelgiant į tai, kad šių medžiagų stabilumo tyrimo duomenys tenkina saugojimo sąlygas.

1.4.2 **Tyrimo sąlygos**

1.4.2.1 *Tirpiklis/tirpinantysis įrenginys*

Nesitikima, kad tirpiklis/tirpinantysis įrenginys chemiškai nereaguos su tiriamąja chemine medžiaga ir atitiks ląstelių išgyvenimą bei S9 aktyvumą. Jeigu naudojami kiti, skirtingai nei žinomi, tirpikliai/-tirpinantieji įrenginiai, tai prieš pradedant juos vartoti, reikia pateikti jų tinkamumą įrodančius duomenis. Jei yra įmanoma, tai pirmiausia rekomenduojama naudoti skystosios fazės tirpiklį arba tirpinantįjį įrenginį. Kai tiriamos vandenyje netirpios cheminės medžiagos, tai naudojamuose organiniuose tirpikliuose neturi būti vandens. Vandeni galima pašalinti, papildomai naudojant molekulinį filtrą.

1.4.2.2 *Veikimo koncentracijos*

Kai parenkama pati didžiausia koncentracija, tai vadovaujamasi tokiais kriterijais kaip citotoksiškumas, tirpumas tiriamojoje 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 – santykinu kloninio augimo efektyvumu arba absoliučiu santykinu augimu. Būtų naudinga citotoksiškumą bei tirpumą nustatyti išankstinio eksperimento metu.

Turi būti naudojamos bent 4 ištiriamos 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 tiksliai 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 tiriamoji koncentracija turi būti 5 mg/ml, 5 µl/ml arba 1,01 M, bet kuriai esant mažiausiai.

▼ B

Santykinai netirpios medžiagos turi būti tiriamos kultivavimo sąlygomis, jų tirpumui siekiant ribą arba esant už jos. Netirpumas turi būti nustatomas galutinėje terpėje, kuria paveikiamos ląstelės. Prieš pradedant ir baigiant veikimą tiriamąja medžiaga, būtų naudinga nustatyti tirpumą, kadangi veikimo metu tirpumas gali pakisti dėl tiriamojoje 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/tirpinantysis įrenginys) 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)	Ciklofosfamid	50-18-0	200-015-4
		Ciklofosfamidmonohidr. at.	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.

▼B

Reikia panaudoti ir neigiamus kontrolinius mėginius, sudarytus vien tik iš tirpiklio ar tirpinančiojo įrenginio ir neturinčius tiriamosios medžiagos bei paveiktus tokiu pat būdu kaip ir tiriamieji mėginiai. Be to reikia naudoti ir tiriamąją medžiagą 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 tiriamąja medžiaga*

Proliferuojančios ląstelės paveikiamos tiriamąja 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 tiriamąja medžiaga, 1 ar 2 pakartojimai. Kai atliekamas kultūrų, paveiktų tiriamąja medžiaga, vienetinis pakartojimas, tai koncentracijų skaičius padidinamas, kad užtikrinti, jog susidarys pakankamas analizuojamų kultūrų skaičius (turi būti naudojamos mažiausiai 8 tiriamosios koncentracijos). Reikia mažiausiai dukart panaudoti neigiamas (tirpikliu paveiktas) kontrolines kultūras.

Dujinės ir lakios medžiagos turi būti tiriamos atitinkamais metodais, panaudojant užsandarintus indus (21), (22).

1.4.3.2 *Išgyvenimo, gyvybingumo bei mutavimo dažnio nustatymas*

Baigiantis veikimui tiriamąja medžiaga, ląstelės perplaunamos ir pakultivuojamos, siekiant nustatyti jų išgyvenimą bei užtikrinti mutantinio fenotipo ekspresiją. Pasibaigus veikimui tiriamąja 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 ekspresuoti 6-8 dienas, o TK fenotipas – mažiausiai 2 dienas). Ląstelės auginamos terpėje, turinčioje arba neturinčioje agento, kurio 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 naudojamo agento).

Jei L5178Y TK^{+/−} tyrimo metu nustatoma, kad tiriamoji medžiaga yra teigiama, tai mažiausiai vieną kartą nustatomas tiriamųjų kultūrų (esant pačiai didžiausiai teigiamai koncentracijai) bei teigiamų ir neigiamų kontrolinių kultūrų dydis. Jei L5178Y TK^{+/−} tyrimo metu nustatoma, kad tiriamoji yra neigiama, tai nustatomas teigiamų bei neigiamų kontrolinių kolonijų skaičius. Atliekant TK6TK^{+/−} tyrimą, taipogi galima įvertinti kolonijų dydį.

▼B**2. DUOMENYS****2.1 REZULTATŲ APDOROJIMAS**

Pateikiant duomenis, turi būti nurodytas kontrolinių bei paveiktų tiriamąja medžiaga kultūrų nustatytas citotoksiškumas, gyvybingumas, kolonijų skaičius bei mutavimo dažnis. Jei atliekant L5178Y TK⁺ tyrimą buvo gautas teigiamas atsakas, tai kolonijos vertinamos, panaudojant kriterijus, skirtus mažiausiai 1 tiriamosios 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 detalai ištirta (23), (24). Atliekant TK⁺ tyrimą, 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 tyrimų 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 tyrimus, 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 tiriamų parametrų pakeitimus tam, kad, analizuojant abejotinus bei neigiamus rezultatus, būtų išplėstas įvertinamų sąlygų spektras. Koncentracijas skiriančiosios ribos bei metabolinės aktyvacijos sąlygos yra tiriamieji parametrai, kuriuos galima modifikuoti.

2.2 REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR INTERPRETAVIMAS

Egzistuoja keli teigiamo rezultato įvertinimo kriterijai, tokie kaip nuo koncentracijos priklausantis arba atkartojamas mutavimo dažnio padidėjimas. Pirmiausia reikia aptarti biologinę rezultatų reikšmę. Įvertinant tyrimo 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.

▼B

Nors daugumos eksperimentų metu gaunami aiškiai teigiami arba neigiami rezultatai, tačiau išimtiniais atvejais, remiantis visais gautais rezultatais, negalima padaryti tinkamos išvados apie tiriamos 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 tiriamoji medžiaga sukelia genų mutacijas panaudotose žinduolių ląstelėse. Nuo koncentracijos priklausantis teigiamas atsakas yra svarbiausias. Neigiami rezultatai rodo, kad, esant tyrimo sąlygoms tiriamoji medžiaga nesukelia genų mutacijų panaudotose žinduolių ląstelėse.

3. **ATASKAITA**

ATASKAITA APIE TYRIMĄ

Ataskaitoje apie tyrimą turi būti pateikiama tokia informacija:

Tirpiklis/tirpinantysis įrenginys:

- priežastys, dėl kurių buvo pasirinktas šis įrenginys,
- tiriamosios cheminės medžiagos, esančios tirpiklyje/-tirpinančiajame įrenginyje, 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.

Tyrimo sąlygos:

- pagrindinė priežastis, nulėmusi koncentracijų bei kultūrų skaičiaus pasirinkimą, įskaitant citotoksiškumo nustatymo duomenis bei tirpumo apribojimus (jei juos įmanoma nurodyti),
- terpės sudėtis ir CO₂ koncentracija,
- tiriamosios medžiagos sudėtis,
- tirpinančiojo įrenginio darbinė talpa bei į jį įdėtos medžiagos tūris,
- inkubacijos temperatūra,
- inkubacijos trukmė,
- veikimo tiriamąja medžiaga trukmė,
- ląstelių tankis veikimo metu,
- metabolinės aktyvacijos sistemos tipas bei sudėtis,
- teigiami bei neigiami kontroliniai mėginiai, įskaitant jų tinkamumo kriterijus,

▼B

- ekspresijos trukmė (įskaitant pasėtų ląstelių skaičių, subkultivavimo bei mitybai skirtų medžiagų įnešimo tvarkaraščiai, jei juos įmanoma pateikti),
- atrankos agentai,
- kriterijai, kuriais vadovaujamasi, sprendžiant, ar tyrimų 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 tiriamąją medžiagą (jei tai buvo tiriama),
- 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/-tirpinantysis įrenginys) ir teigiamus kontrolinius mėginius,
- anksčiau gauti duomenys apie neigiamus (tirpiklis/tirpinantysis įrenginys) 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.

▼ **B**

- 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 Methanesulphonate -and ICR 191- Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate -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.

▼ **B**

- 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.

▼B**B. 18. DNR PAŽAIDOS IR JŲ REPARACIJA – NEPLANUOTA DNR SINTEZĖ – ŽINDUOLIŲ LĄSTELĖSE *IN VITRO*****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. SĄVOKOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. TYRIMO METODO PRINCIPAS

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

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. TYRIMO METODO APIBŪDINIMAS

Pasiruošimas tyrimui

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

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

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

Tyrimo sąlygos

Kultūrų skaičius

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

▼B**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 tyrimą 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 tyrimas 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 tiriamosios medžiagos koncentracijų, išdėstytų dideliame intervale, pakankame atsakui nustatyti. Didžiausios koncentracijos tiriamoji medžiaga turėtų sukelti keletą citotoksinių efektų. Turėtų būti ištirti santykinai vandenyje netirpūs junginiai, kad būtų nustatyta jų tirpumo riba. Pavienio tyrimo metu turėtų būti nustatyta laisvai vandenyje tirpstančių netoksinių junginių didžiausia tiriamoji koncentracija.

Ląstelės

Kultivuojant kultūras reikėtų naudoti atitinkamą terpę ir laikytis atitinkamos CO₂ koncentracijos, temperatūros bei drėgmės. Reikėtų periodiškai tikrinti gerai žinomas ląstelių linijas, siekiant nustatyti mikoplazmų sukeltą infekciją.

Metabolinė aktyvacija

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

*Procedūra***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.

▼B**Kultūrų veikimas tiriamąja medžiaga****Pirminiai žiurkių hepatocitai**

Šviežiai išskirti žiurkių hepatocitai veikiami tiriamąja medžiaga terpėje, turinčioje $^3\text{H-TdR}$, atitinkamą laiko tarpą. Baigiantis veikimui, terpė atskiriama nuo ląstelių, kurios vėliau sudrėkinamos, fiksuojamos bei išdžiovinamos. Skaidres reikėtų panardinti į autora-diografinę emulsiją (galima naudoti ir fotografinę juostelę), ekspozuoti, išryškinti nudažyti ir suskaičiuoti ląsteles.

Gera žinomos ląstelių linijos ir limfocitai

Autoradiografija: Ląstelių kultūros veikiamos tiriamąja medžiaga atitinkamą laiko tarpą, po to veikiamos $^3\text{H-TdR}$. Laiko trukmė parenkama atsižvelgiant į tiriamosios medžiagos prigimtį, metabolitinių sistemų aktyvumus bei ląstelių tipą. Tam, kad būtų pasiekta pati intensyviausia neplanuota DNR sintezė, $^3\text{H-TdR}$ turi būti įnešamas arba vienu metu su tiriamąja medžiaga arba praėjus kelioms minutėms po to, kai buvo įnešta tiriamoji medžiaga. Kuri procedūra bus pasirinkta, nulems tarpusavio sąveika tarp tiriamosios medžiagos ir $^3\text{H-TdR}$. 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 registracija: Prieš veikiant tiriamąja medžiaga, ląstelių perėjimas į S fazę turėtų būti blokuojamas taip, kaip aprašyta anksčiau; vėliau ląstelės veikiamos tiriamąja medžiaga taip, kaip tai atliekama autoradiografijos metu. Baigiantis inkubacijos periodui, iš ląstelių išskiriama DNR ir nustatomas absoliutus DNR bei į ją įsijungusio $^3\text{H-TdR}$ 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. Kiekvienoje skaidrėje reikia suskaičiuoti keletą atsitiktinių regionų, plačiai atskirtų vienas nuo kito. Į citoplazmą įsijungusio $^3\text{H-TdR}$ 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 tiriamajame bei kontroliniame mėginiuose.

▼B

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 ^3H -TdR kiekį bei ląstelės branduolyje esančių granulių skaičių.

Apibūdinant į citoplazmą įsijungusio ^3H -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, ^3H -TdR įsijungimą išreikšti dpm/ μg DNR. Apibūdinant įsijungimo pasiskirstymą, galima panaudoti dpm/ μg DNR vidurkį bei standartinį nukrypimą.

Duomenis reikėtų įvertinti atitinkamais statistiniais metodais.

3. **ATASKAITA**

3.1. **TYRIMO ATASKAITA**

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

- panaudotos ląstelės, tankumas ir peršėjimo numeris veikimo metu, ląstelių kultūrų skaičius,
- ląstelių kultūrų kultivavimo metodai, įskaitant terpę, temperatūrą ir CO_2 koncentraciją,
- tiriamoji medžiaga, priemonė, koncentracijos ir tyrimo 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 interpretavimas.

▼B

3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼B**B.19. APSIKEITIMO SESERINĖMIS CHROMATIDEMIS TYRIMAS
*IN VITRO*****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. SĄVOKOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. TYRIMO METODO PRINCIPAS

Apsikeitimo seserinėmis chromatidėmis (ASC) tyrimas 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 molekulinį mechanizmą. 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 tiriamąja medžiaga *in vitro*,, naudojant arba nenaudojant žinduolių metabolinę 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. TYRIMO METODO APIBŪDINIMAS*Pasiruošimas tyrimui*

- Tyrimo metu galima naudoti pirmines kultūras (žmogaus limfocitai) arba gerai žinomas ląstelių linijas (pvz., kuniškojo žiurkėnų kiaušidžių ląsteles). Reikėtų patikrinti, ar ląstelių linijos neužsikrėtusios mikoplazmomis.
- Reikėtų naudoti atitinkamą kultivavimui skirtą terpę bei parinkti inkubacijos sąlygas (pvz., temperatūra, indai, skirti kultivavimui, CO₂ koncentracija bei drėgmė).
- Prieš veikiant ląsteles tiriamosiomis 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 tiriamosios medžiagos galutinė koncentracija kultivavimui skirtoje sistemoje ypatingai neįtakotų ląstelių gyvybingumo ar augimo greičio bei apsikeitimo seserinėmis chromatidėmis dažnumo.

▼B

- Ląstelės turėtų būti veikiamos tiriamąja medžiaga, esant arba nesant egzogeninei žinduolių metabolinės aktyvacijos sistemai. Jei naudojami ląstelių, turinčių metabolinę aktyvacijos sistemą, tipai, tai aktyvumo greitis ir prigimtis turėtų atitikti tiriamąją cheminių junginių klasę.

*Tyrimo 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:

- ciklofosfamidai.

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

Veikimo koncentracijos

Reikėtų naudoti mažiausiai tris tiriamosios medžiagos koncentracijas, tinkamai atskirtas vieną nuo kitos. Didžiausia koncentracija turėtų sukelti intensyvų toksinį efektą, tačiau nesutrukdyti ląstelių replikacijos ciklui vykti. Panaudojant atitinkamas procedūras turėtų būti tiriami santykinai vandenyje netirpūs junginiai, kad būtų nustatyta jų tirpumo riba. Pavienio tyrimo metu turėtų būti nustatyta laisvai vandenyje tirpstančių netoksinių junginių didžiausia tiriamoji koncentracija.

*Procedūra***Kultūrų paruošimas**

Gerei 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.

▼B**Veikimas**

Ląstelės, esančios eksponentinėje augimo fazėje, veikiamos tiriamąja medžiaga atitinkamą laiko tarpą; dažniausiai užtenka 1-2 valandų, tačiau konkrečiais atvejais veikimas gali būti pratęsiamas iki dviejų ląstelinių ciklų. Ląstelės, nepasižyminčios pakankamu metabolitiniu aktyvumu, turėtų būti veikiamos tiriamąja medžiaga, esant ar nesant atitinkamai metabolitinės aktyvacijos sistemai. Baigiantis veikimui, ląstelės atplaunamos nuo neprisirišusios tiriamosios medžiagos ir kultivuojamos du replikacijos periodus terpėje, turinčioje bromdeoksiuridino. Ląsteles galima veikti vienu metu tiriamąja 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 tiriamąja 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. Skaidrės, skirtos apsikeitimo seserinėmis chromatidėmis demonstravimui, gali būti dažomos 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. Skaidrės užkoduojamos 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.

▼B**3. ATASKAITA****3.1 TYRIMO ATASKAITA**

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

- panaudotos ląstelės, ląstelių kultūrų kultivavimo metodai,
- tyrimo sąlygos: terpės sudėtis, CO₂ koncentracija, tiriamosios medžiagos koncentracija, panaudota priemonė, inkubacijos temperatūra, veikimo laikas, panaudotas verpstės išsisukimo inhibitorius, jo koncentracija ir veikimo inhibitoriumi trukmė, panaudotos žinduolių metabolinės aktyvacijos sistemos tipas, teigiamos ir neigiamos kontrolės,
- ląstelių kultūrų, naudotų kiekviename eksperimento etape, skaičius,
- skaidrių paruošimo metodo aprašymas,
- išanalizuotų metafazių skaičius (kiekvienos kultūros tyrimų duomenys pateikiami atskirai),
- apskaitos seserinėmis chromatidėmis vienoje ląstelėje ir vienoje chromosomoje vidurkis (kiekvienos kultūros tyrimų duomenys pateikiami atskirai),
- apskaitos seserinėmis chromatidėmis vertinimo kriterijai,
- dozės pasirinkimo kriterijai,
- dozės ir atsako sąsaja, jei įmanoma,
- statistinis įvertinimas,
- rezultatų aptarimas,
- rezultatų interpretavimas.

3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. NUORODOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼B**B.20. SU LYTIMI SUSIJĘS RECESYVINIS LETALUS TESTAS
DROSOPHILA MELANOGASTER TARPE****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. SĄVOKOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. TYRIMO 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 testas 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, specifiskai pažymint bei išdėstant chromosomas.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. TYRIMO METODO APIBŪDINIMAS

Pasiruošimas tyrimui

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.

T i r i a m o j i m e d ž i a g a

Tiriamosios medžiagos turėtų būti tirpinamos vandenyje. Prieš pradėdant 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 dimetil-sulfoksidą (DMSO) kaip tirpinimo priemonę.

▼B**G y v ū n ū s k a i č i u s**

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 tiriamąja medžiaga ir kurios turi būti analizuojamos, skaičiui.

D a v i m o b ū d a s

Tiriamoji medžiaga gali būti duodama per os būdu, ją injekuojant arba veikiant dujomis ar garais. Tiriamąją 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.

T e i g i a m ū i r n e i g i a m ū k o n t r o l i ū n a u d o j i m a s

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

V e i k i m o d o z ė

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

P r o c e d ū r a

Laukinio tipo patinai (3-5 dienų amžiaus) veikiami tiriamąja 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 efektus 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 tiriamos 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 nustatytą letalių chromosomų skaičių, esant kiekvienai tiriamosios medžiagos koncentracijai, reikėtų registruoti skirtingų dydžių genų klasterių kiekvieno patino genome skaičių. Šie rezultatai turi būti patvirtinti, atlikus atskirą eksperimentą.

▼B

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. **TYRIMO ATASKAITA**

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

- padermė: panaudotos *Drosophila* padermės ar kamienai, vabzdžių amžius, paveiktų patinų skaičius, streilių 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,
- tyrimo sąlygos: detalus veikimo ir mėginių paėmimo tvarkaraštis, veikimo koncentracijos, toksiškumo tyrimo duomenys, neigiamos (tirpiklis) ir teigiamos kontrolės, jeigu reikia,
- letalių mutacijų įvertinimo kriterijai,
- dozės ir atsako sąsaja, jei įmanoma,
- duomenų įvertinimas,
- rezultatų aptarimas,
- rezultatų interpretavimas.

3.2. **ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼B**B.21. ŽINDUOLIŲ LĄSTELIŲ TRANSFORMACIJOS TESTAI *IN VITRO*****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. SĄVOKOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. TYRIMO METODO PRINCIPAS

Siekiant nustatyti cheminių agentų, sukeliančių ląstelių piktybinę transformaciją *in vivo* ir ląstelių fenotipo pokyčius *in vitro*, gali būti naudojamos žinduolių ląstelių kultūrų sistemos. Plačiai naudojamoms ląstelių linijoms priklauso C3H10T1/2, 3T3, SHE bei Fischer žiurkių ląstelės ir testai grindžiami ląstelių morfologijos pokyčiais, ligos židinio formavimosi bei pri si tvirtinimo prie pusiau kieto agaro pokyčių tyrimais. Mažiau naudojamoms sistemoms priklauso tos, kurios naudojamos fiziologiniams bei morfologiniams ląstelių, paveiktų karcinogeninėmis cheminėmis medžiagomis, pokyčiams nustatyti. Nė vieno *in vitro*, testų metu nebuvo nustatyta mechanistinio ryšio tarp vėžio ir ląstelių pokyčių. Naudojant kai kurias tiriamąsias sistemas, galima nustatyti protoonkogenų promotorius. Įvertinant tiriamosios medžiagos įtaką ląstelių kultūrų sugebėjimui suformuoti kolonijas (klonavimo efektyvumas) arba augimo greičiams, galima nustatyti citotoksiškumą. Citotoksiškumo įvertinamas tam, kad būtų nustatyta, jog tiriamoji medžiaga, kuria buvo veikama, sukelia toksikologinį efektą ir kurios negalima naudoti visuose tyrimuose, apskaičiuojant transformacijos dažnį, kadangi šiuo atveju ląstelių inkubaciją ar persėjimą reikėtų pratęsti.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. TYRIMO METODO APIBŪDINIMAS

Pasiruošimas tyrimui

Ląstelės

Priklausomai nuo naudojamo testo transformacijai įvertinti, galima naudoti įvairiausias ląstelių linijas ar pirmines ląsteles. Tyrėjas privalo užtikrinti, kad tiriamąsias ląsteles paveikus žinomais karcinogenais, šiose pasireiškia atitinkami fenotipiniai pokyčiai ir kad įrodyta bei dokumentiškai patvirtinta, jog tyrėjo laboratorijoje vartojamas testas yra oficialiai pripažįstamas ir patikimas.

Terpė

Atliekant transformacijos tyrimą, reikėtų naudoti atitinkamą terpę bei parinkti atitinkamas eksperimentines sąlygas.

▼B**Tiriamoji medžiaga**

Prieš veikiant ląsteles, tiriamosios medžiagos gali būti paruošiamos kultivavimui skirtose terpėse arba ištirpinamos ar suspenduojamos atitinkamomis priemonėmis. Tirpinančiosios priemonės galutinė koncentracija ląstelių kultūrų sistemoje neturėtų įtakoti ląstelių gyvybingumo, augimo greičio ar pasitaikančios transformacijos.

Metabolitinė aktyvacija

Ląstelės turėtų būti veikiamos tiriamąja medžiaga, tiek esant, tiek ir nesant metabolitinės aktyvacijos sistemos. Kai naudojami ląstelių, pasižyminčių metabolitiniu aktyvumu, tipai, tai aktyvumo prigimtis turėtų atitikti tą klasę, kuriai priklauso naudojamas cheminis junginys.

*Tyrimo sąlygos***Teigiamų ir neigiamų kontrolių naudojimas**

Kiekvieno eksperimento metu reikėtų naudoti teigiamas kontroles, sudarytas tiek iš tiesiogiai veikiančio junginio, tiek iš junginio, kurį reikia metabolitiškai aktyvuoti; taipogi reikėtų naudoti ir neigiamas (priemonė) kontroles.

Žemiau pateikiamos medžiagos, kurias galima naudoti kaip teigiamas kontroles:

— tiesiogiai veikiantys junginiai:

— etilmetansulfonatas,

— β -opropiolaktonas,

— 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 tiriamoji medžiaga.

Veikimo koncentracijos

Tiriamąją medžiagą reikėtų vartoti keliomis koncentracijomis. Šios koncentracijos turėtų sukelti nuo koncentracijos priklausomą toksinį efektą, 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 tiriami santykinai vandenyje netirpūs junginiai, kad būtų nustatyta jų tirpumo riba. Pavienio tyrimo metu turėtų būti nustatyta laisvai vandenyje tirpstančių netoksinių junginių didžiausia tiriamoji koncentracija.

▼B*Procedūra*

Ląstelės turėtų būti veikiamos atitinkamą laiką, priklausomai nuo naudojamos tyrimo sistemos ir veikimo metu galima pakartotinai veikti su ta pačia medžiagos doze, pakeičiant terpę (jei būtina, į terpę įnešama šviežiai paruošto metabolitinės aktyvacijos mišinio), jei veikimo laikas pailginamas. Ląstelės, nepasižyminčios efektyviai veikiančia metabolitine aktyvacija, turėtų būti veikiamos tiriamąja medžiaga, esant arba nesant atitinkamai metabolitinės aktyvacijos sistemai. Baigiantis veikimui, ląstelės atplaunamos nuo neprisirišusios tiriamosios 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 tyrimo, 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. **TYRIMO ATASKAITA**

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

- panaudotų ląstelių tipas, ląstelių kultūrų skaičius, ląstelių kultūrų kultivavimo metodai,
- tyrimo sąlygos: tiriamosios 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 interpretavimas.

3.2. **ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼ B**B.22. GRAUŽIKŲ DOMINANTINIS LETALINIS TESTAS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. SĄVOKOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. TYRIMO METODO PRINCIPAS

Dominantiniai letalūs efektai sukelia embriono arba gemalo mirtį. Veikiant chemine medžiaga, sukeliami dominantiniai letalūs efektai, kurie rodo, kad tiriamoji medžiaga paveikė tiriamosios rūšies gyvūnų embrionų audinius. Apskritai manoma, kad dominantiniai letalūs efektai pasireiškia dėl chromosomų pažeidimų (struktūrinės anomalijos arba chromosomų skaičiaus pokyčiai). Jei patelės paveikiamos medžiaga, ir jų embrionai žūsta, tai šitai taipogi įvyksta dėl toksinių efektų.

Apskritai, gyvūnų patinai paveikiami tiriamąja medžiaga, o vėliau poruojami su nekaltomis patelėmis, nepaveiktomis tiriamąja medžiaga. Poruojant individus pačiam, 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 tiriamos bei kontrolinės grupės patelėse skaičių. Absoliutus dominantinis letalus efektas apima nesėkmes, atliekant išankstinę bei vėlesnę implantacijas. Absoliutaus dominantinio letalaus efekto įvertinimas paremtas gyvų implantų, esančių tiriamos 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. TYRIMO METODO APIBŪDINIMAS*Pasiruošimas tyrimui*

Jei įmanoma, tiriamosios 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 tiriamajai cheminei medžiagai veikti, nei toksiniams efektams pasireikšti. Reikėtų naudoti šviežiai paruoštus tiriamosios cheminės medžiagos preparatus.

▼B*Tyrimo sąlygos***D a v i m o b ū d a s**

Paprastai tiriamasis junginys turėtų būti duodamas vieną kartą. Remiantis toksikologine informacija, veikimą galima pakartoti. Paprastai tiriamoji medžiaga duodama per os, į trachėją įvedamu vamzdeliu arba injekuojant tiriamąją medžiagą į pilvą. Medžiagą galima duoti ir kitais būdais.

E k s p e r i m e n t i n i a i g y v ū n a i

Rekomenduojama tirti žiurkes arba peles. Sveiki visiškai lytiškai subrendę gyvūnai atsitiktinai pasirenkami ir suskirstomi į tiriamąją bei kontrolines grupes.

S k a i č i u s i r l y t i s

Atsižvelgiant į spontanineę tiriamos biologinės rūšies variaciją, reikėtų naudoti pakankamą skaičių patinų, paveiktų tiriamąja medžiaga. Skaičius turėtų būti pasirenkamas, remiantis iš anksto nustatyto tyrimo testo jautrumu bei gaunamų duomenų patikimumu. 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.

T e i g i a m ų i r n e i g i a m ų k o n t r o l i ų n a u d o j i m a s

Atliekant kiekvieną eksperimentą, paprastai vienu metu reikėtų naudoti teigiamą bei neigiamą (priemonė) kontroles. Kai galima susipažinti su toje pačioje laboratorijoje ką tik atliktų eksperimentų, naudojant teigiamas kontroles, 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), kad būtų parodytas tyrimo testo jautrumas.

V e i k i m o d o z ė

Reikėtų naudoti tris veikimo dozes. Didelė dozė turėtų sukelti toksiškumo požymius arba sumažinti gyvūnų, paveiktų tiriamąja medžiaga, vaisingumą. Konkrečiais atvejais užtenka ir pavienės didelės dozės.

R i b ų t y r i m a s

Duodant netoksines tiriamąsias medžiagas vieną kartą, jų koncentracija turi siekti 5 g/kg, o duodant pakartotinai – 1 g/kg.

Procedūra

Tiriamąsias medžiagas galima duoti įvairiai. Dažniausiai tiriamoji medžiaga duodama vieną kartą.

Pasibaigus veikimui, atitinkamais laiko tarpais pavieniai patinai paeiliui poruojami su tiriamąja medžiaga nepaveiktomis nekaltomis patelėmis. Patelės paliekamos su patiniais laiko tarpui, lygiam vienai rukai arba tol, kol jie susiporuos, o tai nustatoma pagal spermą patekimą į makštį arba pagal makšties kamščio susidarymą.

▼B

Pasibaigus veikimui, atliekama tiek poravimų, kiek yra numatyta veikimo tvarkaraštyje bei turėtų būti užtikrinta, kad pasibaigus veikimui, mėginai paimami atskirais embrioninės ląstelės vystymosi etapais.

Patelės numarinamos praėjus pusei nėštumo periodo ir gimdos turinys tiriamas 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 nėščių bei nenėščių patelių skaičių. Reikėtų atskirai registruoti kiekvieno suporavimo rezultatus, nurodant kiekvieno patino ir patelės tapatybę. Taipogi kiekvienos patelės atveju reikėtų registruoti suporavimo savaitę, dozę, gautą iš patinų, gyvų bei negyvų implantų egzistavimo dažnį.

Absoliutus dominantinių letalių efektų skaičius nustatomas, lyginant gyvų implantų skaičių tiriamosios bei kontrolinės grupės patelėse. Tiriamosios grupės patelių gyvų bei negyvų implantų skaičiaus santykis palyginamas su tokiu pačiu kontrolinės grupės implantų skaičiaus santykiu tam, kad nustatyti, ar implantacija nepavyko.

Jei tarp pateikiamų duomenų, nurodomos ankstyvosios bei vėlyvosios mirtys, tai šitai turi būti aiškiai parodyta lentelėse. Jeigu nustoma, 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 tiriamoj oje grupėje, lyginant su poravimais kontrolinėje grupėje.

Rezultatai turėtų būti įvertinti atitinkamais statistiniais metodais.

3. **ATASKAITA**

3.1. **TYRIMO ATASKAITA**

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

- rūšis, kamienas, panaudotų gyvūnų amžius bei svoris, eksperimentinėje bei kontrolinėse grupėse esančių kiekvienos lyties gyvūnų skaičius,
- tiriamoji medžiaga, priemonė, dozės, ir dozių pasirinkimo kriterijai, neigiamos ir teigiamos kontrolės, toksiškumo tyrimų 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,

▼B

- statistinis įvertinimas,
- rezultatų aptarimas,
- rezultatų interpretavimas.

3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. NUORODOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼B**B.23. ŽINDUOLIŲ SPERMATOGONIJŲ CHROMOSOMŲ
ABERACIJOS TYRIMAS****1. METODAS**

Šis metodas pakartoja OECD TG 483 Žinduolių spermatogonėjų chromosomų aberacijos tyrimą (1997).

1.1 ĮVADAS

Žinduolių spermatogonių chromosomų aberacijos tyrimo *in vivo* tikslas – identifikuoti medžiagas, sukeliančias žinduolių spermatogonių chromosomų struktūrines aberacijas (1) (2) (3) (4) (5). Struktūrinės aberacijos gali būti 2 tipų: chromosominės ir chromatidinės. Dauguma mutagenų sukelia chromosominės 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 tyrimo metu nustatomi spermatogeninių gemalinių ląstelių chromosomų pokyčiai, kuriais remiantis prognozuojama apie paveldimų mutacijų atsiradimą gemalinėse ląstelėse.

Atliekant šį tyrimą bendru atveju, panaudojami graužikai. Šio citogenetinio tyrimo metu *in vivo* nustatomos chromosominio tipo aberacijos, atsirandančios spermatogonių mitozinėse chromosomose. Kitos ląstelės nėra naudojamos šiam tyrimui atlikti.

Tam, kad spermatogonijose būtų identifikuotos chromatidinės aberacijos, tiriama ląstelių pirmoji mitozė, vykstanti iškart po to, kai ląstelės buvo paveiktos tiriamąja medžiaga tam, kad, ląstelėms dalijantis, šie pakitimai nebūtų prarandami. Papildomą informaciją apie tiriamąją medžiagą paveiktas spermatogonių kamienines ląsteles galima gauti, analizuojant mejozines chromosomas bei ieškant chromosominių aberacijų ląstelių, esančių I diakinezės metafazės stadijoje, kai šios, paveiktos tiriamąja medžiaga, tampa spermatocitais, chromosomose.

Šio tyrimo, atliekamo *in vivo* sąlygomis, metu siekiama nustatyti, ar somatinių ląstelių mutacijas sukeliantys mutagenai, gali jas sukelti ir gemalinėse ląstelėse. Be to, spermatogonių tyrimas yra svarbus, įvertinant mutagenų padarytą žalą, pagal kurią sprendžiama apie faktorių, reguliuojančių metabolizmą, farmakokinetiką bei DNR pažeidimų atstatymo procesus, reikšmę.

Sėklidėse yra daug skirtingoms generacijoms priklausančių spermatogonių, kurios tarpusavyje skiriasi pagal jautrumą cheminių medžiagų poveikiui. Todėl identifikuotos aberacijos parodo spermatogonių populiacijų, kurių pagrindinę dalį sudaro daug diferencijuotų spermatogonių, paveiktų tiriamąja medžiaga, bendrąjį atsaką. Priklausomai nuo jų lokalizacijos sėklidėse, skirtingų generacijų spermatogonė'os gali arba patekti arba nepatekti į bendrąją cirkuliaciją, nes egzistuoja fizinis ir fiziologinis (Sertoli ląstelių bei kraujo ir sėklidžių) barjerai.

Jeigu nustatoma, kad tiriamoji medžiaga arba reaktyvusis metabolitas nepasiekia audinio, į kurį buvo nukreiptas, tai šio tyrimo metu jis daugiau nebenaudojamas.

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼B

1.2 SAVOKOS

Chromatidinė aeracija – chromosomos struktūros pakeitimas, sukuriant trūkį seserinėse chromatidėse ar tarp jų ir neleidžiant joms pakartotinai susijungti.

Chromosominė aeracija – chromosomos struktūros pakeitimas, sukuriant arba trūkį, arba trūkį ir susijungimą toje pačioje vietoje abiejose seserinėse chromatidėse.

Plyšys – achromatinė spraga, kurios plotis mažesnis už vienos chromatidės plotį ir chromatidė mažiausią skaičių klaidingai suporuotų bazių.

Chromosomų skaičiaus aeracija – normalaus chromosomų, esančių ląstelėse, skaičiaus pokytis.

Poliploidiskumas – haploidinio chromosomų skaičiaus (skirtingai nei haploidinio skaičiaus $-3n, 4n \dots$) – didėjimas.

Struktūrinė aeracija – chromosomos struktūros pokytis, kurį galima nustatyti, mikroskopu analizuojant ląsteles, esančias dalijimosi ciklo metafazėje ir kuris atrodo kaip fragmentų, esančių tarp grandinių bei jų viduje, delecijos.

1.3 TYRIMO METODO PRINCIPAS

Gyvūnai veikiami tiriamąja chemine medžiaga pagal atitinkamą veikimo chemine medžiaga metodiką ir atitinkamais laiko momentais po veikimo, numarinami. Prieš numarinimą gyvūnai paveikiami agentu, sustabdančiu 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 TYRIMO METODO APRAŠYMAS

1.4.1 Paruošimas

1.4.1.1 *Gyvūnų rūšies pasirinkimas*

Paprastai naudojami kuniškų žiurkėnų ir pelių patinėliai. Tačiau gali būti naudojami ir kitų atitinkamų žinduolių rūšių patinai. Reikia naudoti visuotinai naudojamus jaunų sveikų subrendusių gyvūnų kamienus. Tyrimo pradžioje gyvūnų svorio variacija turi būti minimali ir neviršyti $\pm 20 \%$ 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 tiriamąją (kuriai priskirti individai bus paveikti chemine medžiaga) grupes. Narvai išdėstomi taip, kad būtų iki minimumo sumažinti aplinkos efektai, susiję su narvų laikymu. Kiekvienas gyvūnas turi savo identifikacijos ženklą. Prieš pradedant tyrimą, gyvūnams leidžiama aklimatizuotis prie laboratorinių sąlygų mažiau-siai per 5 dienas.

▼B

1.4.1.4 *Dozių paruošimas*

Kietosios tiriamosios cheminės medžiagos ištirpinamos arba suspensuojamos atitinkamuose tirpikliuose ar tirpinamuosiuose įrenginiuose ir jei reikia, tai, prieš paruošiant jų dozes, skirtas gyvūnams, jos praskiedžiamos. Skystųjų tiriamųjų medžiagų dozės ruošiamos iškart arba prieš dozių paruošimą, jos praskiedžiamos. Prieš kiekvieną bandymą šviežiai paruošiami tiriamosios cheminės preparatai ir neatšizvelgiama į stabilumo tyrimo metu gautus duomenis, rodančius, kad medžiaga atitinka jos laikymui keliamus reikalavimus.

1.4.2 **Tyrimo sąlygos**

1.4.2.1 *Tirpiklis/tirpinantysis įrenginys*

Tirpiklis ar tirpinantysis prietaisas neturėtų sukelti jokio toksinio efekto, atitinkančio vartojamas dozes ir neturėtų kilti spėlionių, kad jis gali chemiškai reaguoti su tiriamąja medžiaga. Jeigu naudojami kiti, skirtingai nei žinomi, tirpikliai/tirpinantieji įrenginiai, tai prieš pradedant juos vartoti, reikia pateikti jų tinkamumą įrodančius duomenis. Jei yra įmanoma, tai pirmiausia rekomenduojama naudoti skystosios fazės tirpiklį arba tirpinantįjį įrenginį.

1.4.2.2 *Kontroliniai mėginiai*

Kiekvieno tyrimo metu turi būti tiriami iš kiekvienai lyčiai priklausančių gyvūnų paimti vienu metu naudojami teigiami ir neigiami (tirpiklis/tirpinantysis įrenginys) kontroliniai mėginiai. Išskyrus tą atvejį, kai gyvūnai veikiami tiriamąja medžiaga, kontrolinės grupės gyvūnai turi būti laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip ir gyvūnai, paveikti tiriamąja chemine medžiaga (tiriamoji grupė).

Spermatogoninių ląstelių, paveiktų tokia pačia tiriamosios 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 efektai būtų ryškūs, bet kad tyrėjas ne iškart dešifruotų užkoduotas skaidres. Priimtina, kad teigiami kontroliniai mėginiai būtų duodami gyvūnams kitaip nei tiriamoji 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.
ciklofosfamidą	50-18-0	200-015-4
ciklofosfamido monohidratas	6055-19-2	
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 tirpinamuoju įrenginiu, arba paveikti taip pat kaip ir tiriamosios grupės, turi būti kiekvieną kartą paimami, nekreipiant dėmesio į anksčiau atliktų tyrimų 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 priimtinausias. Be to reikia papildomai panaudoti tiriamąja medžiaga neveiktus kontrolinius mėginius, nekreipiant dėmesio į anksčiau atliktų tyrimų bei išspausdintus duomenis, rodančius, kad pasirinktas tirpiklis ar tirpinantysis įrenginys nesukėlė jokių žalingų ar mutageninių efektų.

▼B**1.5 BANDYMO ATLIKIMO METODIKA****1.5.1 Gyvūnų skaičius**

Kiekvienoje tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse turi būti mažiausiai 5 tiriami patinėliai.

1.5.2 Veikimo tvarkaraštis

Pirmiausia tik vieną kart arba dukart veikiama tiriamosiomis medžiagomis (pavienis veikimas arba 2 veikimai). Tiriamosiomis medžiagomis galima veikti, taikant taip vadinamą išskaidytą dozę, kai tą pačią dieną atliekami du veikimai tiriamąja medžiaga ir jų atlikimo laikas skiriasi ne daugiau kaip keletu valandų tam, kad būtų suteiktas pakankamai didelis tiriamosios medžiagos tūris. Kitų dozių davimo tvarka turi būti moksliškai pagrįdžiama.

Kai gyvūnų grupei duodama didžiausia koncentracija, tai, pasibaigus veikimui, mėginiai paimami 2 kartus. Kadangi tiriamoji medžiaga gali turėti įtakos ląstelės ciklo kinetikai, tai, pasibaigus veikimui, mėginiai paimami labai anksti bei labai vėlai 24-48 valandų laikotarpiu. Kai tiriamos 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 efektus (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 sustabdančio agento (pavyzdžiui, Kolcemido® ar kolchicino). Po atitinkamo intervalo iš gyvūnų paimami mėginiai, pelių atveju tai atliekama po 3-5 valandų, kuniškų žiurkėnų atveju tai atliekama po 4-5 valandų.

1.5.3 Dozės dydis

Jeigu atliekamas intervalo, apie kurį nėra duomenų, paieškos tyrimas, tai jis turi būti atliekamas to pačioje laboratorijoje, naudojant tos pačios rūšies, kamieno ir lyties gyvūnus bei veikiant juos tiriamąja chemine medžiaga pagal tą patį tvarkaraštį, kuris buvo naudojamas pagrindinio tyrimo metu (7). Jeigu nustatomas toksiškumas, tai pirmą kart imant mėginius, naudojami 3 doziniai lygiai. Šie doziniai lygmenys 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 dozė 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.

▼ B

Medžiagos pasižyminčios specifiniu biologiniu aktyvumu, kai jų dozės būna mažos ir netoksinės (pavyzdžiui tokios kaip hormonai ir mitogenai) gali būti laikomos išimtimi, kai joms taikomi dozę nustatantys kriterijai ir tada jos tiriamos kiekvienu atveju. Didžiausia dozė vadinama tokia dozė, kuriai esant, spermatogonijose pasireiškia kai kurie toksiškumo požymiai (pavyzdžiui, I ir II mejozinės metafazės metu spermatogonijų mitozijų santykis sumažėja; šis sumažėjimas neviršija 50 %).

1.5.4 Ribų paieškos tyrimas

Jeigu tyrimas atliekamas, esant vienam doziniam lygmeniui, kuris, per vieną dieną atliekant pavienį arba du poveikius tiriamąja medžiaga, mažiausiai sudaro 2 000 mg/kūno/kg ir jei nepastebima jokių toksinių efektų bei, remiantis struktūriškai panašių cheminių medžiagų tyrimų duomenimis, nebus tikimasi užregistruoti genotoksiškumo, tai tada laikomasi nuostatos, kad yra tikslinga atlikti pilną tyrimą panaudojant 3 dozinius lygmenis. Numatomas tiriamosios medžiagos poveikis žmogui gali parodyti, kad, atliekant ribų paieškos tyrimą reikia naudoti aukštesnį dozinį lygmenį.

1.5.5 Dozių davimas

Tiriamoji medžiaga yra paprastai duodama, priverstinai maitinant per vamzdelį, įstatant jį į skrandį, tinkamai įvedant kanulę per vamzdelį arba injekciją į pilvą. Tiriamąją 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 tiriamojo gyvūno dydžio. Tūris neturi viršyti 2 ml/100 mg kūno masės. Didesnių nei šitų tūrių davimas turi būti pagrindžiamas. Išskyrus sujudrinančias ar irimą sukeliančias medžiagas, kurios, būdamos didesnėmis koncentracijomis, sukelia žalingus efektus, tiriamosios medžiagos tūrio kitimas turi būti sumažinamas iki minimumo, koncentraciją taip sureguliuojant, kad esant visiems doziniam lygmenims, 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 skaidrių 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 skaidres, 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 tyrimų rezultatai turi būti pateikiami lentelėse. Gyvūnas yra eksperimentinis vienetas. Turi būti nustatytas kiekvieno gyvūno ląstelių, turinčių struktūrinės 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 tiriamąja chemine medžiaga, grupėse. Atskirai registruojama bei pranešama apie plyšių pasireišimą, tačiau bendru atveju jie neįskaitomi, kai nustatomas absoliutinis aberacijų pasireiškimo dažnis.

▼B

Jei stebima tiek mitozė, tiek ir mejozė, tai turi būti nustatytas spermatogonių 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 efektas. Jeigu stebima tik mitozė, tai kiekvieno gyvūno atveju, imant mažiausiai 1 000 ląstelių, nustatomas jų mitozinis indeksas.

2.2 REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR INTERPRETAVIMAS

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 tyrimo metu gautus rezultatus, galima pasinaudoti statistiniais metodais 8. Statistinis reikšmingumas turėtų būti vienintelis faktorius, apsprendžiantis teigiamą atsaką. Abejotini rezultatai turėtų būti išaiškinti, toliau tęsiant tyrimą ir pirmiausia pakeičiant eksperimentines sąlygas.

Jei tiriant medžiagą, gaunami rezultatai, neatitinkantys aukščiau išvardintų kriterijų, ši tiriamoji medžiaga laikoma nemutageniška.

Nors daugumos eksperimentų metu buvo gauti aiškiai teigiami ar neigiami rezultatai, išimtiniais atvejais gautų rezultatų rinkinys neleis padaryti teisingos išvados apie tiriamosios medžiagos aktyvumą. Rezultatai gali likti abejotini ar neaiškūs, nepriklausomai nuo atliktų eksperimentų skaičiaus.

Tiriant chromosomų aberacijas *in vitro*, gauti teigiami rezultatai rodo, kad tiriamoji medžiaga sukelia chromosomų aberacijas tirtos gyvūnų rūšies kaulų čiulpų ląstelėse. Neigiami rezultatai rodo, esant tyrimo sąlygoms, tiriamoji medžiaga nesukelia chromosomų aberacijų tirtos gyvūnų rūšies kaulų čiulpų ląstelėse.

Reikia aptarti tą galimybę, ar tiriamoji medžiaga ar jos metabolitai pasieks bendrąją cirkuliaciją ar specifiniu būdu tą audinį, į kurį jie yra nukreipti (pavyzdžiui, sisteminio toksiškumo atveju).

3. ATASKAITA

TYRIMO ATASKAITA

Tyrimo ataskaitoje turi būti pateikiama tokia informacija:

Tirpiklis/tirpinantysis įrenginys:

- priežastys, dėl kurių buvo pasirinktas šis įrenginys,
- tiriamosios cheminės medžiagos, esančios tirpiklyje/tirpinančiajame įrenginyje, tirpumas ir stabilumas, jei toks yra žinomas.

Tiriamieji gyvūnai:

- panaudota rūšis ar kamienas,
- gyvūnų skaičius ir amžius,
- šaltinis, laikymo sąlygos, maitinimas ir pan.,
- kiekvieno gyvūno svoris prieš pradedant tyrimą ir kiekvienos grupės svorio riba, vidurkiai bei standartinis nukrypimas.

▼B

Tyrimo sąlygos:

- ribų paieškos tyrimo, jei jis buvo vykdomas, duomenys,
- pagrindinė priežastis, nulėmusi dozės dydžio pasirinkimą
- pagrindinė priežastis, nulėmusi davimo būdo pasirinkimą
- tiriamosios medžiagos paruošimo apibūdinimas,
- tiriamosios medžiagos davimo būdo apibūdinimas,
- pagrindinė priežastis, nulėmusi numarinimo laiko pasirinkimą
- tiriamosios cheminės medžiagos, esančios pašaruose ir geriamajame vandenyje, koncentracijos (pm) pervertimas į tikrąją dozę (mg/kūno masės kg/dienai), jei tai įmanoma,
- duomenys apie pašarų ir geriamojo vandens kokybę,
- veikimo tiriamąją medžiagą ir mėginio paėmimo tvarkaraščio detalus aprašymas,
- metodai toksiškumui įvertinti,
- metafazę sustabdančios medžiagos prigimtis, jos koncentracija bei veikimo jėga trukmė,
- skaidrių 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 mitozų 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 naudotas teigiamas kontrolinius mėginius,
- ploidiškumo pasikeitimai, jei buvo tokie stebimi.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

▼ **B**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.

▼B**B.24. PELIŲ TAŠKINIS TESTAS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. SĄVOKOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. TYRIMO METODO PRINCIPAS

Šis testas 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 ši 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 taškų tyrimo testo metu nustatomos spėjamos gemalinių ląstelių somatinės mutacijos.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. TYRIMO METODO APIBŪDINIMAS*Pasiruošimas tyrimui*

Jei įmanoma, tiriamosios 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 tiriamajai cheminei medžiagai veikti, nei toksiniams efektams pasireikšti. Reikėtų naudoti šviežiai paruoštus tiriamosios cheminės medžiagos preparatus.

Ekspperimentiniai gyvūnai

T kamieno (*nonagouti*, a/a; šinšilės, violetinių 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.

▼B**S k a i č i u s i r l y t i s**

Pakankamai nėščios patelės veikiamos kiekviena tiriamosios medžiagos doze tam, kad kiekvienu atveju jos atsivestų pakankamai palikuonių. Paimant atitinkamo dydžio mėginį, atsižvelgiama į pelių, paveiktų tiriamąja medžiaga, kailio taškuotumą bei kontrolinių duomenų gausą. Neigiamas rezultatas laikomas priimtinu, jei buvo įvertinta mažiausiai 300 palikuonių, kuriuos atsivedė patelės, paveiktos tiriamąja medžiaga.

T e i g i a m ų i r n e i g i a m ų k o n t r o l i ų n a u d o j i m a s

Turi būti gaunami kontroliniai duomenys, vienu metu ištyrus peles, paveiktas tik tirpinimui naudojama priemone (neigiamomis kontrolėmis). Anksčiau toje pačioje laboratorijoje atliktų tyrimų kontroliniai duomenys irgi gali būti surenkami, kad būtų užtikrintas duomenų vientisumas ir padidėtų testo jautrumas. Jei buvo nustatyta, kad tiriamoji cheminė medžiaga nėra mutageniška, toje pačioje laboratorijoje turi būti atliekamas testas su mutageniška tiriamąja medžiaga ir gaunami teigiamų kontrolių tyrimo duomenys.

D a v i m o b ū d a s

Paprastai tiriamoji medžiaga duodama nėščioms patelėms per vamzdelį, įvestą į trachėją arba infekuojant į pilvą.

V e i k i m o d o z ė

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

Procedūra

Pavienis veikimas tiriamąja medžiaga įprastai atliekamas 8, 9 ar 10 nėštumo 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 tiriamosiomis medžiagomis.

A n a l i z ė

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 agouti 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).

▼B

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 tyrimų duomenys turėtų būti palyginti atitinkamais metodais. Duomenys pateikiami, atsižvelgiant į kiekvieną vadą.

3. **ATASKAITA**

3.1. **TYRIMO ATASKAITA**

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

- poravimui panaudoti kamieniai,
- tiriamoje bei kontrolinėse grupėse esančių nėščių patelių skaičius,
- vidutinis vados dydis tiriamojoje bei kontrolinėje grupėse gimimo bei atjunkymo metu,
- tiriamosios cheminės medžiagos dozės,
- metodas, kuriuo nustatoma, kad suporavimas įvyko,
- panaudotas tirpiklis, – nėštumo diena, kurią buvo pradėtas veikimas tiriamąja medžiaga,
- veikimo būdas,
- absoliutus įvertintų palikuonių ir tiriamojoje bei kontrolinėje grupėse esančių BVPT, SMT ir SPT skaičius,
- pagrindinės morfologinės anomalijos,
- jei įmanoma, dozės ir atsako sąsaja SPT tyrimo atveju,
- statistinis įvertinimas,
- rezultatų aptarimas
- rezultatų interpretavimas.

3.2. **ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼B**B.25. PELIŲ PAVELDĖTA TRANSLOKACIJA****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. SĄVOKOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. TYRIMO 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 tiriamos palikuonių patelės. Gyvūnų, turinčių translokacijas bei XO-patelių vaisingumas yra sumažėjęs ir pagal tai atrenkami F₁ palikuonys, kurie bus naudojami citogenetinei analizei. Visiškas sterilumas stebimas konkrečių translokacijų atveju (X-autosoma ir c-t tipas). Atliekant citogenetinę analizę, translokacijos nustatomos arba F₁ patinuose arba F₁ 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. TYRIMO METODO APIBŪDINIMAS*Pasiruošimas tyrimui*

Tiriamosios medžiagos ištirpinamos izotoniniame druskų tirpale. Vandenyje netirpios cheminės medžiagos ištirpinamos ar suspenduojamos, panaudojus atitinkamas priemones. Naudojami šviežiai paruošti tiriamosios cheminės medžiagos tirpalai. Jei priemonė duodama kartu su tiriamosios medžiagos doze, tai ji neturi trukdyti nei tiriamajai cheminei medžiagai veikti, nei toksiniams efektams pasireikšti.

Davimo būdas

Paprastai tiriamoji medžiaga duodama per os, į trachėją įvedamu vamzdeliu arba injekuojant tiriamąją 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.

▼B**Gyvūnų skaičius**

Gyvūnų, būtinų tyrimui atlikti, skaičius priklauso nuo spontaninės translokacijos dažnio bei mažiausio translokacijos sukėlimo greičio, kuris būtinas tam, kad būtų gaunamas teigiamas rezultatas.

Testas paprastai atliekamas analizuojant patinų F_1 palikuonis. Tiriant gyvūnų, kuriems buvo duota konkreti tiriamosios medžiagos dozė, grupę, reikėtų išanalizuoti mažiausiai 500 patinų F_1 palikuonis. Jei tiriami patelių F_1 palikuonys, tyrimui atlikti reikia po 300 patinų bei patelių.

Teigiamų ir neigiamų kontrolių naudojimas

Reikėtų remtis atitinkamais kontroliniais duomenimis, gautais atliekant tyrimą ir vienu metu naudojant kontroles bei anksčiau atliktų tyrimų 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

Tyrimo metu paprastai naudojama pavienė ir pati didžiausia dozė, sukelianti silpniausiai pasireiškiančius toksinius efektus, 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.

*Procedūra***Veikimas ir poravimas**

Veikti tiriamąją medžiagą galima dvejopai. Dažniausiai tiriamoji medžiaga duodama vieną kartą. 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, registruojamas palikuonių gimimo data, vados dydis bei palikuonių lytis. Visi vyriškos lyties palikuonys atjunkomi, o visi moteriškos lyties palikuonys pašalinami nepaisant to, kad jie naudojami eksperimento metu.

Translokacijos heterozigotiškumo tyrimas

Galima naudotis vienu iš dviejų galimų metodų:

- F_1 palikuonių vaisingumo tyrimas 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 tyrimas

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.

▼B

Vados dydžio stebėjimas: Tiriami 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 tiriami moteriškos lyties F_1 palikuonys, tai mažos F_2 vados bus tiriamos 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) $\longrightarrow$ 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 patiniais, 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 tiriamieji gyvūnai turi translokacijas. Kiekvienas F_1 patinas, kuris bus tiriamas, 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-I metafazės stadijoje, multivalentinių chromosomų konfigūracijas. Nustačius šiuos multivalentinius darinius mažiausiai dviejose ląstelėse, galima teigti, kad tiriamasis 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-I metafazės 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 tiksliai 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 atjunkimu.

▼B

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-I metafazės 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. **TYRIMO ATASKAITA**

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

- pelių kamienas, gyvūnų amžius, gyvūnų, paveiktų tiriamąja medžiaga, kūno masė,
- kiekvienos lyties tėvinių gyvūnų skaičius tiriamojoje bei kontrolinėje grupėse,
- tyrimo sąlygos, detalus veikimo aprašymas, dozės, tirpikliai, suporavimo tvarkaraštis,
- kiekvienos patelės atsivestų palikuonių skaičius bei lytis, palikuonių, užaugintų translokacijos tyrimams, skaičius bei lytis,
- translokacijos tyrimo laikas bei kriterijai,
- gyvūnų, turinčių translokacijas, detalus 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 interpretavimas.

▼B

3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼ B**B.26. SUBCHRONIŠKO ORALINIO TOKSIŠKUMO BANDYMAS 90 PARŲ KARTOTINĖS DOZĖS TYRIMAS SU GRAUŽIKAIS ORALINIAM TOKSIŠKUMUI NUSTATYTI****1. METODAS**

Šis subchroniško oralinio toksiškumo bandymo metodas yra OECD TG 408 (1998) kopija.

1.1. ĮVADAS

Vertinant ir nustatant cheminių medžiagų toksiškumo charakteristikas, kartotinės dozės subchroniškas oralinis toksiškumas gali būti nustatomas gavus pradinę informaciją ūmaus ar 28 parų kartotinės dozės toksiškumo bandymais. 90 parų tyrimas suteikia informacijos apie galimus pavojus sveikatai, galinčius kilti po kartotinio veikimo ilgą laikotarpį, trunkantį nuo atjunkymo iki visiško subrendimo. Tyrimas suteiks informacijos apie svarbesnius toksiškumo poveikius, nurodys veikiamus organus ir kaupimosi galimybę, ir bus galima gauti nestebimo neigiamo poveikio lygio įvertį, kuris gali būti naudojamas dozių lygiui chroniško toksiškumo tyrimams pasirinkti ir žmonių saugos kriterijams nustatyti.

Metodas papildomai išskiria neurologinio poveikio paskutiniąsias grandis ir nurodo imunologinės bei reprodukcijos sistemos poveikių požymius. Taip pat pabrėžiamas gyvūnų kruopščių klinikinių stebėjimų būtinumas, kad būtų gauta kuo daugiau informacijos. Šis tyrimas turėtų leisti identifikuoti chemines medžiagas, galinčias sukelti neurotoksiškumo, imunologinius ar reprodukcijos organų poveikius, o tai būtų pagrindas toliau testuoti nuodugnius tyrimus.

Taip pat žr. B dalies bendrąjį įvadą.

1.2. SĄVOKOS

Dozė – paskirtas bandomosios medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama mase (g, mg) ar bandomosios medžiagos mase bandymų gyvūno masės vienetui (pvz., mg/kg), ar pastovia koncentracija maiste (ppm).

Dozavimas – yra bendras terminas, apimantis dozės dydį, jos dažnį ir dozavimo trukmę.

NOAEL – termino „nestebimo neigiamo poveikio lygis“ (No observed adverse effect level) santrumpa, tai yra didžiausia dozė, kai neigiamas apdorojimo poveikis nepastebimas.

1.3. BANDYMO METODO ESMĖ

Kasdien kelioms bandymų gyvūnų grupėms per burną duodamos skirtingos bandomosios medžiagos dozės, vienai grupei 90 parų laikotarpiu duodama vieno lygio dozė. Dozės davimo laikotarpiu gyvūnai yra atidžiai stebimi ieškant toksiškumo požymių. Darant bandymą nugaišę ar nužudyti gyvūnai skrodžiami, baigus bandymą išlikę gyvūnai taip pat nužudomi ir skrodžiami.

▼B

1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.4.1. Gyvūnų ruošimas

Turi būti imami sveiki gyvūnai, bent penkias paras aklimatizuoti laboratorijos sąlygomis ir dar nenaudoti kitiems bandymams. Apibūdinant bandymų gyvūnus nurodoma rūšis, veislė, šaltinis, lytis, masė ir (ar) amžius. Gyvūnai į kontrolines ir apdorojimo 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.

1.4.2. Dozių ruošimas

Bandomoji medžiaga duodama pro zondą arba su maistu ar geriamuoju vandeniu. Dozės davimo per burną būdas priklauso nuo tyrimo tikslo ir bandomosios medžiagos fizikocheminių savybių.

Jei būtina, bandomajai medžiagai ištirpdyti arba suspenduoti naudojamas atitinkamas nešiklis. Rekomenduojama kiekvieną kartą, jei tik leidžia sąlygos, iš pradžių bandyti paruošti vandeninius tirpalus/-suspensijas, toliau tirpalą/emulsiją aliejuje (pvz., kukurūzų aliejuje) ir tik tuomet nagrinėti kokius kitus nešiklius naudoti. 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 jaunos suaugusius gyvūnus. Patelės turi būti dar be vados ir neapvaisintos. Duoti medžiagą reikėtų pradėti kuo anksčiau po atjunkymo, tačiau visuomet iki gyvūnui sukanka devynios savaitės. Gyvūnų masės kitimas prieš tyrimo pradžią turi būti kuo mažesnis ir neviršyti $\pm 20\%$ kiekvienos lyties vidutinės masės. Jei tai yra pradinis tyrimas prieš ilgalaikį chroniško toksiškumo tyrimą, abiem tyrimams 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 nužudyti iki bandymo pabaigos. Remiantis ankstesnėmis žiniomis apie cheminę medžiagą ar labai panašių savybių medžiagą, galima numatyti į kontrolinio bandymo ir į didžiausios dozės grupę papildomai įtraukti pagalbinę 10 gyvūnų grupę (po penkis kiekvienos lyties), kad pasibaigus apdorojimo laikotarpiui galima būtų stebėti visų toksiškumo poveikių grįžtamumą ar išlikimą. Šio laikotarpio po apdorojimo trukmė turėtų būti atitinkamai nustatyta atsižvelgiant į stebimus poveikius.

▼ **B**1.4.3.3. *Dozės*

Naudojamos bent trijų lygių dozės ir vienas lygiagretus kontrolinis bandinys, išskyrus atvejus, kai daromas ribinis bandymas (žr. 1.4.3.4). Dozių lygiai gali būti pagrįsti kartotinių dozių ar diapazono nustatymo tyrimų rezultatais ir turi būti atsižvelgta į visus esamus toksikologinius ir toksikokinetinius duomenis apie bandomąją medžiagą ar giminingas medžiagas. Jei bandomosios medžiagos fizikocheminis pobūdis ar biologinis poveikis dozės neriboja, didžiausia dozė turi būti pasirinkta tokia, kad gyvūnui būtų sukeltas tik toksiškumo poveikis, bet jis nežūtų ar nepatirtų didelių kančių. Mažėjančių dozių eilutė turi būti pasirinkta taip, kad būtų parodytas bet koks dozės sukeltas atsakas, o esant mažiausiam dozės lygiui – nestebimo neigiamo poveikio lygis (NOAEL). Mažėjančių dozių lygiams nustatyti paprastai yra optimalus dvigubas keturgubas tarpas, ir dažnai vietoj didelių tarpų tarp dozių (pvz., kai skirtumas tarp jų yra 6–10 kartų) geriau naudoti papildomą ketvirtą bandymų grupę.

Kontrolinę grupę sudaro neapdorotų gyvūnų grupė arba nešiklį gaunanti kontrolinė grupė, jei bandomajai medžiagai duoti naudojamas nešiklis. Išskyrus apdorojimą bandomąja medžiaga, su kontrolinės grupės gyvūnais turi būti elgiamasi lygiai taip, kaip su bandymų grupių gyvūnais. Naudojant nešiklį, kontrolinės grupės gyvūnai gauna didžiausią nešiklio tūrį. Jei bandomoji medžiaga duodama su maistu ir dėl to pasireiškia maisto vartojimo mažėjimas, gali būti naudinga turėti lygiagrečiai maitinamą kontrolinę grupę, kad būtų galima nustatyti, ar vartojimo sumažėjimas yra dėl apetito stokos ar dėl toksikologinių pokyčių pagal bandymo modelį.

Tam tikrais atvejais reiktų atkreipti dėmesį į šias nešiklio ir kitų priedų charakteristikas: poveikius bandomosios medžiagos absorbcijai, pasiskirstymui, metabolizmui ar sulaikymui; poveikius bandomosios medžiagos cheminėms savybėms, galintiems pakeisti jos toksiškumo charakteristikas; ir poveikius maisto ar vandens vartojimui ar gyvūnų mitybos būsenai.

1.4.3.4. *Ribinis bandymas*

Jei, taikant šiam tyrimui aprašytas metodikas, vienos dozės, atitinkančios bent 1 000 mg/kg kūno masės/parai, bandymas nesukelia jokio pastebimo neigiamo poveikio ir jei toksiškumo poveikio nelaukiama pagal struktūriškai giminingų medžiagų duomenis, visas trijų lygių dozės tyrimas gali būti laikomas nebūtinu. Ribinis bandymas taikomas, išskyrus atvejus, kai žmonių veikimas rodo, kad reikia naudoti didesnio lygio dozę.

1.5. **BANDYMO EIGA**1.5.1. **Dozių davimas**

Bandomosios medžiagos dozė 90 parų laikotarpiu gyvūnams duodama kasdien visas septynias dienas per savaitę. Bet kuri kitą režimą, pvz., penkių dienų per savaitę, reikia pagrįsti. Kai bandomoji medžiaga duodama pro 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. 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, kurios būdamos didesnės koncentracijos paprastai sukels dirginančius poveikius, bandomojo tirpalo tūrio nepastovumas turi būti kiek įmanoma sumažintas keičiant koncentraciją taip, kad visų dozių tūris būtų pastovus.

▼B

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 pro zondą, dozė turėtų būti duodama kasdien panašiu laiku ir prireikus pakoreguota pastoviam dozės lygiui pagal gyvūno kūno masę palaikyti. Jei 90 parų tyrimas daromas kaip pradinis prieš ilgalaikį chroniško toksiškumo tyrimą, abiem tyrimams turi būti vartojamas 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 neapdorjami, kad būtų galima konstatuoti toksiškumo poveikių išlikimą ar atsigavimą po jų.

Bendras klinikinis tyrimas turi būti daromas bent kartą per dieną, geriau kasdien tuo pačiu laiku atsižvelgiant į intensyviausią laukiamo poveikio pasireiškimo laiką po medžiagos davimo. Turi būti registruojama gyvūnų klinikinė būseną. Bent du kartus per dieną, paprastai kiekvienos dienos rytą ir vakare, visi gyvūnai apžiūrimi ieškant liguistumo ir gaištamumo požymių.

Bent vieną kartą prieš pirmąjį veikimą (kad būtų galima daryti palyginimus pačiam gyvūnui) ir kartą per savaitę po to 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, tam geriau būtų naudoti bandymų laboratorijos tiksliai apibrėžtą kiekybinio įvertinimo sistemą. Turi būti imamasi priemonių, garantuojančių kuo mažesnę stebėjimo sąlygų kitimą. Pastebėti simptomai turi apimti, jais neapsiribojant, odos, kailio, akių, gleivinių, sekrecijų ir ekskrecijų dažnį ir autonominį aktyvumą (pvz., ašarojimą, drebulį, vyzdžių dydį, neįprastą kvėpavimą). Taip pat turi būti registruojami eisenos pokyčiai, laikysena ir reakcija į tvarkymą, 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 tyrimą 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 jokia 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. Kitos tinkamų metodų detalės pateikiamos atitinkamose nuorodose. Tačiau galima taikyti šių nuorodų metodams alternatyvius metodus.

Tyrimo pabaigoje numatyti funkciniai stebėjimai gali būti nevykdomi, jei yra kitų tyrimų funkcinių stebėjimų duomenys, o kasdieniai klinikiniai stebėjimai nerodo jokių funkcinių sutrikimų.

▼ **B**

Išimtiniais atvejais funkcinių stebėjimų galima taip pat nedaryti grupėms, kurių toksiškumo požymiai yra tokio laipsnio, kad jie labai trukdytų daryti funkcinius bandymus.

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, darant davimo su maistu ar pro zondą tyrimus, 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 nužudymą arba jį vykdyt.

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 tiriant pagrindinius toksiškumo poveikius audiniams, ypač inkstams bei kepenims, turi būti daromi su kraujo pavyzdžiais, gautais iš kiekvieno gyvūno (išskyrus gaištančius ir (ar) nužudytus darant bandymą) prieš pat jo nužudymą ar jį vykdyt. Panašiai kaip hematologiniams tyrimams, galima imti tarpinius bandinius klinikiškai 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 enzimai, rodantys poveikius kepenų ląstelėms (pvz., alaninamino-transferazė, aspartataminotransferazė, šarminė fosfatazė, gama glutamiltranspeptidazė ir sorbitoldehidrogenazė). Taip pat galima įtraukti papildomų enzymų (kepenų ar kitokios kilmės) ir tulžies rūgščių matavimus, kurie tam tikromis sąlygomis gali suteikti naudingos informacijos.

Paskutinę tyrimo savaitę pasirinktinai gali būti analizuojami šie nustatyto laiko paimtų šlapimo bandinių parametrai: išvaizda, tūris, osmolališkumas ar santykinis tankis, pH, baltymai, gliukozė ir kraujas ar kraujo ląstelės.

Be to, galima numatyti tyrimus bendrų audinių pakitimų serumo rodikliams nustatyti. Jei dėl žinomų savybių medžiaga gali veikti ar yra įtarimų, kad gali veikti susijusias medžiagų apykaitos kreivės, reikėtų daryti kitas analizes, įskaitant kalcio, fosforo, badavimo trigliceridų, specifinių hormonų, metemoglobino ir cholinesterazės analizes. Šios analizės turi būti apibrėžtos tam tikrų klasių cheminėms medžiagoms ar daromos tam tikrų atvejų pagrindu.

⁽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 interpretavimas. 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.

▼B

Apskritai tyrimą reikia daryti lanksčiai, atsižvelgiant į gyvūnų rūšį ir stebimus ar laukiamus konkrečios medžiagos poveikius.

Jei istorinių pradinių duomenų nepakanka, reikia apsvarstyti, ar hematologinius ir klinikinius parametrus reikia nustatyti prieš pradedant dozavimą; paprastai nepatariama, kad šie duomenys būtų gauti prieš apdorojimą (7).

1.5.2.3. *Bendroji autopsija*

Visiems tyrimui naudotiems gyvūnams turi būti daroma visiška ir išsami bendroji autopsija, kurią sudaro kruopštus kūno išorės paviršiaus, visų angų, kaukolės, krūtinės ir pilvo ertmių bei jų turinio tyrimas. Visų gyvūnų kepenys, inkstai, antinksčiai, sėklidės, sėklidžių prieklausai, gimdos, kiaušidės, užkrūčio liaukos, blužnis, smegenys ir širdis (išskyrus gaištančių ir (ar) nužudytų darant bandymą) atskiriami nuo juos laikančio audinio ir kiek įmanoma 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), hipofizis, 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 (sisteminiais 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. Šie tyrimai turi būti išplėsti visoms kitų dozių gyvūnų grupėms, jei didelės dozės grupėje stebimi su apdorojimu susiję pokyčiai.

Turėtų būti ištirti visi makroskopiniai pakitimai.

Jei naudojama pagalbinė grupė, turi būti daromas histopatologinis tyrimas tų audinių ir organų, kuriems buvo nustatyti poveikiai medžiagą gavusiose grupėse.

▼B**2. DUOMENYS IR ATASKAITA****2.1. DUOMENYS**

Turi būti pateikti kiekvieno gyvūno duomenys. Papildomai visi duomenys turi būti apibedrinami lentelėse, kiekvienai bandymų grupei nurodomas bandymo pradžioje turėtų gyvūnų skaičius, darant bandymą rastų negyvų ar dėl humaniško priežasčių nužudytų gyvūnų skaičius ir kiekvienos žūties ar nužudymo dėl humaniško 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:

2.2.1. Bandomoji medžiaga:

- fizinė būseną, grynumas ir fizikocheminės savybės,
- cheminio identifikavimo duomenys,
- nešiklis (jei naudojamas): nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei nešiklis ne vanduo.

2.2.2. Bandymų 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,
- detalės apie bandomosios medžiagos/preparato ruošimą, jo dėvimą į maistą, gautą koncentraciją, preparato stabilumą ir vienalytiškumą,
- detalės 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,
- detalės apie maisto ir vandens kokybę.

2.2.4. Rezultatai:

- kūno masė ir kūno masės pokyčiai,
- maisto ir vandens suvartojimas, jei tinka,
- toksiškumo atsako duomenys pagal lytį ir dozę, įskaitant toksiškumo požymius,

▼B

- klinikinių stebėjimų prigimtis, sunkumas ir trukmė (grįžtamojo pobūdžio ar ne),
- oftalmologinio tyrimo rezultatai,
- jutiminio aktyvumo, grybšnio jėgos ir motorinio aktyvumo vertinimai (jei yra),
- hematologiniai bandymai su atitinkamomis bazinės tiesės vertėmis,
- klinikiniai biocheminiai bandymai su atitinkamomis bazinės tiesės vertėmis,
- kūno masė nužudant, organų masė ir organo/kūno masės santykis,
- skrodimo 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.

▼B**B.27. SUBCHRONIŠKO ORALINIO TOKSIŠKUMO BANDYMAS 90 PARŲ KARTOTINĖS DOZĖS TYRIMAS NE SU GRAUŽIKAIS ORALINIAM TOKSIŠKUMUI NUSTATYTI****1. METODAS**

Šis subchroniško oralinio toksiškumo bandymo metodas yra OECD TG 409 (1998) kopija.

1.1. ĮVADAS

Vertinant ir nustatant cheminių medžiagų toksiškumo charakteristikas, kartotinės dozės subchroniškas oralinis toksiškumas gali būti nustatomas gavus pradinę informaciją ūmaus ar 28 parų kartotinės dozės toksiškumo bandymais. 90 parų tyrimas suteikia informacijos apie galimus pavojus sveikatai, galinčius kilti po pakartotinio veikimo ilgą laikotarpį, trunkantį nuo greito augimo iki suaugusio amžiaus pradžios. Tyrimas suteiks informacijos apie svarbesnius toksiškumo poveikius, nurodys veikiamus organus ir kaupimosi galimybę, ir bus galima gauti nestebimo neigiamo poveikio lygio įvertį, kuris gali būti naudojamas dozių lygiui chroniško toksiškumo tyrimams pasirinkti ir žmonių saugos kriterijams nustatyti.

Bandymo metodas leidžia identifikuoti cheminių medžiagų veikimo neigiamus poveikius ne graužikų rūšims ir turi būti taikomas tik:

- jei kitais tyrimais 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. B dalies bendrąjį įvadą.

1.2. SĄVOKOS

Dozė – paskirtas bandomosios medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama mase (g, mg) ar bandomosios medžiagos mase bandymų gyvūno masės vienetui (pvz., mg/kg), ar pastovia koncentracija maiste (ppm).

Dozavimas – bendras terminas, apimantis dozės dydį, jos dažnį ir dozavimo trukmę.

NOAEL – termino „nestebimo neigiamo poveikio lygis“ (*No observed adverse effect level*) santrumpa, ir tai yra didžiausia dozė, kai neigiamas apdorojimo poveikis nepastebimas.

1.3. BANDYMO METODO ESMĖ

Kasdien kelioms bandymų gyvūnų grupėms per burną duodamos skirtingos bandomosios medžiagos dozės, vienai grupei 90 parų duodama vieno lygio dozė. Dozės davimo laikotarpiu gyvūnai yra atidžiai stebimi ieškant toksiškumo požymių. Darant bandymą nugaišę ar nužudyti gyvūnai skrodžiami, baigus bandymą išlikę gyvūnai taip pat nužudomi ir skrodžiami.

▼B**1.4. BANDYMO METODO APRAŠYMAS****1.4.1. Gyvūnų rūšies parinkimas**

Paprastai naudojama ne graužikų rūšis yra šuo, jis turi būti apibrėžtos veislės; dažnai yra 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, šuniui dozės geriau pradėti duoti 4–6 mėnesių ir ne vyresniam kaip devynių mėnesių amžiaus. Jei tai yra pradinis tyrimas prieš ilgalaikį chroniško toksiškumo tyrimą, abiem tyrimams turi būti naudojami tos pačios rūšies/veislės gyvūnai.

1.4.2. Gyvūnų ruošimas

Turi būti imami sveiki gyvūnai, aklimatizuoti laboratorijos sąlygomis ir dar nenaudoti kitiems bandymams. Aklimatizavimo trukmė priklausys 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 savaitių aklimatizacija. Apibūdinant bandomuosius gyvūnus nurodoma rūšis, veislė, šaltinis, lytis, masė ir (ar) amžius. Gyvūnai į kontrolines ir apdorojimo 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 ruošimas

Bandomoji medžiaga duodama su maistu ar geriamuoju vandeniu pro zondą arba kapsulėmis. Dozės davimo būdas priklauso nuo tyrimo tikslo ir bandomosios medžiagos fizikocheminių savybių.

Jei būtina, bandomajai medžiagai ištirpinti arba suspenduoti naudojamas atitinkamas nešiklis. Rekomenduojama kiekvieną kartą, jei tik leidžia sąlygos, iš pradžių bandyti paruošti vandeninius tirpalus/-suspensijas, toliau tirpalą/emulsiją aliejuje (pvz., kukurūzų aliejuje) ir tik tuomet nagrinėti kitų nešiklių naudojimą. Turi būti žinomos visų nešiklių, išskyrus vandenį, toksiškumo charakteristikos. Turi būti nustatytas bandomosios medžiagos stabilumas medžiagos davimo sąlygomis.

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 numatyta nužudyti gyvūnų iki bandymo pabaigos. Baigiant tyrimą gyvūnų skaičiaus turi pakakti svarbiam toksiškumo poveikių įvertinimui. Remiantis ankstesnėmis žiniomis apie cheminę medžiagą ar labai panašių savybių medžiagą, galima būtų numatyti į kontrolinio bandymo ir į didžiausios dozės grupę papildomai įtraukti pagalbinę aštuonių gyvūnų grupę (po keturis kiekvienos lyties), kad pasibaigus apdorojimo laikotarpiui būtų galima stebėti visų toksiškumo poveikių grįžtamumą ar išlikimą. Šio laikotarpio po apdorojimo trukmė turėtų būti tinkamai nustatyta atsižvelgiant į stebimus poveikius.

▼ B**1.5.2. Dozavimas**

Naudojamos bent trijų lygių dozės ir vienas lygiagretus kontrolinis bandinys, išskyrus atvejus, kai daromas ribinis bandymas (žr. 1.5.3). Dozių lygiai gali būti pagrįsti kartotinių dozių ar diapazono nustatymo tyrimų rezultatais, ir turi būti atsižvelgta į visus esamus toksikologinius ir toksikokinetinius duomenis apie bandomąją medžiagą ar giminingas medžiagas. Jei bandomosios medžiagos fizikocheminė prigimtis ar biologiniai poveikiai dozės neriboja, didžiausia dozė turi būti pasirinkta tokia, kad gyvūnui būtų sukeltas tik toksiškumo poveikis, bet jis ne žūtų ar nepatirtų didelių kančių. Mažėjančių dozių eilutė turi būti pasirinkta taip, kad būtų parodytas bet koks dozės sukeltas atsakas, o esant mažiausiam dozės lygiui – nestebimo neigiamo poveikio lygis (NOAEL). Mažėjančių dozių lygiams nustatyti paprastai yra optimalus dvigubas-keturgubas tarpas ir dažnai vietoj didelių tarpų tarp dozių (pvz., kai skirtumas tarp jų yra 6–10 kartų) geriau naudoti papildomą ketvirtą bandymų grupę.

Kontrolinę grupę sudaro neapdorotų gyvūnų grupė arba nešiklį gaunanti kontrolinė grupė, jei bandomajai medžiagai duoti naudojamasis nešiklis. Išskyrus apdorojimą bandomąja medžiaga, su kontrolinės grupės gyvūnais turi būti elgiamasi lygiai taip, kaip su bandymų grupių gyvūnais. Naudojant nešiklį, kontrolinės grupės gyvūnai turi gauti didžiausią nešiklio kiekį. Jei bandomoji medžiaga yra duodama su maistu, ir dėl to pasireiškia maisto vartojimo mažėjimas, gali būti naudinga turėti lygiagrečiai maitinamą kontrolinę grupę, kad būtų galima nustatyti, ar vartojimo sumažėjimas yra dėl apetito stokos ar dėl toksikologinių pokyčių pagal bandymo modelį.

Jei tinka, reikia atkreipti dėmesį į šias nešiklio ir kitų priedų charakteristikas: poveikius bandomosios medžiagos absorbcijai, pasiskirstymui, metabolizmui ar sulaikymui; poveikius bandomosios medžiagos cheminėms savybėms, galinčioms pakeisti jos toksiškumo charakteristikas; ir poveikius maisto ar vandens vartojimui ar gyvūnų mitybos būsenai.

1.5.3. Ribinis bandymas

Jei taikant šiam tyrimui aprašytas metodikas vienos dozės, atitinkančios bent 1 000 mg/kg kūno masės/parai, bandymas nesukelia jokių pastebimų neigiamų poveikių ir jei toksiškumo poveikių nelaukiama pagal struktūriškai giminingų medžiagų duomenis, visas trijų lygių dozės tyrimas gali būti laikomas nebūtinu. Ribinis bandymas taikomas, išskyrus atvejus, kai poveikis žmonėms rodo, kad reikia naudoti didesnio lygio dozę.

1.5.4. Dozių davimas

Bandomosios medžiagos dozė 90 parų gyvūnams duodama kasdien visas septynias dienas per savaitę. Bet kurią kitą režimą, pvz., penkių dienų per savaitę, reikia pagrįsti. Kai bandomoji medžiaga duodama pro 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 kiek įmanoma mažesnis. Išskyrus dirginančias ar esdinančias medžiagas, kurios būdamos didesnės koncentracijos paprastai sukelia dirginančius poveikius, bandomojo tirpalo tūrio nepastovumas turi būti kiek įmanoma sumažintas keičiant koncentraciją taip, kad tūris visoms dozėms būtų pastovus.

▼B

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 pro 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 tyrimas daromas kaip pradinis prieš ilgalaikį chroniško toksiškumo tyrimą, abiem tyrimams turi būti vartojamas 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 neapdorojami, kad būtų galima konstatuoti toksiškumo poveikių išlikimą ar atsigavimą po jų.

Bendras klinikinis tyrimas turi būti daromas bent kartą per dieną, geriau kasdien tuo pačiu laiku atsižvelgiant į intensyviausio laukiamų poveikių pasireiškimo laiką po medžiagos davimo. Turi būti registruojama gyvūnų klinikinė būseną. Bent du kartus per dieną, paprastai rytą ir vakare, visi gyvūnai apžiūrimi ieškant liguistumo ir gaištumumo požymių.

Bent vieną kartą prieš pirmąjį veikimą (kad būtų galima daryti palyginimus pačiam gyvūnui), ir kartą per savaitę po to 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 mažesnę 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 autonominių aktyvumą (pvz., ašarojimą, drebulį, vyzdžių dydį, neįprastą kvėpavimą). Taip pat turi būti registruojami eisenos pokyčiai, laikysena ir reakcija į tvarkymą, kloniniai ar toniniai judesiai, stereotipai (pvz., per dažnas kūno prisižiūrėjimas, nuolatinis sukimasis ratu) ar keistas elgesys.

Prieš pradedant duoti bandomąją medžiagą ir baigiant tyrimą 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 darant davimo su maistu ar pro zondą tyrimus gali pakisti vandens suvartojimas.

▼B**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 nužudymą arba jį vykdant.

Tyrimo pradžioje, vėliau visą bandymo laiką kas mėnesį arba 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 toksiškumo poveikius audiniams, ypač inkstams bei kepenims, turi būti daromi su kraujo pavyzdžiais, gautais iš kiekvieno gyvūno (išskyrus gaištančius ir (ar) nužudytus darant bandymą) pradedant tyrimą, vėliau visą bandymo laiką kas mėnesį arba bandymo viduryje ir galiausiai baigiant bandymą. Parametrai, kuriuos reikia tirti, yra elektrolitų pusiausvyra, angliavandenių apykaita ir kepenų bei inkstų funkcijos. Konkrečių bandymų pasirinkimui įtakos turės bandomosios medžiagos veikimo būdų stebėjimas. Prieš kraujo ėmimą gyvūnai turi būti nemaitinami gyvūno rūšį atitinkantį laiką. Rekomenduojama nustatyti kalcį, fosforą, chloridus, natrių, kalį, badavimo gliukozę, alaninaminotransferazę, aspartataminotransferazę, ornitindekarboksilazę, gama glutamiltanspeptidazę, karbamido azotą, albuminą, kraujo kreatinimą, bendrą bilirubiną ir bendrą serumo baltymų kiekį.

Šlapimą reikia tirti bent pradedant tyrimą, vėliau per tyrimo vidurį ir galiausiai tyrimo pabaigoje analizuojant nustatytu laiku paimtus bandinius. Šlapimo analizė apima išvaizdą, tūrį, osmolališkumą 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, galima numatyti tyrimus bendrų audinių pakitimų rodikliams 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 bandymus, jei būtina išplėsti stebimų poveikių tyrimą. Šios analizės turi būti apibrėžtos tam tikrų klasių cheminėms medžiagoms ar daromos tam tikrų atvejų pagrindu.

Apskritai tyrimą reikia daryti lanksčiai, atsižvelgiant į gyvūnų rūšį ir stebimus ar laukiamus konkrečios medžiagos poveikius.

1.5.5.3. Bendroji autopsija

Visiems tyrimui naudotiems gyvūnams daroma visiška ir išsami bendroji autopsija, 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, sėklidžių prieklausai, kiaušidės, gimdos, skydliaukė (su prieskydine liauka), užkrūčio liaukos, blužnis, smegenys ir širdis (išskyrus gaištančius ir (ar) nužudytus darant bandymą) atskiriami nuo juos laikančio audinio ir kuo greičiau sveriami švieži, kad neišdžiūtų.

▼B

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 (sisteminiams 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. Šie tyrimai turi būti išplėsti visoms kitų dozių gyvūnų grupėms, jei didelės dozės grupėje stebimi su apdorojimu susiję pokyčiai.

Turėtų būti ištirti visi makroskopiniai pakitimai.

Jei naudojama pagalbinė grupė, turi būti daromas histopatologinis tyrimas audinių ir organų, kuriems buvo nustatyti poveikiai medžiagą gavusiose grupėse.

2. **DUOMENYS IR ATASKAITA**

2.1. **DUOMENYS**

Turi būti pateikti kiekvieno gyvūno duomenys. Papildomai visi duomenys turi būti apibendrinami lentelėse, kiekvienai bandymų grupei nurodomas bandymo pradžioje turėtų gyvūnų skaičius, darant bandymą rastų negyvų ar dėl humaniškų priežasčių nužudytų gyvūnų skaičius ir kiekvienos žūties ar nužudymo dėl humaniškų 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:

▼B**2.2.1. Bandomoji medžiaga:**

- fizikinė būseną, grynumas ir fizikocheminės savybės,
- cheminio identifikavimo duomenys,
- nešiklis (jei naudojamas): nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei nešiklis ne vanduo.

2.2.2. Bandymų 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,
- detalės apie bandomosios medžiagos/preparato ruošimą, jo dėjimą į maistą, gautą koncentraciją, preparato stabilumą ir vienalytiškumą,
- detalės 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,
- detalės apie maisto ir vandens kokybę.

2.2.4. Rezultatai:

- kūno masė ir kūno masės pokyčiai,
- maisto ir vandens suvartojimas, jei tinka,
- toksiškumo atsako duomenys pagal lytį ir dozę, įskaitant toksiškumo požymius,
- klinikinių stebėjimų prigimtis, sunkumas ir trukmė (grįžtamojo pobūdžio ar ne),
- oftalmologinio tyrimo rezultatai,
- hematologiniai bandymai su atitinkamomis bazinės tiesės vertėmis,
- klinikiniai biocheminiai bandymai su atitinkamomis bazinės tiesės vertėmis,
- kūno masė nužudant, organų masė ir organo/kūno masės santykis,
- skrodimo duomenys,
- išsamus visų histopatologinio tyrimo rezultatų aprašymas,
- statistinis rezultatų apdorojimas, jei daromas.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

▼B**B.28. PUSIAU CHRONINIS ODOS TOKSIŠKUMO TYRIMAS 90 DIENŲ TRUNKANTIS KARTOTINĖS DOZĖS DAVIMO GRAUŽIKAMS PER ODA TYRIMAS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. SĄVOKOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. TYRIMO METODO PRINCIPAS

Tiriamoji 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. Gyvūnai, kurie miršta tyrimo metu, yra skrodžiami, o likę gyvi gyvūnai skrodžiami tyrimo pabaigoje.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. TYRIMO METODO APIBŪDINIMAS**1.6.1. Pasiruošimas tyrimui**

Prieš tyrimą gyvūnai mažiausiai 5 dienas yra laikomi ir šeriami eksperimentinėje fermoje. Prieš pradedant tyrimą sveiki gyvūnų jaunikliai atsitiktinai atrenkami ir suskirstomi į tiriamąją bei kontrolinę grupes. Visai prieš pat tyrimą nuo tiriamųjų gyvūnų nugaros nukerpamas kailis. Kailį galima ir nuskusti, tačiau tai reikėtų atlikti likus vienai parai iki tyrimo pradžios. Paprastai kartotinis nukirpimas ar nuskutimas atliekamas kas savaitę. Kai kailis kerpamas arba skutamas, reikia stengtis nenubrūžinti odos. Uždedant tiriamąją medžiagą reikia stengtis, kad būtų nuvalyta ne mažiau kaip 10 % viso kūno paviršiaus. Sprendžiant, kuri kūno paviršiaus dalis bus nuvalyta ir kiek bus uždedama tiriamosios medžiagos, reikia atsižvelgti į gyvūno kūno masę. Tiriant kietąsias medžiagas, jei reikia, jos gali būti sutrinamos į miltelius, tiriamąją medžiagą reikėtų pakankamai sudrėkinti vandeniu arba, jei būtina, panaudoti tinkamą įrenginį tam, kad būtų galima užtikrinti gerą tiriamosios medžiagos ir odos sąlytį. Skystosios tiriamosios medžiagos paprastai vartojamos nepraskiestos. Medžiagos paprastai uždedamos 5–7 dienas per savaitę.

1.6.2. Tyrimo sąlygos**1.6.2.1. Eksperimentiniai gyvūnai**

Gali būti naudojama suaugusi žiurkė, triušis ar jūrų kiaulytė. Gali būti naudojamos ir kitos rūšys, tačiau reikia apsvarstyti jų panaudojimą. Tyrimo pradžioje kūno masės variacijos ribos turėtų siekti ± 20 % kūno masės vidurkio. Jei prieš ilgalaikį tyrimą yra atliekamas pusiau chroninis odos tyrimas, tai abiejų tyrimų metu reikėtų naudoti tos pačios rūšies ar kamieno gyvūnus.

▼B**1.6.2.2. Skaičius ir lytis**

Duodant medžiagą skirtinga doze, reikėtų naudoti mažiausiai 20 gyvūnų (10 patelių ir 10 patinėlių), turinčių sveiką odą. Patelės turi būti negimdžiusios ir ne nėščios. Jei numerinimai numatomi iš anksto, tai tiriamų gyvūnų skaičius padidinamas padidinant gyvūnų, kuriuos numatoma numerinti prieš užbaigiant tyrimą, skaičių. Be to, 90 dienų bėgyje papildoma 20 gyvūnų (po 10 kiekvienos lyties) grupė veikiama didele medžiagos doze ir praėjus mėnesiui po veikimo, stebimas toksinių efektų grįžtamumas, nepertraukiamumas ar sulėtintas pasireiškimas.

1.6.2.3. D o z ė

Turėtų būti naudojamos mažiausiai 3 tiriamosios dozės naudojant kontrolinę dozę arba kontrolinį prietaisą, jei toks yra naudojamas. Dozės poveikis turėtų išlikti mažiausiai 6 valandas per dieną. Tiriamoji medžiaga turėtų būti duodama kiekvieną dieną tuo pačiu metu ir medžiaga, kuria veikiama, turi būti duodama tokiu kiekiu su pertraukomis (kas savaitę ar kas dvi savaites), kad būtų palaikoma ta pati medžiagos dozė gyvūno kūno masės atžvilgiu. Išskyrus veikimą tiriamąja medžiaga, kontrolinės grupės gyvūnai turėtų būti laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip ir tiriamosios grupės individai. Jei prietaisas naudojamas dozavimui, tai medžiaga, duodama kontrolinės grupės gyvūnams, naudojant prietaisą, turi būti dozuo-jama tokiu pat būdu kaip ir medžiaga, duodama tiriamosios grupės gyvūnams bei turi būti gaunamas toks kiekis, koks buvo gautas, davus didžiausią medžiagos dozę tiriamajai grupei. Davus didžiausią medžiagos dozę, turėtų pasireikšti toksiniai efektai, tačiau ši dozė neturi būti mirtina arba gali sukelti tik pavienių gyvūnų mirtį. Mažiausia duota dozė neturėtų sukelti jokio toksiškumo. Ši dozė turėtų būti mažesnė nei toji, kuri vartojama praktiškai įvertinant poveikį žmogui. Geriausia, jog tarpinė dozė sukeltų minimalaus toksiškumo požymius. Jeigu naudojama daugiau nei viena tarpinė dozė, tai dozės turi būti padalijamos taip, kad sukeltų toksiškumą palaipsniui. Mirtingumo laipsnis mažos ir tarpinės dozės grupėse, o taipogi kontrolinėje grupėje turi būti žemas tam, kad būtų galima įvertinti rezultatų reikšmingumą.

Jeigu tiriamoji medžiaga, kuria veikiama, ypač suerzina odą, tai reikėtų sumažinti jos koncentracijas ir šitai galbūt susilpnintų medžiagos, duodamos didele doze, sukeliamus toksinius efektus arba šie visai išnyktų. Jei oda buvo ypač pažeista, tai reikia tučtuojau nutraukti tyrimą ir pradėti naują, naudojant mažesnes tiriamosios medžiagos koncentracijas.

1.6.3. Ribų tyrimas

Jei atliekamas išankstinis tyrimas, naudojant 1 000 mg kilogramui arba didesnę dozę, kuri, kaip nustatoma, nesukelia jokių toksinių efektų žmogui, tai laikomasi nuostatos, jog tolimesnis tyrimas nėra būtinas.

1.6.4. Stebėjimų laikotarpis

Tiriamieji gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną, registruojant toksiškumo požymius. Reikia nurodyti mirties bei toksiškumo požymių pasireiškimo ir išnykimo laiką.

▼B

1.6.5. Procedūra

Gyvūnai turėtų būti laikomi atskirai. Geriausiu atveju gyvūnai turėtų būti veikiami duodama tiriamąją medžiaga septynis kartus per savaitę 90 dienų laikotarpiu.

Gyvūnai, esantys bet kurioje pagalbinėje grupėje ir skirti vėlesniems stebėjimams, turėtų būti laikomi dar mėnesį, neveikiant juos medžiaga tam, kad būtų galima jų atsistatymą po toksinių efektų poveikio ar pačių toksinių efektų pasireiškimo nepertraukiamumą. Veikimas medžiaga turėtų trukti šešias valandas per dieną.

Tiriamoji medžiaga turėtų būti tvarkingai uždedama ant odos paviršiaus, sudarančio apie 10 % viso kūno paviršiaus ploto. Jei naudojamos ypač toksiškos medžiagos, tai odos paviršiaus, ant kurio uždedamos medžiagos, plotas gali būti mažesnis, tačiau reikėtų kaip galima daugiau šio ploto tvarkingai padengti plona ir tikslia kaip fotojuosta, plėvele.

Veikimo metu tiriamoji medžiaga kontaktuoja su oda, padengus pastarąją poringa marle ar odos neerzinančia juostele. Vėliau tiriamoji odos vieta yra taip padengiama, kad išliktų poringa marlė bei tiriamoji medžiaga ir kad būtų užtikrinta, jog gyvūnai nepraris tiriamosios medžiagos. Tam, kad būtų išvengta prarijimo, galima naudoti ribojančias priemones, tačiau visiška imobilizacija nėra rekomenduojama.

Veikimo pabaigoje nuo odos, ją plaunant vandeniu ar koku kitu atitinkamu valymo būdu turėtų būti pašalintas tiriamosios 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 bei kailio, o taip pat akių ir gleivinių membranas bei kvėpavimo, apytakos, autonominės bei centrinės nervų sistemos pokyčius, somatomotorinį aktyvumą ir elgseną. Kiekvieną savaitę reikėtų įvertinti pašaro suvartojimą (ir vandens suvartojimą kai tiriamoji medžiaga yra duodama su geriamu vandeniu) bei pasverti gyvūnus. Reikėtų kiek įmanoma pastoviau stebėti gyvūnus tam, kad užtikrinti, jog jie nebūtų prarandami tyrimo metu dėl tokių priežasčių kaip kanibalizmas, audinių autolizė bei laikymo vietos praradimas. Baigiantis tyrimui, visi likę gyvi nepagalbinės grupės gyvūnai, nepaveikti tiriamąją medžiaga, skrodžiami. Nugaišę gyvūnai turėtų būti pašalinami ir, kai nurodoma, skrodžiami.

Įprastiniu atveju visi gyvūnai, įskaitant ir kontrolinius individus, yra tiriami šitaip:

- a) Prieš pradėdant duoti tiriamąją medžiagą bei pasibaigus tyrimui, panaudojant oftalmoskopą ar jam ekvivalentišką tinkamą prietaisą, turėtų būti ištiriamos visų, bet pirmiausia gavusių didžiausią dozę ir priklausančių kontrolinei grupei, gyvūnų akys. Jeigu nustatomi pokyčiai akyse, reikėtų ištirti visus gyvūnus.
- b) Prieš pasibaigiant tyrimui, 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 trukmė, protrombino ir tromboplastino susidarymo trukmė arba kraujo plokštelių (trombocitų) skaičius.

▼B

c) Prieš pasibaigiant tyrimui, reikėtų atlikti kraujo 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 tiriamosios medžiagos veikimo būdo tyrimo duomenis. Siūloma nustatyti kalcį, fosforą, chlorą, natrij, kalį, badavimo metu susidarančią gliukozę (atsižvelgiant į konkrečiai gyvūnų rūšiai/veislei galimą 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. Kitiems tyrimams, kurie gali būti reikalingi pakankamam toksikologiniam įvertinimui, priklauso lipidų, hormonų rūgščių/šarmų balanso, methemoglobino ir cholinesterazės aktyvumo nustatymas. Papildomi biocheminiai tyrimai gali būti atliekami tuo atveju, kai būtina detaliau išnagrinėti nustatytus reiškinius.

d) Nereikalaujama, kad pagal nusistovėjusią tvarką būtų atliekama šlapimo analizė, išskyrus tuos atvejus, kai remiantis duomenimis, numatomas arba nustatomas toksiškumas.

Jeigu neįmanoma gauti anksčiau atliktų tyrimų pagrindinių duomenų, tai, prieš pradedant medžiagos davimą dozėmis, reikėtų apsvarstyti hematologinius ir klinikinius biocheminius parametrus.

Pagrindinis skrodimas

Turėtų būti atliktas visapusiškas bendras visų gyvūnų skrodimas, kurio metu tiriamas kūno išorinis paviršius, visos angos, kiaušo, krūtinės ir pilvo ertmės bei jų turinys. Po skrodimo kuo skubiau pasveriamos kepenys, inkstai, antinksčiai, tiroidinė liauka (kartu su paratireoidiniais dariniais) ir kiaušinėliai tam, kad būtų išvengta jų džiūties. Vėlesniems histopatologiniams tyrimams turėtų būti išsaugomi tokie audiniai ir organai, laikomi tinkamoje terpėje: visi esminiai pažeidimai, smegenys – įskaitant pailgųjų smegenų/smegenų tilto pjūvius, smegenėlių ir smegenų žievę, hipofizę, tiroidinę/paratireoidinę liauką, bet koks užkrūčio liaukos audinys, (trachėja), plaučiai, širdis, aorta, seilių liaukos, kepenys, blužnis, inkstai, antinksčiai, kasa, lytinės liaukos, gimda (pagalbiniai lytiniai organai), tulžies pūslė, stemplė, skrandis, dvylikapirštė žarna, tuščioji žarna, klubinė žarna, akloji žarna, tiesioji žarna, riestoji žarna, šlapimo pūslė, pagrindinis (didysis) limfmazgis, (moterų pieno liauka), (šlaunies raumenynas), periferinis nervas, (akys), (šlaunikaulis, įskaitant ir segmentinį paviršių), (stuburo smegenys trimis lygiais – sprando, krūtinės ląstos ir juosmens) ir (ašarų liaukos). Audinius, paminėtus skliausteliuose, reikia tirti tik tada, kai nustatomas toksiškumas arba tiriamas medžiagos poveikis organui).

Histopatologinis tyrimas

a) Reikėtų visapusiškai histopatologiškai ištirti kontrolinės grupės ir tos grupės, kuriai duodama didelė medžiagos dozė, gyvūnus.

b) Reikėtų ištirti visus pagrindinius pažeidimus.

⁽¹⁾ Dabar žinoma kaip serumo alaninamino transferazė.

⁽²⁾ Dabar žinoma kaip serumo aspartamino transferazė.

▼B

- c) Reikėtų ištirti gyvūnų, kurie veikiami kitomis medžiagos dozėmis, organus, paveikiamus medžiaga.
- d) Jei naudojamos žiurkės, reikėtų histopatologiniu aspektu ištirti gyvūnų, kurie veikiami mažomis ir tarpinėmis medžiagos dozėmis, plaučius tam, kad įsitikinti, jog jie nėra užkrėsti, nes šituo remiantis nesunkiai galima įvertinti gyvūnų sveikatos būklę. Vėliau šių gyvūnų nebereikia tirti histopatopatologiniu aspektu, tačiau būtina atlikti gyvūnų, kurie veikiami didele medžiagos doze, histopatologinę analizę.
- e) Kai naudojama pagalbinė grupė, tai reikia atlikti audinių ir organų, kuriuose, tiriant kitas gyvūnų grupes, paveiktas tiriamąja medžiaga, buvo pastebėti medžiagos sukelti efektai, histopatologinę analizę.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti pateikiami apibendrintai, pasitelkiant lenteles, kuriose nurodomas kiekvienos tiriamosios grupės gyvūnų skaičius tyrimo 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 kokią statistinį metodą, vartojamą visuotiniu mastu.

3. **ATASKAITA**

3.1. **TYRIMO ATASKAITA**

Jei įmanoma, tai tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

- rūšis, veislė, kamienas, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras,
- tyrimo sąlygos,
- dozės lygiai (įskaitant prietaisą, jei šis buvo naudojamas) ir koncentracijos,
- duomenys apie toksinį atsaką pagal tirtą lytį ir duotą dozę,
- jei įmanoma, dozės lygis, kuriam esant jokių efektų nebuvo pastebėta,
- mirties laikas arba tyrimo metu, arba jei gyvūnai išliko iki numatomo,
- toksinių ir kitų efektų apibūdinimas (ypač atkreipiant dėmesį į klinikinių tyrimų duomenis),
- kiekvieno nenormalaus požymio ir iš jo išplaukiančių pasekmių pastebėjimo momentas,
- 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,
- skrodimo metu gauti duomenys,

▼B

- visų histopatologinių tyrimų metu gautų duomenų detalus 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.

▼ B**B.29. PUSIAU CHRONINIS ĮKVĖPIMO TOKSIŠKUMO TYRIMAS 90 DIENŲ TRUNKANTIS KARTOTINĖS ĮKVEPIAMOS DOZĖS TYRIMAS GRAUŽIKŲ RŪŠYSE****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. SĄVOKOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. TYRIMO METODO PRINCIPAS

Tiriamąją medžiagą laipsniškomis koncentracijomis veikiama keletas eksperimentinių gyvūnų grupių kiekvieną dieną apibrėžtą laikotarpį, vienos grupės gyvūnus veikiant vienos koncentracijos medžiaga 90 dienų laikotarpiu. Kai naudojamas prietaisas, norint pasiekti atitinkamą tiriamosios medžiagos koncentraciją atmosferoje, turėtų būti naudojama kontrolinė grupė, kurios gyvūnai veikiami medžiaga to prietaiso pagalba. Veikimo metu gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną tam, kad būtų registruojami toksinių efektų pasireiškimo požymiai. Gyvūnai, kurie nugaišta tyrimo metu, skrodžiami, o atlikus tyrimą visi tie gyvūnai, kurie liko gyvi.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. TYRIMO METODO APIBŪDINIMAS**1.6.1. Pasirengimas**

Prieš tyrimą gyvūnai mažiausiai 5 dienas yra laikomi eksperimentinėje fermoje, kur jie šeriami. Prieš pradėdant tyrimą sveiki gyvūnų jaunikliai atsitiktinai atrenkami ir suskirstomi į tiriamąją bei kontrolinę grupes. Jei būtina, kartu su tiriamąją medžiaga, kuria veikiama, naudojamas atitinkamas prietaisas, kuris sukuria atitinkamą tiriamosios medžiagos koncentraciją atmosferoje. Jei dozavimui naudojamas prietaisas ar kiti priedai, tai jie neturėtų sukelti toksinių efektų. Jei yra reikalinga, tai galima naudotis anksčiau vykdytų tyrimų duomenimis.

1.6.2. Tyrimo sąlygos**Eksperimentiniai gyvūnai**

Tinkamiausia naudoti gyvūnų rūšis – žiurkės, nebent yra kontraindikacijų. Reikėtų naudoti įprastinius jaunų sveikų gyvūnų laboratorinius kamienus ir geriausia pradėti duoti medžiagą dozėmis, kai bet kuriuo atveju žiurkės yra šešių ir ne daugiau kaip aštuonerių savaičių amžiaus. Naudojamų gyvūnų kūno masės nukrypimas tyrimo pradžioje neturėtų būti didesnis nei $\pm 20\%$ vidutinės kūno masės. Jei prieš pradėdant ilgalaikį tyrimą, yra atliekamas pusiau chroninis įkvėpimo tyrimas, tai abiejų tyrimų metu yra naudojamos tos pačios rūšys ir kamienai.

▼B**Skaičius ir lytis**

Esant kiekvienai medžiagos, kuria veikiama, koncentracijai, reikėtų naudoti mažiausiai 20 gyvūnų (10 patelių ir 10 patinėlių). Patelės turėtų būti dar negimdžiusios ir ne nėščios. Jeigu numatoma atlikti gyvūnų, esančių grupėje, numarinimą, tiriamų gyvūnų skaičius turi būti padidintas tiek, kiek gyvūnų planuojama numarinti prieš pasibaigiant tyrimui. Be to, 90 dienų laikotarpiu papildoma 20 (po 10 kiekvienos lyties) gyvūnų grupė gali būti veikiama didele tiriamosios medžiagos koncentracija, kad praėjus mėnesiui po veikimo būtų stebimas toksinių efektų grįžtamumas, išlikimo pastovumas bei pavėluotas pasireiškimas.

Medžiagos, kuria veikiama, koncentracijos

Turėtų būti naudojamos mažiausiai 3 tiriamosios bei viena kontrolinė koncentracijos. Išskyrus tą laikotarpį, kai veikiama tiriamąja medžiaga, kontrolinės grupės gyvūnai turėtų būti laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip ir tiriamosios grupės individai. Esant didžiausiai koncentracijai, turėtų pasireikšti toksiniai efektai, tačiau ši koncentracija neturėtų būti mirtina arba jei mirtina, tai tik keletas individų turi nugaišti. Mažiausia koncentracija neturėtų sukelti jokio toksiškumo. Ši koncentracija turėtų būti mažesnė nei toji, kuri vartojama praktiškai įvertinant poveikį žmogui. Geriausia būtų, kad vidutinė koncentracija sukeltų minimalius toksiškumo požymius. Jeigu naudojama daugiau nei viena vidutinė koncentracija, tai koncentracijos turi būti padalijamos taip, kad toksiškumo požymiai pasireikštų laipsniškai. Kontrolinės grupės ir grupių, kurios veikiamos mažomis bei tarpinėmis koncentracijomis, gyvūnų mirtingumas turėtų būti toks, kad būtų galima įvertinti rezultatų reikšmingumą.

Veikimo trukmė

Tyrimų kameroje suvienodinus esančios oro medžiagos koncentracijas, kasdien atliekamas veikimas turėtų trukti šešias valandas.

Prietaisas

Gyvūnai turėtų būti tiriami įkvėpimo tyrimui skirtu prietaisu, suprojektuotu taip, kad palaikytų pastovų dinaminį oro srautą vykstant mažiausiai 12 oro pasikeitimų per valandą tam, kad užtikrintų tinkamą deguonies koncentraciją anksčiau pasiskirsčiusiame ore, kuriuo veikiama. Jei naudojama kamera, ji turėtų būti sukonstruota taip, kad gyvūnai joje būtų kuo mažiau susigrūdę, o tiriamoji medžiaga kuo geriau patektų į gyvūnų kvėpuojamąjį traktą. Tam, kad būtų užtikrintas kameroje esančio oro pastovumas, tūris, kurį užima tiriamieji gyvūnai, neturėtų viršyti 5 % tyrimui naudojamos kameros tūrio. Kameroje esančius gyvūnus galima veikti tiriamąja medžiaga, šiai patenkant į gyvūnų organizmą per burną ir nosį arba per visą kūno paviršių; pirmieji du medžiagos patekimo būdai labai sumažina medžiagos patekimą į organizmą kitais būdais.

Stebėjimų laikotarpis

Visi gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną ir registruojami toksiškumo požymiai, nurodant jų pasireiškimo pradžią, laipsnį ir trukmę. Reikėtų užregistruoti mirties laiką ir tą momentą, kai toksiškumo požymiai pasireiškia bei išnyksta.

▼B

1.6.3. Procedūra

Geriausia, kad tiriamosios medžiagos dozė gyvūnams būtų duodama septynis kartus per savaitę 90 dienų laikotarpiu. Bet kokios kitos pagalbinės grupės gyvūnai turi būti laikomi dar mėnesiui ir neduodant jiems medžiagos tam, kad būtų stebimas jų organizmo atsistatymas po toksinio poveikio arba toksinių efektų pasireiškimo pastovumas. Tyrimo metu turėtų būti palaikoma 22 ± 3 °C temperatūra. Optimali santykinė drėgmė turėtų būti 30–70 %, tačiau kai kuriais atvejais (pvz., tiriant aerozolius) tai nebūtina. Veikimo metu pašaras ir girdymas turėtų išlikti nepakitę.

Reikėtų naudoti dinaminę įkvėpimo sistemą kartu su atitinkama analitine koncentracijos kontrolės sistema. Atitinkamos medžiagos, kuria veikiama, koncentracijoms nustatyti reikėtų atlikti bandomąjį tyrimą. Oro srautą reikėtų sureguliuoti taip, kad būtų užtikrintos homogeniškos sąlygos kameroje, kurioje veikiama tiriamąja medžiaga. Sistema turėtų užtikrinti, kad veikimo sąlygų pastovumas būtų pasiekiamas kaip galima greičiau.

Matavimai ar stebėjimas turėtų būti grindžiamas:

- a) oro srauto intensyvumu (pastoviai);
- b) tikrąja tiriamosios medžiagos, esančios kvėpuojamojoje zonoje, koncentracija. Atliekant veikimą kasdien, tiriamosios medžiagos koncentracija neturėtų keistis ± 15 % vidutinės vertės. Tačiau dulkių ir aerozolių atveju toks kontrolės lygis nebūtinas ir priimtinos platesnės ribos. Kasdieninės koncentracijos turėtų būti palaikomos kuo pastovesnės. Kuriant palaikančiąją sistemą, reikėtų atlikti dalelių dydžio analizę tam, kad būtų užtikrintas aerozolių koncentracijų pastovumas. Veikimo metu reikėtų kaip galima dažniau atlikti analizę tam, kad būtų nustatomas dalelių pasiskirstymo pastovumas;
- c) temperatūra ir drėgmė;
- d) atliekamo ir po jo sekančio veikimo metu užregistruojami ir sistemingai protokoluojami stebėjimai; reikėtų atskirai registruoti kiekvieną gyvūną. Visus gyvūnus reikėtų stebėti kasdien ir registruoti toksiškumo požymius, įskaitant požymių pasireiškimo laiką, laipsnį bei trukmę. Stebint narveliuose laikomus gyvūnus, reikia registruoti odos bei kailio, o taip pat akių ir gleivinių membranas bei kvėpavimo, apytakos, autonominės bei centrinės nervų sistemos pokyčius, somatomotorinį aktyvumą ir elgseną. Kiekvieną savaitę reikėtų įvertinti pašaro suvartojimą (ir vandens suvartojimą kai tiriamoji medžiaga yra duodama su geriamu vandeniu) bei pasverti gyvūnus. Reikėtų kiek įmanoma pastoviau stebėti gyvūnus tam, kad užtikrinti, jog šie nebūtų prarandami tyrimo metu dėl tokių priežasčių kaip kanibalizmas, audinių autolizė bei laikymo vietos praradimas. Baigiantis tyrimui, visi likę gyvi nepagalbinės grupės gyvūnai, nepaveikti tiriamąja medžiaga yra skrodžiami. Nugaišę gyvūnai turėtų būti pašalinami ir, kai nurodyta, skrodžiami.

Įprastai visi gyvūnai, įskaitant ir kontrolinius individus, tiriami taip:

- a) prieš pradėdant duoti tiriamąją medžiagą bei pasibaigus tyrimui, panaudojant oftalmoskopą ar jam ekvivalentišką tinkamą prietaisą, turėtų būti ištiriamos visų, bet pirmiausia gavusių didžiausią dozę ir priklausančių kontrolinei grupei, gyvūnų akys. Jeigu nustatomi pokyčiai akyse, reikėtų ištirti visus gyvūnus;

▼B

- b) baigiantis tyrimui reikėtų įvertinti tokius hematologinius rodiklius kaip hematokritas, hemoglobino koncentracija, eritrocitų skaičius, absoliutus bei skirtingų populiacijų leukocitų skaičius bei nustatyti krešėjimo potencialą, remiantis tokiais rodikliais, kaip krešėjimo trukmė, protrombino ir tromboplastino susidarymo trukmė arba kraujo plokštelių (trombocitų) skaičiumi;
- c) baigiantis tyrimui reikėtų atlikti kraujo 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 tiriamosios cheminės medžiagos veikimo būdo tyrimo metu gautus duomenis. Siūloma nustatyti kalcį, fosforą, chlorą natrij, kalį, badavimo metu susidarančią gliukozę (atsižvelgiant į konkrečiai gyvūnų rūšiai galimą badavimo laikotarpį), serumo glutamato piruvato transaminazę ⁽¹⁾, serumo glutamato oksalacetato transaminazę ⁽²⁾, ornitino dekarboksilazę, y glutamino transpeptidazę, šlapale esantį azotą, albuminą, bendrą bilirubino, esančio kraujo kreatinino, kiekį bei atlikti serumo baltymų bendro kiekio nustatymą. Kitiems tyrimams, kurie gali būti reikalingi tam, kad būtų atliktas pakankamas toksikologinis įvertinimas, priklauso lipidų, hormonų rūgščių/šarmų balanso, methemoglobino ir cholinesterazės aktyvumo nustatymas. Papildomi biocheminiai tyrimai gali būti atliekami tuo atveju, kai būtina detaliau išnagrinėti nustatytus reiškinius.
- d) nereikalaujama, kad šlapimo analizė būtų atliekama pagal nustatytą tvarką, išskyrus tuos atvejus, kai remiantis duomenimis, numatomas arba nustatomas toksiškumas.

Jeigu anksčiau atliktų pagrindinių tyrimų duomenys laikomi nepakankamais, prieš pradedant duoti dozes reikia apsvarstyti hematologinių ir klinikinių biocheminių parametrų nustatymą.

Pagrindinis skrodimas

Turėtų būti atliktas visapusiškas bendras visų gyvūnų skrodimas, kurio metu tiriamas kūno išorinis paviršius, visos angos, kiaušo, krūtinės ir pilvo ertmės bei jų turinys. Po skrodimo kuo skubiau pasveriamos inkstai, kepenys, antinksčiai ir kiaušinėliai tam, kad būtų išvengta jų džiūties. Vėlesniems histopatologiniams tyrimams turėtų būti išsaugomi tokie audiniai ir organai, laikomi tinkamoje terpėje: visi esminiai pažeidimai, plaučiai, kurie turėtų būti išimti nepažeisti, pasverti ir apdoroti tinkamu fiksatyvu tam, kad būtų išlaikyta plaučių struktūra (efektyvi procedūra – perfuzija fiksatyvu), smegenys – įskaitant pailgųjų smegenų/smegenų tilto pjūvius, smegenėlių ir smegenų žievę, hipofizę, tiroidinę/paratiroidinę liauką, bet koks užkrūčio liaukos audinys, trachėja ir plaučiai, širdis, aorta, seilių liaukos, kepenys, blužnis, inkstai, antinksčiai, kasa, lytinės liaukos, gimda (pagalbiniai lytiniai organai), (oda), tulžis (jei yra duomenys), stemplė, skrandis, dvylikapirštė žarna, tuščioji žarna, klubinė žarna, akloji žarna, tiesioji žarna, riestoji žarna, šlapimo pūslė, pagrindinis (didysis) limfmazgis, (moterų pieno liauka), (šlaunies raumenynas), periferinis nervas, krūtinkaulis su kaulų čiulpais, (akys), (šlaunikaulis, įskaitant ir segmentinį paviršių), (stuburo smegenys trimis lygiais – sprando, krūtinės ląstos ir juosmens). Audinius, paminėtus skliausteliuose, reikia tirti tik tada, kai nustatomas toksiškumas arba tiriamas medžiagos poveikis į tikslinį organą.

⁽¹⁾ Dabar žinoma kaip serumo alaninamino transferazė.

⁽²⁾ Dabar žinoma kaip serumo aspartamino transferazė.

▼B

Histopatologinis tyrimas:

- a) reikėtų visapusiškai histopatologiškai ištirti kontrolinės grupės ir tos grupės, kuriai duodama didelė medžiagos dozė, gyvūnus;
- b) reikėtų ištirti visus pagrindinius pažeidimus;
- c) reikėtų ištirti gyvūnų, kurie veikiami kitomis medžiagos dozėmis, organus, paveikiamus medžiaga;
- d) mažų ir vidutinių dozių grupių gyvūnų plaučiai taip pat turėtų būti ištirti histopatologiškai, kadangi tai gali padėti lengviau įvertinti gyvūnų sveikatos būklę. Tolesnė šių grupių gyvūnų histopatologinė analizė neprivaloma. Tačiau visada būtina ištirti didelių dozių grupės gyvūnų organus, turinčius pažeidimo požymių;
- e) kai naudojama pagalbinė grupė, tai reikia atlikti audinių ir organų, kuriuose, tiriant kitas gyvūnų grupes, paveiktas tiriamąja medžiaga, buvo pastebėti medžiagos sukelti efektai, histopatologinę analizę.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti pateikiami apibendrintai, pasitelkiant lenteles, kuriose nurodomas kiekvienos tiriamosios grupės gyvūnų skaičius tyrimo 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 vartojamą statistinį metodą.

3. **ATASKAITA**

3.1. **TYRIMO ATASKAITA**

Jei įmanoma, tai tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

— rūšis, veislė, kamienas, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras,

— tyrimo sąlygos:

Aparato, kuris naudojamas veikimui medžiaga, aprašymas: įskaitant konstrukciją, tipą, išmatavimus, oro šaltinį, dalelių ir aerozolių sukūrimo sistemą, vėdinimo metodą, veikimą iškvėptu oru ir gyvūnų laikymo kameroje, kai ji naudojama, metodą. Reikėtų aprašyti matuojamą temperatūrą, drėgmę ir, jei reikia, aerozolių koncentraciją arba dalelių dydžio stabilumą.

Veikimo metu gauti duomenys: duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant vidurkius ir variacijos dydį (pvz., standartinį nukrypimą) ir pateikiant:

- a) oro srauto, pereinančio per įkvėpimo įrangą, greičius;
- b) oro temperatūrą ir drėgmę;
- c) nominalias koncentracijas (absoliutus įkvėpimo įrangoje esantis tiriamosios medžiagos kiekis, padalytas iš oro tūrio);
- d) prietaiso, jei jis naudojamas, pobūdį;

▼B

e) tikrąsias koncentracijas, esančias tiriamoje kvėpuojamoje zonoje;

f) vidutinius dalelių dydžius (jei įmanoma nurodyti):

- duomenys apie toksinį atsaką pagal tirtą lytį ir duotą dozę,
- jei įmanoma, duomenų lygis, kuriam esant, jokių efektų nebuvo pastebėta,
- mirties laikas arba tyrimo metu, arba jei gyvūnai išliko iki numarinimo,
- toksinių ir kitų efektų apibūdinimas,
- kiekvieno nenormalaus požymio ir iš jo išplaukiančių pasekmių pastebėjimo momentas,
- 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,
- skrodimo metu gauti duomenys,
- visų histopatologinių tyrimų metu gautų duomenų detalus 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.

▼B**B.30. CHRONINIS TOKSIŠKUMO TESTAS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. SĄVOKOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. TYRIMO METODO PRINCIPAS

Tiriamoji medžiaga paprastai duodama septynis kartus per savaitę atitinkamu būdu keletui eksperimentinių gyvūnų grupių, vieną dozę duodant vienai grupei didžiąją gyvūnų gyvenimo dalį. Veikimo tiriamąją medžiaga ir jam pasibaigus eksperimentiniai gyvūnai stebimi kasdien, siekiant nustatyti toksiškumo požymius.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. TYRIMO METODO APIBŪDINIMAS*Pasiruošimas tyrimui*

Prieš tyrimą mažiausiai 5 dienas gyvūnai yra laikomi ir šeriami eksperimentinėje fermoje. Prieš pradedant tyrimą sveiki gyvūnų jaunikliai atsitiktinai atrenkami ir suskirstomi į tiriamąją bei kontrolinę grupes.

*Tyrimo sąlygos***Eksperimentiniai gyvūnai**

Labiausiai naudojama rūšis yra žiurkės.

Remiantis anksčiau atliktų tyrimų duomenimis, gali būti naudojamos ir kitos (gaužikų arba negaužikų) rūšys. Reikėtų naudoti įprastinių laboratorinių kamienų gyvūnų sveikus jauniklius ir medžiagos davimas doze turėtų prasidėti iškart po atjunkymo.

Tyrimo pradžioje kūno masės variacijos ribos turėtų neviršyti $\pm 20\%$ kūno masės vidurkio. Jei prieš ilgalaikį tyrimą yra atliekamas pusiau chroninis oralinis tyrimas, tai abiejų tyrimų metu reikėtų naudoti tos pačios rūšies ar kamieno gyvūnus.

Skaičius ir lytis

Duodant medžiagą skirtinga doze gaužikams ir kartu naudojant kontrolinę grupę, reikėtų naudoti mažiausiai 40 gyvūnų (20 patelių ir 20 patinėlių). Patelės turi būti negimdžiusios ir ne nėščios. Jei numarinimai numatomi iš anksto, tai tiriamų gyvūnų skaičius padidinamas padidinant gyvūnų, kuriuos numatoma numarinti prieš užbaigiant tyrimą, skaičių.

▼B

Negrauzikų atveju priimtina, kad būtų naudojamas mažesnis gyvūnų skaičius, tačiau kiekvienoje grupėje turi būti mažiausiai po 4 kiekvienos lyties gyvūnus.

D o z ė i r v e i k i m o d a ž n u m a s

Turėtų būti naudojamos mažiausiai 3 tiriamosios dozės naudojant kontrolinę grupę. Didžiausia dozė turėtų sukelti aiškiai pasireiškiantį toksiškumą, nesukeliant perteklinio mirtingumo. Mažiausia dozė neturėtų sukelti akivaizdaus toksiškumo.

Tarpinė dozė turėtų būti išdėstyta tarp aukščiausios ir žemiausios dozių.

Pasirenkant dozes reikėtų remtis anksčiau atliktų toksiškumo tyrimų ir testų duomenimis.

Veikimas turėtų būti atliekamas kasdien.

Jei cheminė medžiaga duodama sumaišius ją su vandeniu ar pašaru, ji turėtų būti pastoviai prieinama.

K o n t r o l ė

Kartu reikėtų naudoti kontrolinę grupę, identišką grupėms, kurios veikiamos, bet kuriuo aspektu, išskyrus veikimą tiriamąja medžiaga.

Ypatingais atvejais, tokiais kaip įkvėpimo tyrimai naudojant aerozolių arba oraliniai tyrimai naudojant nežinomo biologinio aktyvumo emulsiklius, reikėtų taipogi naudoti ir neigiamą kontrolinę grupę. Neigiama kontrolinė grupė veikiama tuo pačiu būdu kaip ir tiriamosios grupės, išskyrus tai, kad gyvūnai neveikiami jokia tiriamąja medžiaga nei prietaisu.

D a v i m o b ū d a s

Duodama paprastai dviem būdais – per burną ir kvėpuojamąjį traktą. Davimo būdo pasirinkimas priklauso nuo tiriamosios medžiagos fizikinių ir cheminių ypatybių ir panašaus veikimo būdo žmonių tarpe.

Duodant per odą susiduriama su didelėmis praktinio pobūdžio problemomis. Chroninis sisteminis toksiškumas, atsirandantis dėl poodinės absorbcijos, įprastiniu atveju gali įtakoti kito oralinio testo metu gaunamus duomenis ir gaunama daug informacijos apie poodinės absorbcijos, įvertintos, anksčiau atlikus poodinio toksiškumo testus, perteklių.

O r a l i n i a i t y r i m a i

Jei tiriamoji medžiaga absorbuojama iš virškinamojo trakto ir jei šis įsisavinimo būdas yra vienas iš būdų, kuriuo žmonės susiduria su tiriamąja medžiaga, tai pasirenkamas davimo per burną būdas, nebent nustatomos kontraindikacijos. Gyvūnai gali gauti tiriamąją medžiagą su maistu, ištirpintą vandenyje arba su kapsule. Geriausia, kad dozavimas būtų atliekamas septynis kartus per savaitę kasdien, nes dozuoiant penkis kartus per savaitę gali paskatinti atsistatymą bei pašalinti toksiškumą tuo metu, kai nėra dozuojama ir šitai gali turėti įtakos gaunamiems rezultatams bei vėliau atliekamam jų įvertinimui. Tačiau pirmiausia, remiantis praktiniu patyrimu, rekomenduojama vykdyti dozavimą penkis kartus per savaitę.

▼B**Įkvėpimo tyrimai**

Dėl to, kad įkvėpimo tyrimuose susiduriama su didesnėmis techninėmis problemomis nei duodant tiriamąją medžiagą kitais būdais, čia pateikiamas detalus vadovas, nurodantis kaip duoti medžiagą šiuo būdu. Reikėtų pažymėti, kad ypatingų situacijų atveju lašinimas į trachėją yra alternatyvus problemos sprendimo būdas.

Atliekant ilgalaikius veikimus, paprastai remiamasi veikimu žmonių atžvilgiu, veikiant gyvūnus kasdien šešias valandas po to, kai suvienodinamos koncentracijos kameros viduje, penkis kartus per savaitę (protarpinis veikimas) arba, atsižvelgiant į galimą aplinkos veikimą, veikiama 22–24 valandas per dieną septynis kartus per savaitę (pastovus veikimas), vieną valandą per dieną šeriant kameroje laikomus gyvūnus tuo pačiu metu.

Abiem atvejais gyvūnai pastoviai veikiami nustatytais tiriamosios medžiagos koncentracijomis. Pagrindinis protarpinio ir pastoviojo veikimų skirtumas yra tai, kad protarpinis veikimas užtrunka 17–18 valandų, per kurias gyvūnai atsigauna po efektų, atsiradusių dėl kasdieninio veikimo, o šitai užtrunka žymiai ilgiau savaitgaliais.

Protarpinio ar pastoviojo veikimo pasirinkimas priklauso nuo tyrimo tikslų bei nuo žmogaus veikimo, kuris turi būti imituojamas. Tačiau reikia apsvarstyti ir konkrečius techninius sunkumus. Pavyzdžiui, pastoviojo veikimo teikiamų privalumų, imituojant aplinkos sąlygas, reikia atsisakyti, nes veikimo metu gyvūnus reikia šerti ir girdyti ir dėl to, kad reikia sukurti žymiai sudėtingesnę (bei labiau patikimesnę) aerozolį ir garus bei imtis priežiūros.

Veikimo kamera

Gyvūnai turėtų būti tiriami įkvėpimo tyrimui skirta įranga, suprojektuota taip, kad palaikytų pastovų dinaminį oro srautą vykstant mažiausiai 12 oro pasikeitimų per valandą tam, kad užtikrintų tinkamą deguonies koncentraciją anksčiau pasiskirsčiusiame ore, kuriuo veikiama. Kontrolinė kamera bei toji, kurioje atliekamas veikimas turėtų būti identiškos pagal konstrukciją ir modelį tam, kad veikimo sąlygos visais aspektais būtų užtikrintos, išskyrus veikimą tiriamąja medžiaga. Nežymus neigiamas slėgis kameros viduje paprastai palaikomas tam, kad tiriamoji medžiaga nepatektų į supančią aplinką. Tiriami gyvūnai kameroje turėtų būti nesusigrūdę. Siekiant užtikrinti kameros oro stabilumą, tūris, kurį užima tiriamieji gyvūnai, neturėtų viršyti 5 % tyrimui naudojamos kameros tūrio.

Reikėtų atlikti tokius matavimus arba priežiūrą:

- i) oro srautas: oro srauto, patenkančio per kamerą, greitis turi būti pastoviai prižiūrimas;

▼B

ii) koncentracija: kasdieninio veikimo metu tiriamosios medžiagos koncentracija neturėtų peržengti ± 15 % vidutinės vertės;

iii) temperatūra ir drėgmė: graužikų atveju temperatūra turėtų būti palaikoma 22 ± 2 °C ir drėgmė kameroje turėtų siekti nuo 30 % iki 70 %, išskyrus tą atvejį, kai naudojamas vanduo tam, kad tiriamoji medžiaga virstų suspensija kameros atmosferoje. Reikėtų pastoviai stebėti temperatūrą bei drėgmę;

iv) dalelių dydžio matavimai: reikėtų nustatyti kameros atmosferoje esančių dalelių, įskaitant skysčius ar kietuosius aerozolius, dydžius. Aerozolių dalelės turėtų būti tokio dydžio, kad naudojamas tiriamasis gyvūnas jas galėtų įkvėpti. Kameros atmosferos mėginiai turėtų būti įnešami į gyvūnų kvėpuojamąją zoną. Oro mėginys, remiantis gravimetrine analize, turėtų atspindėti dalelių, kuriomis gyvūnai veikiami, pasiskirstymą ir visus aerozolius, esančius suspensijoje, netgi jei didžioji aerozolio dalis nėra įkvėpiama. Dalelių dydį reikėtų nustatinėti kaip galima dažniau, kuriant sistemą tam, kad būtų užtikrintas aerozolio stabilumas ir po to kuo dažniau veikimų metu tam, kad būtų galima tinkamai nustatyti dalelių, kuriomis gyvūnai veikiami, pasiskirstymą.

T y r i m o t r u k m ė

Davimas turėtų trukti mažiausiai 12 mėnesių.

*Procedūra***S t e b ė j i m a i**

Detalus klinikinis tyrimas turėtų būti atliekamas vieną kartą per dieną. Kasdien reikėtų atlikti papildomus stebėjimus ir imtis atitinkamų veiksmų sumažinti gyvūnų gaišimą tyrimo metu, pavyzdžiui, skrosti ar užšaldyti tuos gyvūnus, kurie buvo rasti nugaišę ir izoliuoti ar numarinti silpnus bei mirstančius gyvūnus. Reikėtų kruopščiai nustatyti toksinių efektų pasireiškimo laiką bei eigą, o taip pat sumažinti gyvūnų gaišimą dėl ligos, autolizės ar kanibalizmo.

Turėtų būti registruojami visų gyvūnų klinikiniai požymiai, įskaitant regos bei neurologinius pokyčius, o taip pat mirtingumas. Reikėtų registruoti ir toksinių sąlygų, įskaitant ir įtariamus auglius, pasireiškimo laiką bei eigą.

Pirmųjų trylikos tyrimo savaitių bėgyje kartą per savaitę reikėtų registruoti visų gyvūnų kūno masę ir po to vieną kartą per savaitę kas mėnesį. Pirmųjų 13 tyrimo savaitių bėgyje kas savaitę reikėtų įvertinti pašaro įsisavinimą ir vėliau kas trys mėnesiai, nebent sveikatos būklė ar svoris verčia elgtis kitaip.

▼B**Hematologinis tyrimas**

Reikėtų atlikti hematologinį tyrimą (pvz., nustatant hemoglobino kiekį, eritrocitų užimamą tūrį kraujyje absoliutų eritrocitų, leukocitų ir trombocitų skaičių arba kitus rodiklius kraujo krešėjimo aktyvumui įvertinti) praėjus trimis, šešiams mėnesiams, o paskui kas pusę metų, surenkant kraujo mėginius iš visų negrauzimų ir iš 10 kiekvienos lyties ir visų grupių žiurkių. Jei įmanoma, kraujo mėginiai imami iš tų pačių žiurkių tokiu pačiu laiko intervalu. Be to, iš negrauzikų reikėtų paimti išankstinius mėginius tyrimui.

Jei, remiantis klinikiniais stebėjimais, spėjama, kad tyrimo metu sutriko gyvūnų sveikata, paveiktų gyvūnų kraujo analizė turėtų būti atliekama kitaip.

Gyvūnų, kuriems buvo duota didžiausia medžiagos dozė bei kontrolinės grupės individų kraujo mėginių analizė atliekama kitu būdu. Kitos grupės (ar grupių), kuriai (-ioms) buvo duota mažesnė dozė, kraujo analizė atliekama kitaip, jei tarp didžiausią dozę gavusios ir kontrolinės grupės egzistuoja pagrindinis skirtumas arba tai buvo nustatyta patologinių tyrimų metu.

Šlapimo analizė

Šlapimo mėginiai, turėtų būti paimti iš visų negrauzimų ir iš 10 kiekvienos lyties ir visų grupių graužikų, jei įmanoma, tų pačių kaip ir hematologiniam tyrimui. Mėginiai, paimti arba iš atskirų gyvūnų, arba mėginių rinkinys, paimtas iš vienos lyties ar graužikų grupės, turėtų būti ištirti taip:

- išorė: individualaus gyvūno šlapimo tūris bei tankis,
- baltymų, gliukozės, ketonų, paslėpto kraujo kiekis (pusiau kiekybiškai),
- nuosėdų mikroskopinis vaizdas (pusiau kiekybiškai).

Klinikinė chemija

Maždaug kas šešis mėnesius ir tyrimo pabaigoje iš visų negrauzikų bei 10 kiekvienos lyties ir visų grupių žiurkių, jei įmanoma, iš tų pačių žiurkių esant tam pačiam laiko tarpui, turėtų būti surenkami kraujo mėginiai, kad vėliau būtų ištirti klinikinės chemijos aspektu. Be to iš visų negrauzikų turėtų būti paimami išankstiniai mėginiai. Paėmus mėginius, paruošiama plazma ir atliekami tokie matavimai:

- absoliuti baltymo koncentracija,
- albumino koncentracija,
- kepenų funkciniai testai (tokie kaip šarminės fosfatazės aktyvumo nustatymo testas, glutamino piruvato transaminazės ⁽¹⁾ aktyvumo nustatymo testas ir glutamato oksal acetato transaminazės ⁽²⁾ aktyvumo nustatymo testas), gama glutamiltranspeptidazė, ornitino dekarboksilazė,
- angliavandenių metabolizmas, įvertinant gliukozės kraujyje trūkumą,

⁽¹⁾ Dabar žinoma kaip serumo alaninamino transferazė.

⁽²⁾ Dabar žinoma kaip serumo aspartamino transferazė.

▼B

— inkstų funkciniai testai, tokie kaip šlapalo nustatymas kraujyje.

Pagrindinis skrodimas

Turėtų būti atliktas visapusiškas bendras visų gyvūnų skrodimas, įskaitant tuos kurie nugaišo eksperimentų metu arba buvo numarinti tada, kai buvo nustatyta, jog jie miršta. Prieš numarinimą turėtų būti paimti visų gyvūnų kraujo mėginiai tam, kad būtų atlikta diferencinė kraujo analizė. Visi akivaizdžiai matomi sutrikimai, augliai ar sutrikimai, kurie, kaip įtariama, gali būti augliai, turėtų būti užkonservuoti. Reikėtų stengtis rasti sąsajas tarp pagrindinių stebėjimų ir mikroskopinių analizių.

Histopatologiniams tyrimams turėtų būti išsaugomi tokie audiniai ir organai: smegenys ⁽¹⁾ (pailgųjų smegenų/smegenų tilto pjūviai, smegenėlių ir smegenų žievės), hipofizė, tiroidinė liauka (įskaitant paratiroidinę liauką), užkrūčio liauka, plaučiai (įskaitant trachėją), širdis, aorta, seilių liaukos, kepenys ⁽¹⁾, blužnis, inkstai ⁽¹⁾, antinksčiai ⁽¹⁾, stemplė, skrandis, dvylikapirštė žarna, tuščioji žarna, klubinė žarna, akloji žarna, tiesioji žarna, riestoji žarna, gimda, šlapimo pūslė, limfmazgiai, kasa, lytinės liaukos ⁽¹⁾, pagalbiniai lytiniai organai, moterų pieno liauka, oda, raumenynas, periferinis nervas, stuburo smegenys (sprando, krūtinės ląstos ir juosmens), krūtinkaulis su kaulų čiulpais, šlaunikaulis (įskaitant ir segmentinį paviršių) bei akys. Plaučių ir šlapimo pūslės pripildymas fiksuojančiąja medžiaga yra optimalus būdas išsaugoti šiuos audinius; plaučių pripildymas įkvėpimo tyrimuose yra svarbus atitinkamų histopatologinių tyrimų aspektu. Ypatingų tyrimų, tokių, kaip įkvėpimo tyrimai, atveju, reikėtų tirti visą kvėpuojamąjį traktą, įskaitant nosies ertmę, gerklas ir ryklę.

Jei atliekami kiti klinikiniai tyrimai, tai šių procedūrų metu gauta informacija turėtų būti prieinama, atliekant mikroskopinę analizę, nes ta informacija yra pagrindinė patologo darbo gairė.

Histopatologinis tyrimas

Visi akivaizdūs pokyčiai, ypač bet kurio organo augliai ir kiti sutrikimai, turėtų būti tiriami mikroskopiškai. Be to, rekomenduojama atlikti tokias procedūras:

- a) Visų užkonservuotų organų ir audinių mikroskopinę analizę, visapusiškai apibūdinant sutrikimus, rastus:
 1. visuose gyvūnuose, kurie nugaišo arba buvo numarinti tyrimo metu;
 2. visuose tiriamosios grupės, kuriai buvo duota didelė medžiagos dozė, bei kontrolinės grupės gyvūnuose;
- b) organai arba audiniai, kurių anomalijas sukėlė arba galėjo sukelti tiriamoji medžiaga, taipogi tiriami grupės, gavusios mažą dozę, gyvūnuose;
- c) jei tyrimo metu gautas rezultatas įrodo, kad gyvūnų gyvenimo normali trukmė ypač sutrumpėjo arba atsirado efektai, galintys turėti įtakos toksiniam atsakui, tai sekanti dozė turėtų būti tirinama taip, kaip aprašyta aukščiau;

⁽¹⁾ Šie organai, paimti iš 10 kiekvienos lyties ir visų grupių graužikų bei visų negraužikų, taip pat visų negraužikų skydliaukė (su prieskydine liauka) turėtų būti pasverti.

▼B

- d) manoma, kad informacija apie sutrikimų, įprastiniu atveju pasitaikančių tiriamųjų gyvūnų kamiene, dažnumą laboratorinėmis sąlygomis (pvz., remiantis anksčiau atliktų tyrimų duomenimis) yra būtina teisingai įvertinant pokyčių gyvūnuose, paveiktuose tiriamąja medžiaga, reikšmę.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti apibendrinti pasitelkiant lenteles, kuriose nurodomas kiekvienos tiriamosios grupės gyvūnų skaičius tyrimo pradžioje, gyvūnų, kuriuose buvo pastebėti pakitimai, skaičius, pakitimų tipai bei gyvūnų, kuriuose pasireiškė kiekvieno tipo pakitimai, skaičius, išreikštas procentais. Rezultatus reikėtų vertinti atitinkamu statistiniu metodu. Galima naudoti bet koki visuočiai vartojamą statistinį metodą.

3. **ATASKAITA**

3.1. **TYRIMO ATASKAITA**

Jei įmanoma, tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

— rūšis, veislė, kamienas, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras,

— tyrimo sąlygos:

Aparato, kuris naudojamas veikimui medžiaga, aprašymas:

įskaitant konstrukciją, tipą, išmatavimus, oro šaltinį, dalelių ir aerosolių sukūrimo sistemą, vėdinimo metodą, veikimą iškvėptu oru ir gyvūnų laikymo kameroje, kai ji naudojama, metodą. Reikėtų aprašyti matuojamą temperatūrą, drėgmę ir, jei reikia, aerosolių koncentracijų arba dalelių dydžio stabilumą.

Veikimo metu gauti duomenys:

Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant vidurkius ir variacijos dydį (pvz., standartinį nukrypimą) ir pateikiant:

- a) oro srauto, pereinančio per įkvėpimo įrangą, greitį;
- b) oro temperatūrą ir drėgmę;
- c) nominalias koncentracijas (absoliutus įkvėpimo įrangoje esančios tiriamosios medžiagos kiekis, padalytas iš oro tūrio);
- d) tirpiklio, jei jis naudojamas, tipą;
- e) tikrąsias koncentracijas, esančias tiriamoje kvėpuojamoje zonoje;
- f) vidutinius dalelių dydžius (jei įmanoma nurodyti),

— dozių dydžiai (įskaitant tirpiklį, jei naudojamas) ir koncentracijos vertės,

— duomenys apie toksinį atsaką pagal tirtą lytį ir duotą dozę,

— nestebimo poveikio dozės dydis,

— mirties laikas arba tyrimo metu, arba jei gyvūnai išliko iki numatomo,

▼B

- toksinių ir kitų efektų apibūdinimas,
- kiekvieno nenormalaus požymio ir iš jo išplaukiančių pasekmių pastebėjimo momentas,
- 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,
- skrodimo metu gauti duomenys,
- visų histopatologinių tyrimų metu gautų duomenų detalus 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.

▼B**B.31. TOKSIŠKO POVEIKIO PRENATALINIAM VYSTYMUISI TYRIMAS****1. METODAS**

Šis metodas atitinka TG 414 (2001).

1.1 ĮVADAS

Šis toksiško poveikio prenataliniam vystymuisi bandymo metodas skirtas suteikti bendros informacijos apie poveikį veisiančios patelės 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 bandomi darant atskirą tyrimą arba kaip šio tyrimo papildymas, taikant neurotoksiško poveikio vystymuisi bandymo metodą. Prireikus gauti informacijos apie funkcinių trūkumų ir kito postnatalinio poveikio bandymą, reikėtų susipažinti su toksiško poveikio dviejų kartų reprodukcijai tyrimu ir neurotoksiško poveikio vystymuisi tyrimu.

Gali tekti šį bandymo metodą specialiai pritaikyti atskiriems atvejams atsižvelgiant į konkrečias žinias, pvz., bandomosios medžiagos fizikochemines 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 tyrimo ataskaitoje.

1.2 SĄVOKOS

Vystymosi toksikologija – organizmo vystymuisi neigiamo poveikio, galinčio atsirasti dėl medžiagos veikimo prieš apvaisinimą, prenataliniu arba postnataliniu metu iki lytinio subrendimo, tyrimas. Pagrindinius toksiško poveikio vystymuisi požymius sudaro: 1) organizmo žūtis, 2) struktūros anomalijos, 3) augimo pakitimas ir 4) funkciniai trūkumai. Vystymosi toksikologija pirmiau buvo vadinama teratologija.

Neigiamas poveikis – bet koks su apdorojimu susijęs pakitimas palyginti su etalonu, mažinantis organizmo gebą išgyventi, daugintis arba prisitaikyti prie aplinkos. Vystymosi toksikologiją plačiausia prasme sudaro 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).

▼ B

Išsigimimas/didelė anomalija – struktūrinis pakitimas, laikomas kenksmingu gyvūnui (be to, gali būti mirtinas) ir paprastai retas.

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.

Toksiškas poveikis gemalui – kenksmingas poveikis normaliai struktūrai, vystymuisi, augimui, ir (arba) gemalo gyvybingumui.

Vaisius – apvaisintas palikuonis postembrioniniu laikotarpiu.

Toksiškas poveikis vaisiui – kenksmingas poveikis normaliai struktūrai, vystymuisi, augimui ir (arba) vaisiaus gyvybingumui.

Persileidimas – apvaisintų produktų, gemalo arba negyvybingo vaisiaus priešlaikinis pašalinimas iš gimdos.

Resorbcija – reiškinys, kai gimdoje implantuotas 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 – nesančio neigiamo poveikio lygio (*No observed adverse effect level*) santrumpa, ir tai yra didžiausia dozė arba veikimo koncentracija, jei nepastebėtas su apdorojimu susietas neigiamas poveikis.

1.3 ETALONINĖ MEDŽIAGA

Nėra.

1.4 BANDYMŲ METODO ESMĖ

Paprastai bandomoji medžiaga duodama veisiančiai patelei ne vėliau kaip nuo implantacijos iki likus vienai parai iki numatyto nužudymo, 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 para triušiams), juo taip pat tiriamas poveikis visą veisimo laikotarpį nuo ikiimplantacinio laikotarpio, jei tinka, iki likus vienai parai iki cezario pjūvio darymo. Prieš pat cezario pjūvio darymą patelės nužudomos, tiriamas gimdos turinys ir įvertinamos vaisiaus išoriškai matomos anomalijos bei minkštojo audinio ir griaučių pakitimai.

▼B**1.5 BANDYMŲ 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 toksiško poveikio prenataliniam vystymuisi bandymus. Tinkamiausia graužikų rūšis yra žiurkė, o ne graužikų – triušis. Kitos rūšies naudojimą būtina pagrįsti.

1.5.2 Laikymo ir šėrimo sąlygos

Bandymo gyvūnų patalpos temperatūra turi būti 22 °C ($\pm$ 3 °C) graužikams ir 18 °C ($\pm$ 3 °C) triušiams. 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. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, neribojant geriamojo vandens kiekio.

Poruojama šiam tikslui pritaikytuose narveliuose. Pageidautina suporuotus gyvūnus laikyti atskirai, tačiau leidžiamas laikymas nedidelėmis grupėmis.

1.5.3 Gyvūnų ruošimas

Naudojami sveiki ir ankstesniuose bandymuose nedalyvavę gyvūnai, kurie mažiausiai 5 paras pratinami prie laboratorinių sąlygų. Apibūdinama bandomo gyvūno 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 vados neturėjusios patelės. Patelės poruojamos su tos pačios rūšies ir veislės patiniais, be to, reikėtų vengti poravimo su tų pačių tėvų palikuonimis. Graužikams 0 veisimo 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 bandomą grupę. Narveliai išdėstomi taip, kad būtų kiek įmanoma sumažintas bet koks galimas poveikis dėl narvelio vietos. Kiekvienam gyvūnui turėtų būti priskirtas savitas identifikavimo numeris. Apvaisintos patelės nešališkai paskirstomos į kontrolinę ir bandymo grupes; jei patelės apvaisinamos grupėmis, kiekvienos grupės gyvūnai turi būti tolygiai paskirstomi į grupes. Patelės, apvaisintos to paties patino, panašiu būdu tolygiai paskirstomos tarp grupių.

1.6 DARBO 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 %.

▼B**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 sulai-kymui arba išskyrimui; poveikį bandomosios medžiagos cheminėms savybėms, dėl kurių gali pasikeisti jos toksiškumo charakteristikos; poveikį maisto ar vandens suvartojimui arba gyvūnų imitimui. Nešiklis neturi turėti toksiško poveikio vystymuisi ir reprodukcijai.

1.6.3 Dozavimas

Paprastai bandomosios medžiagos reikėtų duoti kasdien nuo implan-tacijos dienos (pvz., 5 paros po suporavimo) ir baigti dieną prieš numatytą cezario pjūvį. Jei išankstiniai tyrimai, kai jie buvo atlikti, nerodo, kad galimi ikiimplantaciniai nuostoliai, bandymą galima pratęsti ir įtraukti visą veisimo laikotarpį nuo suporavimo iki vienos paros prieš numatytą nužudymą. Gerai žinoma, kad netinkama prie-žiūra arba įtampa nėštumo metu gali būti prenatalinio vados nete-kimo priežastimi. Siekiant apsaugoti nuo prenatalinio vados nete-kimo dėl veiksnių, nesusijusių su bandoma medžiaga, reikėtų be reikalo neiti prie patelių arba vengti išorinių veiksnių sukeltos įtampos, pvz., triukšmo.

Turi būti naudojamos mažiausiai trijų dozių grupės ir lygiagrečiai viena kontrolinė grupė. Sveiki gyvūnai paskirstomi atsitiktiniu būdu į kontrolinę ir bandomų gyvūnų grupes. Dozės koncentracijos turėtų skirtis taip, kad būtų galima graduoti toksiškumo poveikį. Jei nėra apribojimų dėl fizikocheminių arba biologinių bandomosios medžiagos savybių, didžiausia dozė pasirenkama siekiant sukelti tam tikrą toksišką poveikį vystymuisi ir (arba) patelei (klinikiniai požymiai arba kūno masės mažėjimas), bet ne žūtį arba sunkias kančias. Mažiausiai viena tarpinė dozė turėtų sukelti mažiausią stebimą toksišką poveikį. Mažiausia dozė neturėtų sukelti jokio toksiško poveikio patelei arba vaisiaus vystymuisi. Turi būti pasi-rinkta mažėjanti dozės koncentracijos seka siekiant parodyti kiek-vieną su dozės dydžiu susietą reakciją ir nesančio neigiamo poveikio lygį (NOAEL). Mažėjančioms dozės koncentracijos 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 siekiama nustatyti NOAEL patelei, tyrimai, kuriais tokia koncentracija nenustatoma, gali būti taip pat priim-tini (1).

Dozių koncentracijos pasirenkamos atsižvelgiant į visus turimus toksiškumo duomenis ir papildomą informaciją apie bandomosios medžiagos arba giminingų medžiagų apykaitą ir toksikokinetiką. Be to, ši informacija padės parodyti dozavimo režimo tinkamumą.

Lygiagrečiai naudojama kontrolinė grupė. Ši grupė turėtų būti medžiagos negaunanti kontrolinė grupė arba nešiklį gaunanti kontro-linė 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 naudojamą kiekį (kokį gauna mažiausia doze veikiamą grupę).

▼B**1.6.4 Ribinis bandymas**

Jei darant bandymą pagal šiame tyrime aprašytas metodikas su viena per burną duodama mažiausiai 1 000 mg/kg kūno masės per parą doze, toksiškas poveikis veisiančiai patelei arba jos palikuonims nepastebimas ir jei tokio poveikio nelaukiama, atsižvelgiant į turimus duomenis (pvz., giminingos struktūros ir (arba) apykaitos junginių duomenis), nebūtina daryti viso tyrimo naudojant tris dozių koncentracijas. Atsižvelgiant į laukiamą poveikį žmonėms, ribiniam bandymui gali tekti naudoti didesnes dozių per burną koncentracijas. Kalbant apie kitus davimo būdus, pvz., įkvėpimą arba veikimą per odą, bandomosios medžiagos fizikocheminės savybės dažnai gali apibrėžti ir riboti didžiausią pasiekiamą veikimo koncentraciją (pvz., dėjimas ant odos neturi sukelti sunkaus vietinio toksiško poveikio).

1.6.5 Dozių davimas

Bandomoji medžiaga arba nešiklis paprastai duodamas per burną, naudojant zondą. Jei naudojamas kitas davimo būdas, bandymų laboratorija turėtų pagrįsti sprendimą ir paaiškinti pasirinkimą, be to, padaryti atitinkamus būtinus pakeitimus (2) (3) (4). Bandomoji medžiaga turėtų būti duodama kiekvieną dieną maždaug tuo pačiu metu.

Dozė atskiram gyvūnui paprastai turėtų būti nustatoma atsižvelgiant į patį paskutinį jo svėrimą. Tačiau reikia imtis atsargumo priemonių reguliuojant dozės dydį paskutinius tris veisimo mėnesius. Dozė pasirenkama atsižvelgiant į turimus duomenis, kad būtų išvengta per didelio toksiško poveikio patelei. Tačiau jei pastebimas per didelis toksiškas poveikis patelėms, tie gyvūnai turi būti humaniškai nužudomi. Jei per didelio toksiškumo požymiai pasireiškia kelioms veisiančioms patelėms, reikėtų spręsti dėl šios dozės grupės nužudymo. 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

Klinikinis tyrimas 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 veisimo dieną arba ne vėliau kaip 3 veisimo dieną, jei suporuoti gyvūnai tiekiami iš išorinio veislyno, pirmąją dozavimo dieną, mažiausiai kas 3 dieną dozavimo laikotarpiu ir numatyto nužudymo dieną.

▼B

Maisto suvartojimas turėtų būti registruojamas kas tris paras ir turi sutapti su kūno masės nustatymu.

1.6.8 **Skrodimas**

Patelės nužudomos dieną prieš numatomą atsivedimą. Patelės, kurioms prieš numatomą nužudymą pasireiškia persileidimo arba priešlaikinio atsivedimo požymiai, turėtų būti nužudomos ir daromas bendrasis makroskopinis tyrimas.

Nužudytai arba darant tyrimą žuvusiai patelei turėtų būti daromas makroskopinis tyrimas visoms struktūros anomalijoms arba patologiniams pakitimams nustatyti. Darant cezario pjūvį ir vėlesnį vaisiaus tyrimą, patelės geriau būtų vertinti nežinant bandymo grupės, kad būtų kiek įmanoma sumažinta sisteminė paklaida.

1.6.9 **Gimdos turinio tyrimas**

Iš karto po nužudymo arba kiek įmanoma greičiau po patelės žūties gimda išimama gyvūno veisimo būsenai įvertinti. Gimdos, kuriose nėra veisimo požymių, turėtų būti papildomai tiriamos (pvz., graužikų atveju apdorojant amonio sulfidu arba Salewski metodu arba taikant kitą metodą triušiams) neveisimo būsenai patvirtinti (5).

Gimdos su vaisiumi, įskaitant kaklelį, pasveriamos. Gyvūnų, žuvusių darant tyrimą, gimdos su vaisiumi nesveriamos.

Turėtų būti nustatytas veisiančių 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 **Vaisiaus 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 kriterijai kiekvienai kategorijai apibrėži. Ypatinę dėmesį reikėtų atkreipti į lytinio dauginimosi trakto pakitimų požymius.

Kiekvienos graužikų vados pusė paruošiama griaučių pakitimams tirti. Likusi dalis paruošiama minkštųjų audinių pakitimų tyrimui ir jie tiriami taikant priimtus arba tinkamus serijinių pjūvių metodus arba kruopštaus bendrojo skrodimo metodus.

▼B

Jei naudojami ne graužikai, pvz., triušiai, tiriami visi vaisiai minkštų audinių ir griaučių pakitimams nustatyti. Vaisių kūnai įvertinami darant kruopštų skrodimą 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 minkštųjų audinių pakitimams įvertinti (įskaitant akis, smegenis, nosies kanalus ir liežuvį), 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 kiekvienai patelei bei jų palikuonims ir suvedami į lenteles, kuriose kiekvienai bandymo grupei ir kiekvienai kartai nurodomas gyvūnų skaičius bandymo pradžioje, darant bandymą žuvusių arba dėl humaniško priežasčių nužudytų gyvūnų skaičius, visų gyvūnų žūties arba nužudymo laikas, veisiančių patelių skaičius, toksiško poveikio požymių turinčių gyvūnų skaičius, pastebėtų toksiškumo požymių aprašymas, įskaitant pradžios laiką, trukmę ir bet kokio toksiško poveikio sunkumą, taikyti gemalo ar vaisiaus stebėjimų būdai ir 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 tyrimo schemos dalis ir turi būti pagrįsti. Turėtų būti pateikti duomenys apie gyvūnus, kurie neišgyveno iki numatyto nužudymo laiko. Prireikus šie duomenys gali būti naudojami grupių vidutinėms vertėms apskaičiuoti. Tokiems gyvūnams gautų duomenų tinkamumas ir jų įtraukimas arba neįtraukimas į kurios nors grupės vidurkį (-ius) turi būti pagrįstas kiekvienu atveju.

2.2 REZULTATŲ ĮVERTINIMAS

Toksiškumo prenataliniam vystymuisi tyrimas įvertinamas atsižvelgiant į stebimą 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,

▼B

- prireikus, ankstesni duomenys apie kontrolinius gyvūnus tyrimo rezultatų interpretavimui pagerinti,
- skaičiai, naudoti visoms procentinėms dalims arba rodikliams apskaičiuoti,
- atitinkama tyrimo 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 tyrimuose, kuriuos darant negauta jokio toksiško poveikio, turėtų būti numatyti papildomi tyrimai bandomosios medžiagos absorbcijai ir biologiniam kaupimuisi nustatyti.

2.3 REZULTATŲ INTERPRETAVIMAS

Toksiško poveikio prenataliniam vystymuisi tyrimas suteiks informacijos apie poveikį patelėms veisimo metu ir jų palikuonių vystymuisi gimdoje dėl kartotinio veikimo medžiaga. Tyrimo rezultatus reikėtų interpretuoti atsižvelgiant į rezultatus, gautus darant pusiau lėtinio toksiškumo, toksiško poveikio reprodukcijai ir toksikokinetinius tyrimus. Kadangi iš esmės tiriamas bendrasis toksiškumas, kaip toksiškas poveikis patelėms, ir toksiškas poveikis vystymuisi, jo rezultatai leis tam tikru laipsniu atskirti poveikį vystymuisi, nesant bendrojo toksiškumo, ir poveikį, kuris sukeliamas esant koncentracijai, kuri sukelia toksišką poveikį patelei (27).

3. ATASKAITOS RENGIMAS

3. 1 BANDYMŲ ATASKAITA

Ataskaitą turi sudaryti ši konkreti informacija:

Bandomoji medžiaga:

- fizikinė būseną ir, jei reikia, fizikocheminės savybės,
- identifikavimo duomenys, įskaitant CAS numerį, jei žinomas ar priskirtas,
- grynumas.

Nešiklis (jei naudojamas):

- nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei tai ne vanduo.

Bandymo 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,
- detalės apie bandomosios medžiagos preparato ruošimą arba jos dėvimą į pašarą, gauta koncentracija, preparato stabilumas ir vienalytiškumas,

▼B

- bandomosios medžiagos davimo detalės,
- bandomosios medžiagos koncentracijos pašare ar geriamajame vandenyje (ppm) perskaičiavimas į tikrąją dozę (mg/kg kūno masės per parą), jei tinka,
- aplinkos sąlygos,
- pašaro ir vandens kokybės detalės.

Rezultatai:

Toksiško poveikio patelei duomenys atsižvelgiant į dozę, įskaitant šiuos, bet jais neapsiribojant:

- gyvūnų skaičius bandymo pradžioje, išgyvenusių gyvūnų skaičius, veisiančių patelių skaičius, persileidimų ir priešlaikinių atsiavedimų skaičius,
- žūties darant tyrimą diena arba iki nužudymo išgyvenusių gyvūnų skaičius,
- duomenys apie gyvūnus, neišgyvenusius iki numatyto nužudymo, pranešami, 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 pataisa gimdos su vaisiumi masei,
- pašaro suvartojimas ir, jei matuojamas, vandens suvartojimas,
- skrodimo rezultatai, įskaitant gimdos masę,
- patelei ir vystymuisi gautos NOAEL vertės.

Toksiško poveikio 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.

Toksiško poveikio vystymuisi duomenys pagal dozę vadoms su gyvais vaisiais, įskaitant:

- gyvų palikuonių skaičių ir procentinę dalį,
- lyčių santykį,
- vaisiaus kūno masę, pageidautina pagal lytį ir abiejų lyčių kartu,
- išorinius, minkštųjų audinių ir griaučių išsigimimus ir kitus svarbius pakitimus,
- klasifikavimo kriterijus, jei tinka,

▼ B

— 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 Uterus der Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv für 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 Technique for 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 as 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.

▼ **B**

- 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.

▼B**B.32. KARCINOGENIŠKUMO TESTAS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. SĄVOKOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. TYRIMO METODO PRINCIPAS

Tiriamoji medžiaga paprastai duodama septynis kartus per savaitę atitinkamu būdu keletui eksperimentinių gyvūnų grupių, vieną dozę duodant vienai grupei didžiąją gyvūnų gyvenimo dalį. Veikimo tiriamąja medžiaga metu ir jam pasibaigus eksperimentiniai gyvūnai stebimi kasdien, siekiant nustatyti toksiškumo požymius, ypač auglių vystymąsi.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. TYRIMO METODO APIBŪDINIMAS

Prieš tyrimą gyvūnai mažiausiai 5 dienas yra laikomi ir šeriami eksperimentinėje fermoje. Prieš pradedant tyrimą sveiki gyvūnų jaunikliai atsitiktinai atrenkami ir suskirstomi į tiriamąją bei kontrolinę grupes.

1.6.1. Eksperimentiniai gyvūnai

Remiantis anksčiau atliktų tyrimų rezultatais, gali būti naudojamos kitos (graužikų arba negrauzikų) rūšys. Reikėtų naudoti įprastinių laboratorinių kamienų gyvūnų sveikus jauniklius, medžiagos davimas doze turėtų prasidėti iškart po atjunkymo.

Tyrimo pradžioje kūno masės variacijos ribos turėtų siekti $\pm 20\%$ kūno masės vidurkio. Jei prieš ilgalaikį tyrimą yra atliekamas pusiau chroninis oralinis tyrimas, tai abiejų tyrimų metu reikėtų naudoti tos pačios rūšies ar kamieno gyvūnus.

1.6.2. Skaičius ir lytis

Duodant medžiagą skirtinga doze graužikams ir kartu naudojant kontrolinę grupę, reikėtų naudoti mažiausiai 100 gyvūnų (50 patelių ir 50 patinėlių). Patelės turi būti negimdžiusios ir ne nėščios. Jei numarinimai numatomi iš anksto, tiriamų gyvūnų skaičius padidinamas padidinant gyvūnų, kuriuos numatoma numarinti prieš užbaigiant tyrimą, skaičių.

▼B**1.6.3. Dozė ir veikimo dažnumas**

Turėtų būti naudojamos mažiausiai 3 tiriamosios dozės naudojant kontrolinę grupę. Didžiausia dozė turėtų sukelti minimalų toksiškumą, pasireiškiantį nežymiu kūno masės priaugimo sumažėjimu (mažesniu nei 10 %), iš esmės nepakeičiant įprastinės gyvenimo trukmės dėl efektų, kurie skiriasi nuo auglių atsiradimo.

Mažiausia dozė neturėtų trikdyti gyvūno normalaus augimo, vystymosi bei gyvenimo trukmės ar sukelti toksiškumo. Apskritai, ši dozė neturėtų būti mažesnė nei didelės dozės dešimtoji dalis (10 %).

Tarpinė dozė turėtų būti išdėstyta tarp aukščiausios ir žemiausios dozių.

Pasirenkant dozes reikėtų remtis anksčiau atliktų toksiškumo testų ir tyrimų duomenimis.

Veikimas turėtų būti atliekamas kasdien.

Jei cheminė medžiaga duodama sumaišius ją su vandeniu ar pašaru, ji turėtų būti pastoviai prieinama.

1.6.4. Kontrolė

Kartu reikėtų naudoti kontrolinę grupę, identišką grupėms, kurios veikiamos, bet kuriuo aspektu, išskyrus veikimą tiriamąja medžiaga.

Ypatingais atvejais, tokiais kaip įkvėpimo tyrimai naudojant aerozolių arba oraliniai tyrimai naudojant nežinomo biologinio aktyvumo emulsiklius, reikėtų taipogi naudoti ir neigiamą kontrolinę grupę. Neigiama kontrolinė grupė veikiama tuo pačiu būdu kaip ir tiriamosios grupės, išskyrus tai, kad gyvūnai neveikiami jokia tiriamąja medžiaga nei prietaisu.

1.6.5. Davimo būdas

Duodama paprastai trimis būdais – per burną, odą ir kvėpuojamąjį traktą. Davimo būdo pasirinkimas priklauso nuo tiriamosios medžiagos fizikinių ir cheminių ypatybių ir panašaus veikimo būdo žmonių tarpe.

1.6.5.1. *Oraliniai tyrimai*

Jei tiriamoji medžiaga absorbuojama iš virškinamojo trakto ir jei šis įsisavinimo būdas yra vienas iš būdų, kuriuo žmonės susiduria su tiriamąja medžiaga, tai pasirenkamas davimo per burną būdas, nebent nustatomos kontraindikacijos. Gyvūnai gali gauti tiriamąją medžiagą su maistu, ištirpintą vandenyje arba su kapsule.

Geriausia, kad dozavimas būtų atliekamas septynis kartus per savaitę kasdien, nes dozavimas penkis kartus per savaitę gali paskatinti atsistatymą bei pašalinti toksiškumą tuo metu, kai nėra dozuojama ir šitai gali turėti įtakos gaunamiems rezultatams bei vėliau atliekamam jų įvertinimui. Tačiau pirmiausia remiantis praktiniu patyrimu, rekomenduojama vykdyti dozavimą penkis kartus per savaitę.

1.6.5.2. *Odos tyrimai*

Odos veikimas jos nudažymu gali būti pasirinktas kaip pagrindinio būdo, kuriuo veikiami žmonės imitacija bei kaip odos sutrikimų sukėlimo modelinė sistema.

▼ **B**1.6.5.3. *Įkvėpimo tyrimai*

Dėl to, kad įkvėpimo tyrimuose susiduriama su didesnėmis techninėmis problemomis, nei duodant tiriamąją medžiagą kitais būdais, čia pateikiamas detalus vadovas, nurodantis, kaip duoti medžiagą šiuo būdu. Reikėtų pažymėti, kad ypatingų situacijų atveju lašinimas į trachėją yra alternatyvus problemos sprendimo būdas.

Atliekant ilgalaikius veikimus, paprastai remiamasi veikimu žmonių atžvilgiu, veikiant gyvūnus kasdien šešias valandas po to, kai suvienodinamos koncentracijos kameros viduje, penkis kartus per savaitę (protarpinis veikimas) arba, atsižvelgiant į galimą aplinkos veikimą, veikiama 22-24 valandas per dieną septynis kartus per savaitę (pastovus veikimas), vieną valandą per dieną šeriant kameroje laikomus gyvūnus tuo pačiu metu. Abiem atvejais gyvūnai pastoviai veikiami nustatytomis tiriamosios medžiagos koncentracijomis. Pagrindinis protarpinio ir pastoviojo veikimų skirtumas yra tai, kad protarpinis veikimas užtrunka 17-18 valandų, per kurias gyvūnai atsigauna po efektų, atsiradusių dėl kasdieninio veikimo, o šitai užtrunka žymiai ilgiau savaitgaliais.

Protarpinio ar pastoviojo veikimo pasirinkimas priklauso nuo tyrimo tikslų bei nuo žmogaus veikimo, kuris turi būti imituojamas. Tačiau reikia apsvarstyti ir konkrečius techninius sunkumus. Pavyzdžiui, pastoviojo veikimo teikiamų privalumų, imituojant aplinkos sąlygas, reikia atsisakyti, nes veikimo metu gyvūnus reikia šerti ir girdyti ir dėl to, kad reikia sukurti žymiai sudėtingesnį (bei labiau patikimesnį) aerozolį ir garus, bei imtis priežiūros.

1.6.6. Veikimo kamera

Gyvūnai turėtų būti tiriami įkvėpimo tyrimui skirta įranga, suprojektuota taip, kad palaikytų pastovų dinaminį oro srautą vykstant mažiausiai 12 oro pasikeitimų per valandą tam, kad užtikrintų tinkamą deguonies koncentraciją anksčiau pasiskirsčiusiame ore, kuriuo veikiama. Kontrolinė kamera bei toji, kurioje atliekamas veikimas turėtų būti identiškos pagal konstrukciją ir modelį tam, kad veikimo sąlygos visais aspektais būtų užtikrintos, išskyrus veikimą tiriamąja medžiaga. Nežymus neigiamas slėgis kameros viduje paprastai palaikomas tam, kad tiriamoji medžiaga nepatektų į supančią aplinką. Tiriami gyvūnai kameroje turėtų būti nesusigrūdę. Siekiant užtikrinti kameros oro stabilumą, tūris, kurį užima tiriamieji gyvūnai, neturėtų viršyti 5 % tyrimui naudojamos kameros tūrio.

Reikėtų atlikti tokius matavimus arba priežiūrą:

- i) oro srautas: oro srauto, patenkančio per kamerą, greitis turi būti pastoviai prižiūrimas;
- ii) koncentracija: kasdieninio veikimo metu tiriamosios medžiagos koncentracija neturėtų peržengti ± 15 % vidutinės vertės. Viso tyrimo laikotarpiu reikėtų išlaikyti kasdienes koncentracijas, jei tai praktiškai įmanoma padaryti;

▼B

iii) temperatūra ir drėgmė: graužikų atveju temperatūra turėtų būti palaikoma apie 22 ± 2 °C ir drėgmė kameroje turėtų siekti nuo 30 % iki 70 %, išskyrus tą atvejį, kai naudojamas vanduo tam, kad tiriamoji medžiaga virstų suspensija kameros atmosferoje. Reikėtų pastoviai stebėti temperatūrą bei drėgmę;

iv) dalelių dydžio matavimai: reikėtų nustatyti kameros atmosferoje esančių dalelių, įskaitant skysčius ar kietuosius aerzolių, dydžius. Aerzolių dalelės turėtų būti tokio dydžio, kad naudojamas tiriamasis gyvūnas jas galėtų įkvėpti. Kameros atmosferos mėginiai turėtų būti įnešami į gyvūnų kvėpuojamąją zoną. Oro mėginys, remiantis gravimetrine analize, turėtų atspindėti dalelių, kuriomis gyvūnai veikiami, pasiskirstymą ir visus aerzolių, esančius suspensijoje, netgi jei didžioji aerzolio dalis nėra įkvėpiama. Dalelių dydį reikėtų nustatinėti kaip galima dažniau, kuriant sistemą tam, kad būtų užtikrintas aerzolio stabilumas ir po to kuo dažniau veikimų metu tam, kad būtų galima tinkamai nustatyti dalelių, kuriomis gyvūnai veikiami, pasiskirstymą.

1.6.7. Tyrimo trukmė

Karcinogeniškumo testas trunka didžiąją tiriamųjų gyvūnų gyvenimo dalį. Pelių ir žiurkėnų atveju tyrimą reikėtų baigti po 18 mėnesių, o žiurkių atveju – po vienerių metų; tačiau konkrečių gyvūnų kamienų, kurių gyvenimo trukmė yra ilgesnė ir (ar) esant lėtam auglių vystymuisi, atveju, tyrimą reikėtų baigti po vienerių metų (pelės ir žiurkėnai) bei po 30 mėnesių (žiurkės). Priešingu atveju, toks pratęstas tyrimas baigiamas, jei gyvūnų, priklausančių kontrolinei bei mažiausios dozės grupėms, skaičius siekia 25 %. Jei užbaigiamas testas, kurio metu buvo nustatytas aiškus lyčių skirtumas pagal atsaką, kiekviena lytis apsvaustoma atskirai. Jei dėl akivaizdžių toksiškumo priežasčių miršta grupė, gavusi didelę dozę, nebūtina baigti tyrimą, pasireiškiant toksinėms reakcijoms, kurios nesukelia problemų kitoms tiriamosioms grupėms. Neigiamas testo rezultatas priimtinas tada, kai ne daugiau kaip 10 % bet kurios grupės gyvūnų nugaišta eksperimento metu dėl autolizės, kanibalizmo ar laikymo sąlygų ir po 18 mėnesių išlieka ne mažiau kaip 50 % visų grupių pelių bei po vienerių metų – ne mažiau kaip 50 % visų grupių žiurkėnų.

1.6.8. Procedūra

1.6.8.1. Stebėjimai

Kasdien reikėtų atlikti narveliuose laikomų gyvūnų odos ir kailio, akių bei gleivinių membranų, o taipogi kvėpuojamojo trakto, apytakos, autonominės bei centrinės nervų sistemų, somatomotorinio ir elgsenos pakitimų stebėjimus.

Reguliariai atliekami gyvūnų stebėjimai yra būtini, kaip galima labiau užtikrinant, kad gyvūnai nenugaištų tyrimo metu dėl tokių priežasčių, kaip kanibalizmas, audinių autolizė bei vietos pakeitimas. Nugaišę gyvūnai turėtų būti pašalinti ir, jei nurodyta, skrodžiami.

▼B

Reikėtų registruoti visų gyvūnų klinikinius požymius bei mirtinumą. Ypatingas dėmesys turi būti skiriamas auglių vystymuisi: turėtų būti registruojamas kiekvieno akivaizdžiai matomo bei užčiuopiamo auglio pasireiškimo laikas, vieta, dydis ir išorė.

Pirmąsias 13 tyrimo savaitių reikėtų nustatyti pašaro (ir vandens, jei tiriamoji medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu) įsisavinimą ir vėliau tai daryti maždaug kas trys mėnesiai, nebent sveikatos būklė ar kūno masės pokyčiai verčia elgtis kitaip.

Pirmąsias 13 tyrimo savaitių bent vieną kart per mėnesį reikėtų pasverti visus gyvūnus.

1.6.8.2. *Klinikiniai tyrimai*

Hematologinis tyrimas

Jei, remiantis laikomų narveliuose gyvūnų stebėjimais, spėjama, kad tyrimo metu sutriko gyvūnų sveikata, turi būti atliekama gyvūnų, paveiktų tiriamąja medžiaga, diferencinė kraujo analizė.

Praėjus vieneriems metams bei 18 mėnesių iš gyvūnų paimami kraujo tepinėliai. Kraujo diferencinė analizė atliekama gyvūnų, gavusių didžiausią medžiagos dozę bei kontrolinės grupės gyvūnų atveju. Jei šie duomenys, ypač tie, kurie buvo gauti prieš numarinimą arba patologinių tyrimų duomenys rodo, kad reikia ištirti kraują, tai atliekama grupės, gavusios mažesnę dozę, diferencinė kraujo analizė.

Pagrindinis skrodimas

Turėtų būti atliktas visapusiškas bendras visų gyvūnų skrodimas, įskaitant tuos kurie nugaišo eksperimentų metu arba buvo numarinti tada, kai buvo nustatyta, jog jie miršta. Visi akivaizdžiai matomi augliai ar sutrikimai, kurie, kaip įtariama, gali būti augliai, turėtų būti užkonservuoti.

Histopatologiniams tyrimams turėtų būti išsaugomi, laikant atitinkamoje terpėje, tokie audiniai ir organai: smegenys (pailgųjų smegenų/-smegenų tilto pjūviai, smegenėlių ir smegenų žievė), hipofizė, tiroidinė/paratiroidinė liauka, užkrūčio liaukos audinys, plaučiai ir trachėja, širdis, aorta, seilių liaukos, kepenys, blužnis, inkstai, antinksčiai, stemplė, skrandis, dvylikapirštė žarna, tuščioji žarna, klubinė žarna, akloji žarna, tiesioji žarna, riestoji žarna, gimda, šlapimo pūslė, limfmazgiai, kasa, lytinės liaukos, pagalbiniai lytiniai organai, moterų pieno liauka, oda, raumenynas, periferinis nervas, stuburo smegenys (sprando, krūtinės ląstos ir juosmens), krūtinkaulis su kaulų čiulpais, šlaunikaulis, (įskaitant ir segmentinį paviršių) ir akys.

Plaučių ir šlapimo pūslės pripildymas fiksuojančiąja medžiaga yra optimalus būdas išsaugoti šiuos audinius; plaučių pripildymas įkvėpimo tyrimuose yra svarbus atitinkamų histopatologinių tyrimų aspektu. Įkvėpimo tyrimų atveju, reikėtų išsaugoti visą kvėpuojamąjį traktą, įskaitant nosies ertmę, gerklą ir ryklę.

▼B**Histopatologinis tyrimas**

- a) Reikėtų atlikti visų gyvūnų, kurie nugaišo arba buvo numarinti tyrimo metu, o taipogi visų kontrolinės bei gavusios didelę dozę grupių gyvūnų pilną histopatologinę analizę.
- b) Reikėtų mikroskopiškai ištirti visose grupėse akivaizdžiai matomus auglius ar sutrikimus, kurie, kaip įtariama, gali būti augliai.
- c) Jei gavusios didelę dozę ir kontrolinė grupės skiriasi pagal neoplastinių sutrikimų pasireiškimą, tai reikėtų ištirti konkrečius šių grupių organus ar audinius.
- d) Jei gavusios didelę dozę grupės gyvūnų išgyvenamumas ypač skiriasi nuo kontrolinės grupės, tai reikėtų detaliai ištirti kitą, mažesnę dozę gavusią grupę.
- e) Jei egzistuoja įrodymai, kad toksiniai ar kiti efektai galėjo sukelti neoplastinį atsaką grupėje, gavusioje didelę dozę, tai reikėtų detaliai ištirti kitą, mažesnę dozę gavusią grupę.

2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti pateikiami apibendrintai, pasitelkiant lenteles, kuriose nurodomas kiekvienos tiriamosios grupės gyvūnų skaičius tyrimo pradžioje, gyvūnų, kuriuose buvo pastebėti augliai tyrimo metu, jų nustatymo laikas bei gyvūnų, kuriuose buvo nustatyti augliai numarinimo metu. Rezultatus reikėtų vertinti atitinkamu statistiniu metodu. Galima naudoti bet koki statistinį metodą, vartojamą visuotinu mastu.

3. ATASKAITA**3.1. TYRIMO ATASKAITA**

Jei įmanoma, tai tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

— rūšis, veislė, kamienas, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras,

— tyrimo sąlygos:

Aparato, kuris naudojamas veikimui medžiaga, aprašymas

Įskaitant konstrukciją, tipą, išmatavimus, oro šaltinį, dalelių ir aerosolių sukūrimo sistemą, vėdinimo metodą, veikimą iškvėptu oru ir gyvūnų laikymo kameroje, kai ji naudojama, metodą. Reikėtų aprašyti matuojamą temperatūrą, drėgmę ir, jei reikia, aerosolių koncentracijų arba dalelių dydžio stabilumą.

▼B

Veikimo metu gauti duomenys

Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant vidurkius ir variacijos dydį (pvz., standartinį nukrypimą) ir pateikiant:

- a) oro srauto, pereinančio per įkvėpimo įrangą, greičius;
 - b) oro srauto, pereinančio per įkvėpimo įrangą, greičius;
 - c) oro temperatūrą ir drėgmę;
 - d) nominalias koncentracijas (absoliutus įkvėpimo įrangoje esančios tiriamosios medžiagos kiekis, padalytas iš oro tūrio);
 - e) prietaiso, jei jis naudojamas, pobūdį;
 - f) tikrąsias koncentracijas, esančias tiriamoj kvėpuojamoj zonojė;
 - g) vidutinius dalelių dydžius (jei įmanoma nurodyti):
- duomenys apie toksinį atsaką pagal tirtą lytį ir duotą dozę,
 - jei įmanoma, duomenų lygis, kuriam esant, jokių efektų nebuvo pastebėta,
 - mirties laikas arba tyrimo metu, arba jei gyvūnai išliko iki numarinimo,
 - toksinių ir kitų efektų apibūdinimas,
 - kiekvieno nenormalaus požymio ir iš jo išplaukiančių pasekmių, pastebėjimo momentas,
 - duomenys apie pašarą bei kūno masę,
 - oftalmologinių stebėjimų rezultatai,
 - naudoti hematologiniai tyrimai ir jų metu gauti rezultatai,
 - skrodimo metu gauti duomenys,
 - visų histopatologinių tyrimų metu gautų duomenų detalus 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.

▼B**B.33. KOMBINUOTAS CHRONINIO TOKSIŠKUMO/-KARCINOGENIŠKUMO TESTAS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. SĄVOKOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. TYRIMO METODO PRINCIPAS

Kombinuoto chroninio toksiškumo/karcinogeniškumo testo tikslas yra nustatyti medžiagos, kuria žinduoliai veikiami ilgiau nei įprasta, chroninius ir karcinogeninius efektus.

Tuo tikslu karcinogeninio testo metu naudojama mažiausiai viena papildoma, tiriamąja medžiaga veikiamą, bei kontrolinę grupę. Dozė, kuri duodama papildomai grupei, veikiama didele doze, yra didesnė, nei ta, kuri duodama grupei karcinogeniškumo testo metu. Karcinogeniškumo testo metu tiriamas tiek bendras gyvūnų toksiškumas, tiek ir atsakas į karcinogeną. Papildomos grupės, veikiamos tiriamąja medžiaga gyvūnai tiriami bendrojo toksiškumo aspektu.

Tiriamoji medžiaga paprastai duodama septynis kartus per savaitę atitinkamu būdu keletui eksperimentinių gyvūnų grupių, vieną dozę duodant vienai grupei didžiąją gyvūnų gyvenimo dalį. Veikimo tiriamąja medžiaga metu ir jam pasibaigus eksperimentiniai gyvūnai stebimi kasdien, siekiant nustatyti toksiškumo požymius bei auglių vystymąsi.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. TYRIMO METODO APIBŪDINIMAS

Prieš tyrimą gyvūnai mažiausiai 5 dienas yra laikomi ir šeriami eksperimentinėje fermoje. Prieš pradedant tyrimą sveiki gyvūnų jaunikliai atsitiktinai atrenkami ir suskirstomi į tiriamąją bei kontrolinę grupes.

1.6.1. Eksperimentiniai gyvūnai

Labiausiai naudojama rūšis yra žiurkės. Remiantis anksčiau atliktų tyrimų duomenimis, gali būti naudojamos ir kitos (graužikai arba negraužikai) rūšys. Reikėtų naudoti įprastinių laboratorinių kamienų gyvūnų sveikus jauniklius, medžiagos davimas doze turėtų prasidėti iškart po atjunkymo.

Tyrimo pradžioje kūno masės variacijos ribos turėtų siekti $\pm 20\%$ kūno masės vidurkio. Jei prieš ilgalaikį tyrimą yra atliekamas pusiau chroninis oralinis tyrimas, tai abiejų tyrimų metu reikėtų naudoti tos pačios rūšies ar kamieno gyvūnus.

▼B**1.6.2. Skaičius ir lytis**

Duodant medžiagą skirtinga doze graužikams ir kartu naudojant kontrolinę grupę, reikėtų naudoti mažiausiai 100 gyvūnų (50 patelių ir 50 patinėlių). Patelės turi būti negimdžiusios ir ne nėščios. Jei numarinimai numatomi iš anksto, tiriamų gyvūnų skaičius padidinamas padidinant gyvūnų, kuriuos numatoma numarinti prieš užbaigiant tyrimą, skaičių.

Papildomoje grupėje, skirtoje patologiniam tyrimui bei veikiamoje tiriamąja medžiaga, turėtų būti po 20 kiekvienos lyties gyvūnų, tuo tarpu kai papildomoje kontrolinėje grupėje turėtų būti po 10 kiekvienos lyties gyvūnų.

1.6.3. Dozė ir veikimo dažnis

Tam, kad būtų įvertintas karcinogeniškumas, reikėtų naudoti mažiausiai 3 tiriamosios dozės, naudojant kontrolinę grupę. Didžiausia dozė turėtų sukelti minimalų toksiškumą, pasireiškiantį nežymiu kūno masės priaugimo sumažėjimu (mažiau nei 10 %), nepakeičiant iš esmės normalios gyvenimo trukmės dėl kitų efektų, besiskiriančių nuo auglių.

Mažiausia dozė neturėtų trukdyti normaliam gyvūno augimui, vystymuisi ar gyvenimo trukmei ar sukelti toksiškumo. Apskritai, ši dozė turi būti ne mažesnė kaip dešimtoji (10 %) didelės dozės dalis.

Tarpinė dozė turėtų būti išdėstyta tarp didžiausios ir mažiausios dozių.

Pasirenkant dozes reikėtų remtis anksčiau atliktų toksiškumo tyrimų ir testų duomenimis.

Atliekant chroninio toksiškumo testą, naudojamos papildomos, veikiamos tiriamąja medžiaga bei kontrolinės grupės. Didelė dozė, duodama papildomos tiriamosios grupės gyvūnams, turėtų sukelti konkrečius toksiškumo požymius.

Veikimas turėtų būti atliekamas kasdien.

Jei cheminė medžiaga duodama, sumaišius ją su vandeniu ar pašaru, ji turėtų būti pastoviai prieinama.

1.6.4. Kontrolė

Kartu reikėtų naudoti kontrolinę grupę, identišką grupėms, kurios veikiamos, bet kuriuo aspektu, išskyrus veikimą tiriamąja medžiaga.

Ypatingais atvejais, tokiais kaip įkvėpimo tyrimai naudojant aerozolius arba oraliniai tyrimai naudojant nežinomo biologinio aktyvumo emulsiklius, reikėtų taipogi naudoti papildomą kontrolinę grupę, neveikiamą prietaisu.

1.6.5. Davimo būdas

Duodama paprastai trimis būdais – per burną, odą ir kvėpuojamąjį traktą. Davimo būdo pasirinkimas priklauso nuo tiriamosios medžiagos fizikinių ir cheminių ypatybių ir panašaus veikimo būdo žmonėms.

▼B1.6.5.1. *Oraliniai tyrimai*

Jei tiriamoji medžiaga absorbuojama iš virškinamojo trakto ir jei šis įsisavinimo būdas yra vienas iš būdų, kuriuo žmonės susiduria su tiriamąja medžiaga, tai pasirenkamas davimo per burną būdas, nebent nustatomos kontraindikacijos. Gyvūnai gali gauti tiriamąją medžiagą su maistu, ištirpintą vandenyje arba su kapsule.

Geriausia, kad dozavimas būtų atliekamas septynis kartus per savaitę kasdien, nes dozavimas penkis kartus per savaitę gali paskatinti atsistatymą bei pašalinti toksiškumą tuo metu, kai nėra dozuojama, o tai gali turėti įtakos gaunamiems rezultatams bei vėliau atliekamam jų įvertinimui. Tačiau pirmiausia remiantis praktiniu patyrimu, rekomenduojama vykdyti dozavimą penkis kartus per savaitę.

1.6.5.2. *Odos tyrimai*

Odos veikimas jos nudažymu gali būti pasirinktas kaip pagrindinio būdo, kuriuo veikiami žmonės imitacija bei kaip odos sutrikimų sukėlimo modelinė sistema.

1.6.5.3. *Įkvėpimo tyrimai*

Dėl to, kad įkvėpimo tyrimuose susiduriama su didesnėmis techninėmis problemomis, nei duodant tiriamąją medžiagą kitais būdais, čia pateikiamas detalus vadovas, nurodantis, kaip duoti medžiagą šiuo būdu. Reikėtų pažymėti, kad ypatingų situacijų atveju lašinimas į trachėją yra alternatyvus problemos sprendimo būdas.

Atliekant ilgalaikius veikimus, paprastai remiamasi veikimu žmonių atžvilgiu, veikiant gyvūnus kasdien šešias valandas po to, kai suvienodinamos koncentracijos kameros viduje, penkis kartus per savaitę (protarpinis veikimas) arba, atsižvelgiant į galimą aplinkos veikimą, veikiama 22–24 valandas per dieną septynis kartus per savaitę (pastovus veikimas), vieną valandą per dieną šeriant kameroje laikomus gyvūnus tuo pačiu metu. Abiem atvejais gyvūnai pastoviai veikiami nustatytais tiriamosios medžiagos koncentracijomis. Pagrindinis protarpinio ir pastoviojo veikimų skirtumas yra tai, kad protarpinis veikimas užtrunka 17-18 valandų, per kurias gyvūnai atsigauna po efektų, atsiradusių dėl kasdieninio veikimo, o šitai užtrunka žymiai ilgiau savaitgaliais.

Protarpinio ar pastoviojo veikimo pasirinkimas priklauso nuo tyrimo tikslų bei nuo žmogaus veikimo, kuris turi būti imituojamas. Tačiau reikia apsvarstyti ir konkrečius techninius sunkumus. Pavyzdžiui, pastoviojo veikimo teikiamų privalumų, imituojant aplinkos sąlygas, reikia atsisakyti, nes veikimo metu gyvūnus reikia šerti ir girdyti ir dėl to, kad reikia sukurti žymiai sudėtingesnę (bei labiau patikimesnę) aerozolį ir garus bei imtis priežiūros.

1.6.6. *Veikimo kamera*

Gyvūnai turėtų būti tiriami įkvėpimo tyrimui skirta įranga, suprojektuota taip, kad palaikytų pastovų dinaminį oro srautą vykstant mažiausiai 12 oro pasikeitimų per valandą tam, kad užtikrintų tinkamą deguonies koncentraciją anksčiau pasiskirsčiusiame ore, kuriuo veikiama. Kontrolinė kamera bei toji, kurioje atliekamas veikimas turėtų būti identiškos pagal konstrukciją ir modelį tam, kad veikimo sąlygos visais aspektais būtų užtikrintos, išskyrus veikimą tiriamąja medžiaga. Nežymus neigiamas slėgis kameros viduje paprastai palaikomas tam, kad tiriamoji medžiaga nepatektų į supančią aplinką. Tiriami gyvūnai kameroje turėtų būti nesusigrūdę. Siekiant užtikrinti kameros atmosferos stabilumą, tūris, kurį užima tiriamieji gyvūnai, neturėtų viršyti 5 % tyrimui naudojamos kameros tūrio.

▼B

Reikėtų atlikti tokius matavimus arba priežiūrą:

- i) oro srautas: oro srauto, patenkančio per kamerą, greitis turi būti pastoviai prižiūrimas;
- ii) koncentracija: kasdieninio veikimo metu tiriamosios medžiagos koncentracija neturėtų peržengti ± 15 % vidutinės vertės. Viso tyrimo laikotarpiu reikėtų stengtis, kad koncentracijos būtų palaikomos kaip galima labiau pastovios kiekvieną dieną, jei tai įmanoma praktiškai;
- iii) temperatūra ir drėgmė: graužikų atveju temperatūra turėtų būti palaikoma 22 ± 2 °C ir drėgmė kameroje turėtų siekti nuo 30 % iki 70 %, išskyrus tą atvejį, kai naudojamas vanduo tam, kad tiriamoji medžiaga virstų suspensija kameros atmosferoje. Reikėtų pastoviai stebėti temperatūrą bei drėgmę;
- iv) dalelių dydžio matavimai: reikėtų nustatyti kameros atmosferoje esančių dalelių, įskaitant skysčius ar kietuosius aerozolius, dydžius. Aerozolių dalelės turėtų būti tokio dydžio, kad naudojamas tiriamasis gyvūnas jas galėtų įkvėpti. Kameros atmosferos mėginiai turėtų būti įnešami į gyvūnų kvėpuojamąją zoną. Oro mėginys, remiantis gravimetrine analize, turėtų atspindėti dalelių, kuriomis gyvūnai veikiami, pasiskirstymą ir visus aerozolius, esančius suspensijoje, netgi jei didžioji aerozolio dalis nėra įkvėpiama. Dalelių dydį reikėtų nustatinėti kaip galima dažniau, kuriant sistemą tam, kad būtų užtikrintas aerozolio stabilumas ir po to kuo dažniau veikimų metu tam, kad būtų galima tinkamai nustatyti dalelių, kuriomis gyvūnai veikiami, pasiskirstymą.

1.6.7. Tyrimo trukmė

Karcinogeniškumo testas trunka didžiąją tiriamųjų gyvūnų gyvenimo dalį. Pelių ir žiurkėnų atveju tyrimą reikėtų baigti po 18 mėnesių, o žiurkių atveju – po vienerių metų; tačiau konkrečių gyvūnų kamienų, kurių gyvenimo trukmė yra ilgesnė ir (ar) esant lėtam auglių vystymuisi, atveju, tyrimą reikėtų baigti po vienerių metų (pelės ir žiurkėnai) bei po 30 mėnesių (žiurkės). Priešingu atveju, toks pratęstas tyrimas baigiamas, jei gyvūnų, priklausančių kontrolinei bei mažiausios dozės grupėms, skaičius siekia 25 %. Jei užbaigiamas testas, kurio metu buvo nustatytas aiškus lyčių skirtumas pagal atsaką, kiekviena lytis apsvarstoma atskirai. Jei dėl akivaizdžių toksiškumo priežasčių miršta grupė, gavusi didelę dozę, nebūtina baigti tyrimą, pasireiškiant toksinėms reakcijoms, kurios nesukelia problemų kitoms tiriamosioms grupėms. Neigiamas testo rezultatas priimtinas tada, kai ne daugiau kaip 10 % bet kurios grupės gyvūnų nugaista eksperimento metu dėl autolizės, kanibalizmo ar laikymo sąlygų ir po 18 mėnesių išlieka ne mažiau kaip 50 % visų grupių pelių bei žiurkėnų, po 24 mėnesių – ne mažiau kaip 50 % žiurkių.

Atliekant chroninio toksiškumo testą, mažiausiai metus naudojamos papildomos grupės, veikiamos tiriamąja medžiaga ir sudarytos iš 20 kiekvienos lyties gyvūnų bei kontrolinės grupės, sudarytos iš 10 kiekvienos lyties gyvūnų. Turėtų būti numatytas gyvūnų numarinimas, kad būtų galima tirti tiriamosios medžiagos sukeltus patologinius procesus, kuriems neturi įtakos gyvūnų senėjimas.

▼B1.6.8. *Procedūra*1.6.8.1. *Stebėjimai*

Kasdien reikėtų atlikti narveliuose laikomų gyvūnų odos ir kailio, akių bei gleivinių membranų, o taipogi kvėpuojamojo trakto, apytakos, autonominės bei centrinės nervų sistemų, somatomotorinio ir elgsenos pakitimų stebėjimus.

Reikėtų atitinkamais laiko tarpais atlikti papildomų tiriamųjų grupių gyvūnų klinikinį tyrimą. Reguliariai atliekami gyvūnų stebėjimai yra būtini, kaip galima labiau užtikrinant, kad gyvūnai nenugaištų tyrimo metu dėl tokių priežasčių, kaip kanibalizmas, audinių autolizė bei vietos pakeitimas. Nugaišę gyvūnai turėtų būti pašalinti ir skrodžiami, jei nurodyta.

Reikėtų registruoti visų gyvūnų klinikinius požymius bei mirtinumą. Ypatingas dėmesys turi būti skiriamas auglių vystymuisi: turėtų būti registruojamas kiekvieno akivaizdžiai matomo bei užčiuotiamo auglio pasireiškimo laikas, vieta, dydis ir išorė; reikėtų registruoti toksinių sąlygų pasireiškimo laiką bei eigą.

Pirmąsias 13 tyrimo savaitių reikėtų nustatyti pašaro (ir vandens, jei tiriamoji medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu) įsisavinimą ir vėliau tai daryti maždaug kas trys mėnesiai, nebent sveikatos būklė ar kūno masės pokyčiai verčia elgtis kitaip.

Pirmąsias 13 tyrimo savaitių bent vieną kartą per savaitę, o vėliau – bent kartą per mėnesį reikėtų pasverti visus gyvūnus.

1.6.8.2. *Klinikiniai tyrimai**Hematologinis tyrimas*

Praėjus trimis, šešiams mėnesiams, o paskui kas pusę metų ir surinkus kraujo mėginius iš kiekvienos grupės dešimties kiekvienos lyties žiurkių, reikėtų atlikti hematologinį tyrimą (nustatant hemoglobino kiekį, eritrocitų užimamą tūrį kraujyje absoliutų eritrocitų, leukocitų ir trombocitų skaičių arba kitus rodiklius kraujo krešėjimo aktyvumui įvertinti). Jei įmanoma, tai kraujo mėginiai imami iš tų pačių žiurkių tokiu pačiu laiko tarpu.

Jei, remiantis laikomų narveliuose gyvūnų stebėjimais, spėjama, kad tyrimo metu sutriko gyvūnų sveikata, reikėtų atlikti diferencinę gyvūnų, paveiktų tiriamąja medžiaga, kraujo analizę. Atliekama diferencinė gyvūnų, kuriems buvo duota didžiausia medžiagos dozė, bei kontrolinės grupės individų kraujo analizė. Kitos grupės (ar grupių), kuriai (-ioms) buvo duota mažesnė dozė, diferencinė kraujo analizė atliekama, jei egzistuoja pagrindinis skirtumas tarp didžiausią dozę gavusios ir kontrolinės grupės arba tai buvo nustatyta patologinių tyrimų metu.

▼B**Šlapimo analizė**

Reikėtų surinkti šlapimo mėginius iš kiekvienoje grupėje esančių 10 kiekvienos lyties žiurkių, jei įmanoma, surenkant iš tų pačių žiurkių tais pačiais laiko tarpais, kaip tai buvo atliekama hematologinių tyrimų metu. Reikėtų atlikti kiekvieno gyvūno arba mėginių rinkinio, arba vienos lyties gyvūnų, esančių, vienoje graužikų grupėje, tokius tyrimus:

- išvaizda: individualaus gyvūno šlapimo tūris bei tankumas,
- baltymų, gliukozės, ketonų, paslėpto kraujo kiekis (pusiau kiekybiškai),
- nuosėdų mikroskopinis vaizdas (pusiau kiekybiškai).

Klinikinė chemija

Maždaug kas šešis mėnesius ir tyrimo pabaigoje iš visų negraužikų bei 10 kiekvienos lyties ir visų grupių žiurkių, jei įmanoma, iš tų pačių žiurkių esant tam pačiam laiko tarpui, turėtų būti surenkami kraujo mėginiai, kad vėliau būtų ištirti klinikinės chemijos aspektu. Paėmus mėginius, paruošiama plazma ir atliekami tokie matavimai:

- absoliuti baltymo koncentracija,
- albumino koncentracija,
- kepenų funkciniai testai (tokie kaip šarminės fosfatazės aktyvumo nustatymo testas, glutamino piruvato transaminazės ⁽¹⁾ aktyvumo nustatymo testas ir glutamato oksal acetato transaminazės ⁽²⁾ aktyvumo nustatymo testas), gama glutamiltranspeptidazė, ornitino dekarboksilazė,
- angliavandenių metabolizmas, įvertinant gliukozės kraujyje trūkumą,
- inkstų funkciniai testai, tokie kaip šlapalo nustatymas kraujyje.

Pagrindinis skrodimas

Turėtų būti atliktas visapusiškas bendras visų gyvūnų skrodimas, įskaitant tuos, kurie nugaišo eksperimentų metu arba buvo numarinti tada, kai buvo nustatyta, jog jie miršta. Prieš numarinimą turėtų būti paimti visų gyvūnų kraujo mėginiai tam, kad būtų atlikta diferencinė kraujo analizė. Visi akivaizdžiai matomi sutrikimai, augliai ar sutrikimai, kurie, kaip įtariama, gali būti augliai, turėtų būti užkonservuoti. Reikėtų stengtis rasti sąsajas tarp pagrindinių stebėjimų ir mikroskopinių analizių.

Histopatologiniams tyrimams turėtų būti išsaugomi visi audiniai ir organai, tokie kaip: smegenys ⁽³⁾ (pailgųjų smegenų/smegenų tilto pjūviai, smegenėlių ir smegenų žievės), hipofizė, tiroidinė liauka (įskaitant paratiroidinę liauką), užkrūčio liaukos audinys, plaučiai (įskaitant trachėją), širdis, aorta, seilių liaukos, kepenys ⁽⁵¹⁾, blužnis, inkstai ⁽⁵¹⁾, antinksčiai ⁽⁵¹⁾, stemplė, skrandis, dvylikapirštė žarna, tuščioji žarna, klubinė žarna, akloji žarna, tiesioji žarna, riestoji žarna, gimda, šlapimo pūslė, limfmazgiai, kasa, lytinės liaukos ⁽⁵¹⁾, pagalbiniai lytiniai organai, moterų pieno liauka, oda, raumenynas, periferinis nervas, stuburo smegenys (sprando, krūtinės ląstos ir juosmens), krūtinkaulis su kaulų čiulpais, šlaunikaulis (įskaitant sąnarį) ir akys.

⁽¹⁾ Dabar žinoma kaip serumo alaninamino transferazė.

⁽²⁾ Dabar žinoma kaip serumo aspartamino transferazė.

⁽³⁾ šie organai, paimti iš 10 kiekvienos lyties ir visų grupių graužikų, turėtų būti pasverti.

▼B

Nors plaučių ir šlapimo pūslės pripildymas fiksuojančiąja medžiaga yra optimalus būdas išsaugoti šiuos audinius; plaučių pripildymas įkvėpimo tyrimuose yra svarbus atitinkamų histopatologinių tyrimų aspektu. Ypatingų tyrimų, tokių, kaip įkvėpimo tyrimai, atveju, reikėtų tirti visą kvėpuojamąjį traktą, įskaitant nosies ertmę, gerklą ir ryklę.

Jei atliekami kiti klinikiniai tyrimai, tai šių procedūrų metu gauta informacija turėtų būti prieinama, atliekant mikroskopinę analizę, nes ta informacija yra pagrindinė patologo darbo gairė.

Histopatologinis tyrimas

Atliekant chroninio toksiškumo tyrimą:

Reikėtų detaliai ištirti visų, gavusių didelę dozę bei kontrolinių grupių gyvūnų užkonservuotus organus. Jei tiriant didelę dozę gavusią papildomą grupę, nustatomi su tiriamąja medžiaga susiję patologiniai pokyčiai, bet kurios kitos tiriamąja medžiaga veiktos grupės gyvūnų organai, veikti tiriamąja medžiaga, turėtų būti pilnai ištirti histologiniu aspektu, o taip pat tai turi būti padaryta tiriamųjų grupių, atliekant karcinogeniškumo tyrimą bei jo pabaigoje, atveju.

Atliekant karcinogeniškumo testą:

- a) reikėtų atlikti visų gyvūnų, kurie nugaišo arba buvo numarinti testo metu, o taipogi visų kontrolinės bei gavusios didelę dozę grupių gyvūnų pilną histopatologinę analizę;
- b) reikėtų mikroskopiškai ištirti visose grupėse akivaizdžiai matomus auglius ar sutrikimus, kurie, kaip įtariama, gali būti augliai;
- c) jei gavusios didelę dozę ir kontrolinė grupės skiriasi pagal neoplastinių sutrikimų pasireiškimą, tai reikėtų ištirti konkrečius šių grupių organus ar audinius;
- d) jei gavusios didelę dozę grupės gyvūnų išgyvenamumas ypač skiriasi nuo kontrolinės grupės, tai reikėtų detaliai ištirti kitą, mažesnę dozę gavusią grupę;
- e) jei egzistuoja įrodymai, kad toksiniai ar kiti efektai galėjo sukelti neoplastinį atsaką grupėje, gavusioje didelę dozę, tai reikėtų detaliai ištirti kitą, mažesnę dozę gavusią grupę.

2.

DUOMENYS

Duomenys turėtų būti apibendrinami pasitelkiant lenteles, kuriose nurodomas kiekvienos tiriamosios grupės gyvūnų skaičius tyrimo pradžioje, gyvūnų, kuriuose buvo pastebėti pakitimai, skaičius, pakitimų tipai bei gyvūnų, kuriuose pasireiškė kiekvieno tipo pakitimai, skaičius, išreikštas procentais. Rezultatus reikėtų vertinti atitinkamu statistiniu metodu. Galima naudoti bet koki visuočiai vartojamą statistinį metodą.

▼B**3. ATASKAITA****3.1. TYRIMO ATASKAITA**

Jei įmanoma, tai tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

— rūšis, veislė, kamienas, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras,

— tyrimo sąlygos:

Aparato, kuris naudojamas veikimui medžiaga, aprašymas

Įskaitant konstrukciją, tipą, išmatavimus, oro šaltinį, dalelių ir aerosolių sukūrimo sistemą, vėdinimo metodą, veikimą iškvėptu oru ir gyvūnų laikymo kameroje, kai ji naudojama, metodą. Reikėtų aprašyti matuojamą temperatūrą, drėgmę ir, jei reikia, aerosolių koncentracijų arba dalelių dydžio stabilumą.

Veikimo metu gauti duomenys

Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant vidurkius ir variacijos dydį (pvz., standartinį nukrypimą) ir pateikiant:

- a) oro srauto, pereinančio per įkvėpimo įrangą, greičius;
- b) oro temperatūrą ir drėgmę;
- c) nominalias koncentracijas (absoliutus įkvėpio įrangoje esančios tiriamosios medžiagos kiekis, padalytas iš oro tūrio);
- d) prietaiso, jei jis naudojamas, pobūdį;
- e) tikrąsias koncentracijas, esančias tiriamoje kvėpuojamoje zonoje;
- f) vidutinius dalelių dydžius (jei įmanoma nurodyti):

— dozių dydžiai (įskaitant prietaisą, jei toks buvo naudotas) ir jų koncentracijos,

— auglių aptikimo duomenys tiriant pagal lytį duotą dozę ir auglių tipą,

— mirties laikas arba tyrimo metu, arba jei gyvūnai išliko iki numarinimo (įskaitant ir papildomos kontrolinės grupės gyvūnus),

— duomenys apie toksinį atsaką pagal tirtą lytį ir duotą dozę,

— toksinių ir kitų efektų apibūdinimas,

— kiekvieno nenormalaus požymio ir iš jo išplaukiančių pasekmių pastebėjimo momentas,

— oftalmologinių stebėjimų rezultatai,

— duomenys apie pašarą bei kūno masę,

— naudoti hematologiniai tyrimai ir jų metu gauti rezultatai,

— naudoti klinikinės biochemijos tyrimai ir jų metu gauti visi (įskaitant bet kurios šlapimo analizės) rezultatai,

▼B

- skrodimo metu gauti duomenys,
- visų histopatologinių tyrimų metu gautų duomenų detalus apibūdinimas,
- rezultatų statistinė analizė ir visų naudotų metodų aprašymai,
- rezultatų aptarimas,
- rezultatų aiškinimas.

3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. NUORODOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼B**B.34. VIENOS KARTOS DAUGINIMOSI TOKSIŠKUMO TESTAS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. SĄVOKOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. TYRIMO METODO PRINCIPAS

Tiriamoji medžiaga duodama laipsniškomis dozėmis keleto eksperimentinių grupių gyvūnų patinams bei patelėms. Patinams dozės turėtų būti duodamos augimo metu ir pasibaigus mažiausiai vienai spermatogenezei (praėjus maždaug 56 dienoms – pelių patinams ir 70 dienų – žiurkių patinams) tam, kad būtų galima įvertinti bet kokius neigiamus tiriamosios medžiagos poveikius spermatogenezei.

Tėvinės (P) kartos patelėms turi būti duodama dozė, praėjus mažiausiai dviem mėnesiams tam, kad būtų galima įvertinti bet kokius neigiamus tiriamosios medžiagos poveikius kiaušinėlių subrendimo atžvilgiu. Tada gyvūnai suporuojami. Tiriamoji medžiaga duodama abiejoms lytims poravimosi metu ir vėliau duodama tik patelėms, iš pradžių nėštumo, o vėliau žindymo metu. Medžiagos davimo įkvepiant metodą reikia modifikuoti.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. TYRIMO METODO APIBŪDINIMAS**1.6.1. *Pasiruošimas tyrimui***

Prieš pradedant tyrimą sveiki gyvūnų jaunikliai atsitiktinai atrenkami ir suskirstomi į tiriamąją bei kontrolinę grupes. Mažiausiai penkias dienas prieš testą gyvūnai yra laikomi eksperimentinėje fermoje, kur jie šeriami bei girdomi. Rekomenduojama, kad tiriamoji medžiaga būtų duodama kartu su pašaru ar geriamuoju vandeniu. Taipogi galima naudoti ir kitus davimo būdus. Visiems gyvūnams tiriamosios medžiagos dozė turėtų būti duodama tuo pačiu metodu atitinkamo eksperimentinio periodo metu. Jei dozavimui naudojamas įrenginys ar kiti priedai, tai jie neturėtų sukelti toksinių efektų. Dozė turėtų būti duodama septynis kartus per savaitę.

▼B

1.6.2. Eksperimentiniai gyvūnai

Rūšių parinkimas

Labiausiai naudojamos gyvūnų rūšys yra pelės arba žiurkės. Reikėtų naudoti sveikus gyvūnus, kurių atžvilgiu anksčiau nebuvo taikytos eksperimentinės procedūros. Tiriamieji gyvūnai turėtų būti apibūdinami pagal rūšį, kamieną, lytį, svorį ir (ar) amžių.

Norint tinkamai įvertinti vaisingumą, reikėtų tirti tiek patinus, tiek ir pateles. Prieš pradedant duoti dozę, visi tiriamieji bei kontroliniai gyvūnai turėtų būti atjunkyti.

Skaičius ir lytis

Kiekvienoje – tiriamojoje ir kontrolinėje – grupėje turėtų būti pakankamas gyvūnų skaičius – apie 20 nėščių patelių, gimdančių arba arti nėštumo pabaigos.

Tai daroma siekiant užtikrinti pakankamą nėštumu ir prieauglio skaičių tam, kad būtų galima įvertinti tiriamosios medžiagos sugebėjimo daryti įtaką vaisingumui, nėštumui ir patelių elgesiui tėvinės kartos P gyvūnuose nuo apvaisinimo iki subrendimo, pirmosios kartos F₁ palikuonių žindymui, augimui bei vystymuisi svarbą.

1.6.3. Tyrimo sąlygos

Pašaras ir vanduo turėtų būti duodami *ad libitum*. Artėjant gimdymui, nėščios patelės turėtų būti atskiriamos, perkeltos į gimdymui ar motinoms skirtus narvelius, kurie turi būti aprūpinti būtinausiomis medžiagomis gūžtai įrengti.

1.6.3.1. Dozė

Turėtų būti naudojamos mažiausiai trys tiriamosios bei viena kontrolinė grupės. Jei tiriamoji medžiaga duodama naudojant prietaisą, kontrolinė grupė kartu su prietaisu turėtų gauti didžiausią tiriamosios medžiagos tūrį. Jei tiriamoji medžiaga pašaro pasisavinimą ar sunaudojimą, tada reikia panaudoti gretutinę maitinamą kontrolinę grupę. Būtų geriausia, kad nekreipiant dėmesio į tiriamosios medžiagos fizikinės/cheminės prigimties ar biologinių veikimo efektų sukeliamus apribojimus, didžiausia dozė sukeltų toksiškumą, bet ne mirtį tėvinės kartos (P) gyvūnų tarpe. Tarpinė tiriamosios medžiagos dozė turėtų sukelti minimalius toksinius efektus ir maža dozė neturėtų sukelti jokių pastebimų žalingų efektų tėvams ar palikuonims. Kai kiekvienam gyvūnui medžiagos dozė duodama per zondą arba su kapsule, tai ji parenkama, atsižvelgus į kiekvieno gyvūno kūno masę ir kalibruojama kiekvieną savaitę priklausomai nuo kūno masės pokyčių. Nėštumo metu medžiagos davimas dozėmis patelėms gali būti pagrįdžiamas kūno masės duomenimis 0 arba 6 nėštumo dieną, jei to pageidaujama.

1.6.3.1. Ribų tyrimas

Jei vartojant mažo toksiškumo medžiagas dozė – 1 000 mg kilogramui – netrukdo dauginimuisi, laikomasi nuostatos, kad tyrimai naudojant kitas dozes nėra būtini. Jei išankstinio tyrimo metu naudojama didelė dozė, sukelianti akivaizdų toksiškumą patelėse, nepažeidžia vaisingumo, tai laikomasi nuostatos, jog tyrimai, naudojant kitas dozes nėra būtini.

▼B1.6.3.3. *Testo 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. Žiurkių tarpe dozės davimas dar pratęsiamas 10 savaičių, likusių iki suporavimo periodo (tarp pelių – dar aštuonioms savaitėms). Poravimosi periodo pabaigoje patinai turėtų būti numarinami ir tiriami arba kitu atveju juos galima palikti gyvus ir šerti tyrimo metu tam, kad atsivestų antrąją vadą, po kurios jie turėtų būti numarinti bei tiriami prieš pasibaigiant tyrimui. 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 periodo bei nėštumo metu iki F₁ kartos palikuonių atjunkymo. Reikėtų apsvarstyti dozės davimo tvarkaraščio pakeitimus, remiantis kita prieinama informacija, tokia kaip tiriamosios medžiagos sukeltas metabolizmas arba bioakumuliacija.

Poravimosi procedūra

Tiriant toksiškumo įtaką 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 nėštumas arba praeina trys savaitės. Kiekvieną rytą patelės turėtų būti tiriamos, ieškant spermos arba makšties kamščio. Nulinė nėštumo diena yra ta, kai randama sperma arba susidaręs makšties kamštis.

Tos poros, kurioms nepasiseka susiporuoti, turėtų būti akivaizdžiai nevaisingomis.

Todėl galima imtis tokių papildomų procedūrų kaip poravimo su kitais tikrai veisliniais patiniais ar patelėmis, mikroskopiškai analizuojant dauginimosi organus ir tiriant kiaušinėlio ir spermatozoidų susiformavimo ciklą.

Vados dydžiai

Gyvūnams, kuriems vaisingumo tyrimo metu duodama dozė, leidžiama normaliai atsivesti palikuonių ir prižiūrėti juos iki atjunkymo, nestandartizuojant vados dydžio.

Kai atliekamas vados dydžio standartizavimas, siūloma atlikti tokią procedūrą. Praėjus 1-4 dienoms po gimimo, kiekvienos vados dydis gali būti nustatomas, pašalinant perteklinį prieauglį atrankos būdu, stengiantis, kad vienoje 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.

▼B**1.6.4. Stebėjimai**

Testo metu kiekvienas gyvūnas turėtų būti stebimas kasdien. Reikėtų registruoti atitinkamus elgesio pokyčius, komplikuoto arba užsitęsio nėštumo požymius ir visus toksiškumo požymius, įskaitant mirtingumą. Prieš poravimosi periodą ir jo metu reikėtų kasdien įvertinti pašaro sunaudojimą. Pasibaigus gimdymui ir prasidėjus laktacijai, tuo pat metu reikėtų pasverti vada per įvertinti pašaro sunaudojimą (ir tuo pat metu įvertinti geriamo vandens sunaudojimą, jei tiriamoji medžiaga duodama su vandeniu). Pirmąją dozės davimo dieną ir vėliau po savaitės reikėtų pasverti tėvinės (P) kartos patinus ir pateles. Reikėtų pranešti apie šiuos stebėjimus, atliktus ištyrus kiekvieną gyvūną atskirai.

Nėštumo trukmė turėtų būti pradedama skaičiuoti nuo nulinės dienos. Kiekviena vada turi būti pradėta tirti kaip galima greičiau tam, kad būtų galima nustatyti naujagimių lytį, gimimų skaičių ir pagrindines anomalijas.

Nugaišę ir ketvirtą dieną po gimimo numarinti jaunikliai turėtų būti išsaugoti ir ištirti, ieškant galimų sutrikimų. Gimę jaunikliai turėtų būti pasverti ir vados pasvertos gimimo rytą, po ketvirtą bei septintą dieną ir po savaitės bei kol baigsis tyrimas, kai kiekvienas gyvūnas bus pasvertas atskirai.

Reikėtų registruoti fizinius ar elgesio sutrikimus veislinėse patelėse bei jų palikuonyse.

1.6.5. Patologija**1.6.5.1. Skrodimas**

Tyrimo metu numarinus ar nugaišus tėvinės kartos (P) gyvūnams, juos reikėtų makroskopiškai ištirti tam, kad nustatyti bet kokias struktūrines anomalijas ar patologinius pakitimus, ypač atkreipiant dėmesį į dauginimosi organus. Nugaišę ar mirštantys gyvūnai turėtų būti ištirti, siekiant nustatyti sutrikimus.

1.6.5.2. Histopatologinis tyrimas

Mikroskopiniam tyrimui reikėtų išsaugoti tėvinės kartos (P) gyvūnų kiaušides, gimdą, gimdos kaklelį, makštį, sėklides, sėklidės prielipą, spermą gaminančius maišelius, prostatą, koaguliacijos liauką, hipofizę bei tiriamąją medžiaga paveiktus organus. Jei atliekant tyrimus ir naudojant daug skirtingų dozių, šie organai nebuvo tirti, juos reikėtų mikroskopiškai ištirti didelę dozę gavusiuose gyvūnuose, kontrolinės grupės gyvūnuose bei tyrimo metu nugaišusiuose gyvūnuose, jei tai praktiškai įmanoma padaryti.

Tų gyvūnų organai, kuriuose buvo nustatytos anomalijos, turėtų būti ištirti visuose likusiuose tėvinės kartos (P) gyvūnuose. Šiuo atveju, reikėtų mikroskopiškai tirti tuos audinius, kuriuose pastebėti pagrindiniai patologiniai pokyčiai. Kaip buvo pasiūlyta suporavimo procedūrų metu, tų gyvūnų, kurie, kaip įtariama, gali būti nevaisingi, dauginimosi organai turi būti mikroskopiškai tiriami.

▼B**2. DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti apibendrinami pasitelkiant lenteles, kuriose nurodomas kiekvienos tiriamosios grupės gyvūnų skaičius tyrimo pradžioje, vaisingų bei nėščių patelių skaičius, pokyčių tipai ir gyvūnų, kuriuose pasireiškė kiekvieno tipo pokyčiai, skaičius, išreikštas procentais.

Jei įmanoma, išreikšti skaičiais rezultatai turėtų būti apdorojami pasitelkus atitinkamą statistinį metodą. Reikėtų naudoti bet koki visuo-tinai naudojamą statistinį metodą.

3. ATASKAITA**3.1. TYRIMO ATASKAITA**

Jei įmanoma, tai tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia infor-macija:

- panaudota rūšis/kamienas,
- duomenys apie toksinį atsaką pagal tirtą lytį ir duotą dozę, įskai-tant vaisingumą, nėštumą ir gyvybingumą,
- mirties laikas tyrimo metu arba jei gyvūnai išliko iki tyrimo pabaigos,
- lentelė, kurioje pateikiama kiekvienos vados kūno masė, vidutinis jauniklių svoris vidurkiai ir kiekvieno jauniklio kūno masė tyrimo pabaigoje,
- toksiniai ar kiti efektai, turinys įtakos dauginimuisi, palikuonims bei jų vystymuisi,
- kiekvieno nenormalaus požymio ir iš jo išplaukiančių pasekmių stebėjimo laikas,
- tėvinės kartos (P) gyvūnų svoris,
- skrodimo metu gauti duomenys,
- mikroskopinių tyrimų duomenų detalus 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.

▼B**B.35. TOKSIŠKO POVEIKIO DVIEJŲ KARTŲ REPRODUKCIJAI TYRIMAS****1. METODAS**

Šis metodas atitinka OECD TG 416 (2001).

1.1 ĮVADAS

Šis dviejų kartų reprodukcijos bandymo metodas skirtas suteikti bendros informacijos apie bandomosios medžiagos poveikį patinų ir patelių reprodukcijos sistemų vientisumui ir veiksmingumui, įskaitant lytinių liaukų funkciją, rujaną ciklą, poravimosi elgesį, apvaisinimą, veisimą, atsivedimą, laktaciją, atjunkymą ir palikuonių augimą bei vystymąsi. Be to, tyrimas gali suteikti informacijos apie bandomosios medžiagos poveikį naujagimių liguistumui, gaištamumui, pirminių duomenų apie toksišką poveikį prenataliniam ir postnataliniam vystymuisi ir parengti vėliau daromų bandymų gaires. Taikant šį metodą tiriamas ne tik F1 kartos augimas ir vystymasis, jis taip pat skirtas patinų ir patelių reprodukcijos sistemų vientisumui bei veiksmingumui ir F2 kartos augimui bei vystymuisi įvertinti. Norint gauti papildomos informacijos apie toksišką poveikį vystymuisi ir funkcinis trūkumus, šį protokolą galima papildyti tyrimais, aprašytais atitinkamuose toksiško poveikio vystymuisi ir (arba) neurotoksiško poveikio vystymuisi metoduose, arba šie parametrai galėtų būti tiriami darant atskirus tyrimus, kuriuose būtų taikomi atitinkami bandymų metodai.

1.2 BANDYMŲ METODO ESMĖ

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 yra nustatomas pagal kelis spermos parametrus (pvz., spermos morfologiją ir spermatozoidų judrumą), audinių preparatuose ir darant detalų histopatologinį tyrimą. Jei duomenys apie spermatogenezę yra gauti ankstesniame pakankamos trukmės kartotinos dozės tyrime, pvz., 90 parų tyrime, P kartos patinus nebūtina įtraukti į įvertinimą. 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 rujaną ciklus, kad būtų galima nustatyti bet kokį neigiamą bandomosios medžiagos poveikį normaliam rujaną ciklui. Bandomoji medžiaga duodama tėvų kartos (P) gyvūnams poruojantis, veisimo 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.

Visiems gyvūnams atiekami klinikiniai stebėjimai ir patologiniai tyrimai toksiškumo požymiams nustatyti, kreipiant ypač didelį dėmesį į poveikį patinų ir patelių reprodukcijos sistemų vientisumui ir veiksmingumui bei palikuonių augimui ir vystymuisi.

▼B**1.3 BANDYMŲ METODO APRAŠYMAS****1.3.1 Gyvūnų rūšies pasirinkimas**

Tinkamiausia bandymo 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. Tyrimo pradžioje naudojamų gyvūnų masės skirtumas turi būti kiek įmanoma mažesnis ir kiekvienai lyčiai neturi būti didesnis kaip 20 % vidutinės masės.

1.3.2 Laikymo ir šėrimo sąlygos

Bandymo gyvūnų patalpos temperatūra turi būti 22 °C ($\pm$ 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. 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 grupėmis. Poruojama turi būti šiam tikslui pritaikytuose narveliuose. Pasitvirtinus susiporavimui, suporuotos patelės turi būti laikomos po vieną atsivedimo arba veisimo narveliuose. Suporuotos žiurkės gali būti laikomos mažomis grupėmis ir atskiriamos likus vienai arba dviem paroms iki atsivedimo. Artėjant atsivedimui, suporuotos patelės turi būti aprūpinamos atitinkamais ir nustatytais pakra-
tais.

1.3.3 Gyvūnų ruošimas

Naudojami jauni ir sveiki, ankstesniuose bandymuose nedalyvavę gyvūnai, kurie mažiausiai 5 paras yra pratinami prie laboratorijos sąlygų. Apibūdinama bandymo gyvūno rūšis, veislė, šaltinis, lytis, masė ir (arba) amžius. Turi būti žinoma visų gyvūnų tarpusavio giminystė, kad būtų išvengta vieno tėvų gyvūnų poravimosi. Gyvūnai atsitiktinai suskirstomi į kontrolinę ir bandymo grupę (rekomenduojama grupuoti taikant sluoksniavimą pagal kūno masę). Narveliai išdėstomi taip, kad būtų kiek įmanoma sumažintas bet koks galimas poveikis dėl narvelio vietos. Kiekvienam gyvūnui turėtų būti priskirtas savitas identifikavimo numeris. P kartos gyvūnams tai daroma prieš pradedant duoti bandomąją medžiagą. F1 kartos gyvūnams tai daroma poravimui pasirinktiems gyvūnams po jų atjunkymo. 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 funkcinis 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.

▼B**1.4 DARBO 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 veisiančių patelių. Tai gali būti neįmanoma bandant medžiagas, sukeliančias nepageidaujamą su bandoma medžiaga siejamą poveikį (pvz., nevaisingumą, per didelį toksiškumą esant didelei dozei). Tikslas – gauti pakankamą atsivedančių patelių skaičių, kad būtų galima reikšmingai įvertinti, kokia yra bandomosios medžiagos geba paveikti vaisingumą, veisimą, motinos elgesį, žindymą, F1 palikuonio augimą ir vystymąsi nuo apvaisinimo iki subrendimo ir jo palikuonių (F2) vystymąsi iki atjunkymo. Todėl nepavykus gauti norimą veisiančių patelių skaičių (t. y. 20), tyrimas nebūtinai bus netinkamas ir turi būti vertinamas atsižvelgiant į kiekvieną atskirą atvejį.

1.4.2 Dozių ruošimas

Rekomenduojama bandomąją medžiagą duoti per burną (su pašaru, geriamuoju vandeniu arba per zondą), išskyrus kai manoma, kad tinkamesnis būtų kitas davimo būdas (pvz., per odą arba įkvepiant).

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, toksiškumo 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 fizikocheminių arba biologinių bandomosios medžiagos savybių, didžiausia dozė pasirenkama siekiant sukelti tam tikrą toksišką poveikį, bet ne žūtį arba sunkias kančias. Nelaukto žūstamumo atveju, tyrimai, kuriuose tėvų kartos (P) gyvūnų žūstamumas yra maždaug kaip 10 % mažesnis, paprastai yra dar priimtini. Turi būti pasirinkta mažėjanti dozės koncentracijos seka, siekiant parodyti kiekvieną su dozės dydžiu susietą reakciją ir nesančio neigiamo poveikio lygį (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). Darant su pašaru dedamos medžiagos tyrimus, dozės neturėtų skirtis daugiau kaip 3 kartus. Dozės dydis turėtų būti pasirenkamas atsižvelgiant į visus turimus toksiškumo duomenis, ypač kartotinių dozių tyrimo rezultatus. Be to, reikėtų nagrinėti visą papildomą informaciją apie bandomojo junginio arba giminingų medžiagų apykaitą ir kinetiką. Kartu ši informacija padėtų parodyti dozavimo režimo tinkamumą.

▼B

Kontrolinė grupė turėtų būti medžiagos negaunanti grupė arba nešiklį gaunanti kontrolinė grupė, jei bandomajai medžiagai duoti naudojamasi nešiklis. Išskyrus tai, kad kontrolinės grupės gyvūnai nepaveikiami bandomąja medžiaga, jie prižiūrimi tokiu pat būdu, kaip ir bandymo grupės gyvūnai. Jei naudojamas nešiklis, kontrolinės grupės turėtų gauti nešiklio kiekį, atitinkanti didžiausią naudojamą 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 tyrimuose, skirtuose įvertinti sumažėjusio pašaro suvartojimo įtaką reprodukcijos 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 toksiškumo savybės; poveikį maisto ar vandens suvartojimui arba gyvūnų įmitimui.

1.4.4 **Ribinis bandymas**

Jei darant bandymą pagal šiame tyrime aprašytas metodikas su viena mažiausiai 1 000 mg/kg kūno masės per parą doze, kuri yra duodama per burną, arba su atitinkamos procentinės dalies doze, dedama į pašarą arba į geriamą vandenį, toksiškas poveikis tėvų grupių gyvūnams arba jų palikuonims nepastebimas ir jei tokio poveikio nelaukiama, atsižvelgiant į turimus duomenis apie giminingos struktūros ir (arba) apykaitos junginius, nebūtina daryti visą tyrimą, naudojant kelias dozių koncentracijas. Ribinis bandymas nedaromas, kai poveikis žmonėms rodo, kad reikia naudoti didesnes per burną duodamas dozes. Kalbant apie kitus davimo būdus, pvz., įkvėpimą arba veikimą per odą, bandomosios medžiagos fizikocheminės savybės dažnai gali apibrėžti ir riboti didžiausią pasiekiamą poveikio lygį.

1.4.5 **Dozių davimas**

Gyvūnai gauna bandomosios medžiagos dozę septynias dienas per savaitę. Geriau duoti per burną (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 esdinančias medžiagas, kurios esant didesnei koncentracijai turi sunkesnę poveikį, bandomojo tirpalo tūrio nepastovumas turi būti kiek įmanoma sumažintas, keičiant koncentraciją taip, kad visų dozių tūris būtų pastovus. Darant tyrimus su zondų, žiurkiškai dažniausiai gauna bandomosios medžiagos netiesiogiai su pienu tol, kol atjunkyti patys pradeda gauti dozes. Jei tyrimai daromi medžiagą dedant į pašarą arba geriamąjį vandenį, žiurkiškai papildomai gauna bandomosios medžiagos tiesiogiai, kai paskutinę laktacijos laikotarpio savaitę jie pradeda ėsti patys.

▼ **B**

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 mažiausiai kartą per savaitę pastoviam dozės ir gyvūno kūno masės santykiui užtikrinti. Reikėtų atsižvelgti į informaciją dėl placentinio pasiskirstymo, reguliuojant per zondą duodamą dozę, nustatomą pagal gyvūno masę.

1.4.6 **Bandymo programos**

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 žiurkiukų veikimas bandomąja medžiaga gali vykti laktacijos laikotarpiu. Abiem lytims (P ir F1) dozės turi būti toliau duodamos mažiausiai 10 savaičių prieš poravimo laikotarpį. Dozės toliau duodamos abiem lytims 2 savaites poravimosi laikotarpiu. Kai patinai nebereikalingi įvertinant poveikį reprodukcijai, jie turi būti humaniškai nužudomi ir ištiriami. Tėvų kartos (P) patelėms dozės duodamos toliau visą veisimo 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 paskutinius tris veisimo mėnesius.

P ir F1 kartų patinų ir patelių apdorojimas tęsiamas iki jų nužudymo. Visi P ir F1 suaugę patinai ir patelės turi būti humaniškai nužudomi, kai jų nebereikia norint įvertinti poveikį reprodukcijai. Visi poravimui nepasirinkti F1 palikuonys ir visi F2 palikuonys po atjunkymo turi būti humaniškai nužudomi.

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 tiriamos dėl spermos arba makšties kamščių atsiradimo. 0 veisimo diena apibrėžiama kaip diena, kai randama spermos arba makšties kamštis. Jei poravimas nesėkmingas, galima būtų spręsti dėl pakartotino patelių poravimo su patikrintais tos pačios grupės patiniais. Pateikiant duomenis poruojamos poros turi būti aiškiai identifikuotos. Reikėtų vengti vieno tėvų palikuonių poravimo.

▼B1.4.7.2 *F 1 kartos poravimas*

Norint poruoti F1 kartos palikuonis F2 kartai gauti, atjunkimo metu iš kiekvienos vados pasirenkamas mažiausiai vienas patinas ir viena patelė poravimui su kitais tą pačią dozę gavusiais kitos vados žiurkiukais. Kiekvienos vados žiurkiukų 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 aiškia nevaisingumo priežastį. Šiam tikslui galbūt reiktų taikyti metodikas, numatančias papildomo poravimo galimybes su kitais patikrintais patiniais arba patelėmis, dauginimosi organų mikroskopinį tyrimą ir rujos ciklą arba spermatogenezės tyrimą.

1.4.7.3 *Antrasis poravimas*

Tam tikrais atvejais, pvz., kai dėl apdorojimo 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 nedavusias 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, detalai aprašomas taikytas metodas.

1.5 STEBĖJIMAI

1.5.1 **Klinikiniai stebėjimai**

Bendrasis klinikinis stebėjimas atliekamas kas dieną, o nustatant davimo per zondą laiką, reiktų atsižvelgti 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 daromas papildomas detalesnis kiekvieno gyvūno tyrimas, kurį patogų daryti gyvūną sveriant. Du kartus per dieną ir prireikus kartą per dieną savaitgaliais visi gyvūnai turi būti stebimi liguistumo požymiams ir mirtingumui nustatyti.

▼B**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 veisimo dieną, laktacijos metu sveriamos tomis pačiomis dienomis, kaip ir vada, ir gyvūnų nužudymo dieną. Šie rezultatai turi būti pateikiami ataskaitoje atskirai apie kiekvieną suaugusį gyvūną. Poravimo ir veisimo 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

Užrašoma visų nužudytų P ir F1 patinų sėklidžių ir antsėklidžių masė ir 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 bandoma medžiaga susijęs poveikis arba jei yra kituose tyrimuose 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 nužudymo, 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.

▼B

Antsėklidžio (arba sėklinio latako) spermatozoidų judrumas įvertinimas arba filmuojamas iš karto po nužudymo. 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 filuojami (11) arba skrodimas įrašinėjamas 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 nužudymo arba vėliau pagal analoginius arba skaitmeninius vaizdo įrašus. Fiksuotus tepinius 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 sisteminio toksiškumo tyrimą, šio įvertinimo nebūtina kartoti darant dviejų kartų tyrimą. Tačiau rekomenduojama pasilikti P kartos spermos ėminius arba skaitmeninius vaizdo įrašus, kad prireikus būtų galima įvertinti vėliau.

1.5.5 **Palikuonys**

Kiekviena vada tirama kiek įmanoma greičiau po atsivedimo (0 laktacijos para) norint nustatyti žiurkiukų skaičių ir lytį, negyvagimius, gyvus palikuonis ir tai, ar yra išsigimimų. Nulinę parą rasti negyvi žiurkiukai, jei jie nemaceruoti, tiriami galimiems defektams ir žūties priežastčiai 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.

▼ B

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 registruojant lytinio brendimo duomenis (pvz., amžius ir kūno masę 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 autopsija**

Nužudyti arba darant tyrimą žuvę visi tėvų kartos (P ir F1) gyvūnai, visi žiurkiukai su išorinėmis anomalijomis arba klinikiniais požymiais, be to, atsitiktinai pasirinktas iš kiekvienos F1 ir F2 kartos žiurkiukas ar lyties atstovas ar vada tirama makroskopiškai struktūros anomalijoms arba patologiniams pakitimams nustatyti. Ypatingas dėmesys kreipiamas į reprodukcijos sistemos organus. Humaniškai nužudyti leisgyviai žiurkiukai ir negyvi žiurkiukai, jei nemaceruoti, tiriami galimiems defektams ir žūties priežastčiai nustatyti, vėliau užkonservuojami.

Tirama visų pirmą kartą gimdžiusių patelių gimda implantavimo vietų buvimui ir skaičiui nustatyti, stengiantis nepakenkti histopatologiniam įvertinimui.

1.5.7 **Organų masė**

Nužudžius nustatoma visų P ir F1 kartų tėvų kūno ir šių organų masė (poriniai organai sveriami atskirai):

— gimdos, kiaušidžių,

— sėklidės, antiseklidžio (viso ir uodegos),

— prostatos,

— sėklinių pūslelių su koaguliatorių liaukomis ir jų skysčiais ir prostatos (kaip vieno vieneto),

— smegenų, kepenų, inkstų, blužnies, hipofizio, skydliaukės, antinksčių liaukų ir žinomų veikiančių organų.

Po nužudymo nustatoma skrodimui pasirinktų F1 ir F2 žiurkiukų masė. Sveriami šie vieno atsitiktinai pasirinkto žiurkiuko ar lyties ar vados (žr. 1.5.6 skirsnį) organai: smegenys, blužnis ir užkrūčio liauka.

▼B

Bendrojo skrodimo ir organų masės rezultatai įvertinami atsižvelgiant į stebėjimus kitų kartotinės dozės tyrimų 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 tyrimuose 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 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, reprodukcijos organų įvertinimas. Turi būti ištirti visi dideli pažeidimai, pvz., atrofija arba augliai.

Daromas išsamus sėklidžių histopatologinis 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). Nepaliesto 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 reprodukcijos organų tyrimui gali būti naudojamas dažymas PAS (jodo perrūgštis 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).

▼B1.5.8.2 *Atjunkyti jaunikliai*

Histopatologiniam tyrimui fiksuojami ir tinkamoje terpėje laikomi audiniai, turintys makroskopinių anomalijų, ir visų žiurkiukų veikiami organai, turintys išorinių anomalijų arba klinikinių požymių, be to, atsitiktinai pasirinktas vienas F1 ir F2 kartų žiurkiukas ar lytis ar vada, nepasirinkta poravimui. Daromas išsamus histopatologinis konservuoto audinio apibūdinimas, ypatingą dėmesį kreipiant reprodukcijos sistemai.

2. **DUOMENYS**

2.1 REZULTATŲ APDOROJIMAS

Duomenys pateikiami atskirai ir suvedami į lenteles, kuriose kiekvienai bandymo grupei ir kiekvienai kartai nurodomas gyvūnų skaičius bandymo pradžioje, darant bandymą žuvusių arba dėl humaniško priežasčių nužudytų gyvūnų skaičius, visų gyvūnų žūtis arba nužudymo laikas, vaisingų gyvūnų skaičius, veisiančių patelių skaičius, toksiško poveikio požymių turinčių gyvūnų skaičius, pastebėtų toksiškumo požymių aprašymas, įskaitant pradžios laiką, trukmę ir bet kokio toksiško poveikio sunkumą, taikyti tėvų ir palikuonių stebėjimo būdai, histopatologinių pakitimų tipai ir atitinkami vados duomenys.

Skaitmeniniai rezultatai turi būti įvertinti taikant atitinkamą visuotinai priimtą statistinį metodą; statistiniai metodai pasirenkami kaip tyrimo 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 toksiško poveikio dviejų kartų reprodukcijai tyrimo duomenys įvertinami atsižvelgiant į pastebimą poveikį, įskaitant skrodimą ir mikroskopinio tyrimo rezultatus. Įvertinamas ryšis tarp bandomosios medžiagos ir anomalijų buvimo, nebuvimo, dažnumo ir sunkumo, įskaitant makroskopinius pakitimus, nustatytus veikiamus organus, paveiktą vaisingumą klinikines anomalijas, paveiktą reproduktivumą ir vados charakteristikas, kūno masės pokyčius, poveikį gaidamumui ir bet kokią kitą toksišką poveikį arba tokio ryšio nebuvimas. Įvertinant rezultatus reikia atsižvelgti į bandomosios medžiagos fiziokochemines savybes ir toksikokinetinius duomenis, jei tokie būtų.

Tinkamai darant toksiško poveikio reprodukcijai bandymą turi būti gautas patenkinamas poveikio nesukeliančios dozės įvertis ir neigiamo poveikio reprodukcijai, atsivedimui, laktacijai, postnataliniam vystymuisi, įskaitant augimą ir lytinį brendimą supratimas.

▼B**2.3 REZULTATŲ AIŠKINIMAS**

Toksiško poveikio dviejų kartų reprodukcijai tyrimas suteiks informacijos apie kartotinio medžiagos naudojimo poveikį visais reprodukcijos ciklo tarpsniais. Pirmiausia tyrimas suteikia informacijos apie reprodukcijos parametrus ir palikuonių vystymąsi, augimą, brendimą ir išlikimą. Tyrimo rezultatai turėtų būti aiškinami atsižvelgiant į pusiau lėtinio toksiško poveikio, toksiško poveikio prenataliniam vystymuisi ir į toksikokinetinių bei kitų atliktų tyrimų rezultatus. Šio tyrimo rezultatai gali būti naudojami įvertinant cheminės medžiagos papildomų tyrimų būtinumą. Tyrimo rezultatų ekstrapoliavimas žmonėms gali tikt tik tam tikru laipsniu. Jie labiausiai tinka, kai reikia gauti informacijos apie poveikio nesukeliančias dozes ir leistiną poveikį žmonėms (20) (21) (22) (23).

3. ATASKAITOS RENGIMAS**3.1. BANDYMŲ ATASKAITA**

Bandymų ataskaitą turi sudaryti ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

- fizinė būseną ir, jei reikia, fizikocheminės savybės,
- identifikavimo duomenys,
- grynumas.

Nešiklis (jei naudojamas):

- nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei tai ne vanduo.

Bandymo 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,
- detali informacija apie bandomosios medžiagos preparato ruošimą arba jos dėjimą į pašarą, gautos koncentracijos vertės,
- preparato stabilumas ir vienalytiškumas,
- detali 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,
- detali informacija apie pašaro ir vandens kokybę.

▼B

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 žiurkiukų masės duomenys,
- tėvų kartų kūno masė nužudant ir absoliučios bei santykinės organų masės duomenys,
- klinikinių požymių tipas, sunkumas ir trukmė (grįžtami ar negrįžtami),
- žūties darant tyrimą laikas arba gyvūnai, išgyvenę iki nužudymo,
- toksiškumo duomenys pagal lytį ir dozę, įskaitant poravimo, vaisingumo, veisimo, gimstamumo, gyvybingumo ir laktacijos rodiklius; ataskaitoje nurodomi skaičiai, naudojami rodikliams apskaičiuoti,
- toksiškas arba kito tipo poveikis reprodukcijai, palikuonims, postnataliniam augimui ir t. t.,
- skrodimo rezultatai,
- detalus visų histopatologinių rezultatų aprašymas,
- P ir F1 patelių, turinčių normalų ciklą, skaičius ir ciklo trukmė,
- suminis spermatozoidų antsklidžio 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,
- veisimo trukmė,
- implantacijų, geltonkūnių skaičius, vados dydis,
- gimusių gyvų žiurkiukų skaičius ir poimplantaciniai nuostoliai,
- žiurkiukų su aiškiai matomais išsigimimais skaičius; pateikiamas silpniausių žiurkiukų skaičius, jei buvo nustatomas,
- žiurkiukų fiziniai duomenys ir kiti postnatalinio vystymosi duomenys; įvertinti fiziniai parametrai turi būti pagrįsti,
- žiurkiukų ir suaugusių gyvūnų funkcinių stebėjimų duomenys, kai tinka,
- statistinis duomenų apdorojimas, jei reikia.

▼ **B**

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 Spermatotoxicity 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.

▼B

- 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.

▼ B**B.36. TOKSIKOKINETIKA****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. SĄVOKOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4. TYRIMO METODO PRINCIPAS

Tiriamoji medžiaga duodama atitinkamu būdu. Atsižvelgiant į tyrimo tikslą, tam tikrais periodais medžiaga gali būti duodama pavieniškai ar kartotinėmis dozėmis keleto eksperimentinių grupių gyvūnams. Vėliau, priklausomai nuo tyrimo tipo, kūno skysčiuose, audiniuose ir (ar) ekskretuose nustatoma medžiaga ir (ar) metabolitai.

Galima tirti „nežymėtas“ ir „žymėtas“ tiriamosios medžiagos formas. Jei naudojama žymė, tai ji į tiriamąją medžiagą turi būti įvesta taip, kad būtų galima gauti kuo išsamesnės informacijos apie junginio likimą.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Nėra.

1.6. TYRIMO METODO APIBŪDINIMAS***Pasiruošimas tyrimui***

Mažiausiai penkias dienas prieš tyrimą sveiki gyvūnų jaunikliai aklimatizuojami laboratorinėmis sąlygomis. Prieš pradėdant tyrimą gyvūnai atsitiktinai atrenkami ir suskirstomi į tiriamąją bei kontrolinę grupes. Ypatingais atvejais galima naudoti labai jaunus gyvūnus, nėščias pateles, bei gyvūnus, iš anksto paveiktus tiriamąja medžiaga.

Tyrimo sąlygos***Eksperimentiniai gyvūnai***

Toksikokinetiniai tyrimai gali būti atliekami panaudojant vieną ar daugiau atitinkamų gyvūnų rūšių, ir reikia atsižvelgti į rūšis, kurios yra naudojamos ir kurios pasirinktos naudoti kituose tos pačios tiriamosios medžiagos toksikologiniuose tyrimuose. Jei teste naudojami graužikai, tai jų kūno masės variacija neturėtų viršyti $\pm 20\%$ kūno masės vidurkio.

Skaičius ir lytis

Tiriant absorbciją ir ekskreciją, iš pradžių kiekvienoje grupėje, kuriai duodama skirtinga dozė, turėtų būti po keturis gyvūnus. Lyties pasirinkimas nėra būtinas, tačiau ypatingais atvejais reikėtų tirti abi lytis. Jei egzistuoja lyčių skirtumai pagal atsaką, tai reikėtų ištirti po keturis kiekvienos lyties gyvūnus. Tiriant negraužikus, galima naudoti tik keletą gyvūnų. Kai tiriamas medžiagos pasiskirstymas audiniuose, tyrimo pradžioje reikėtų atsižvelgti į grupės dydį pagal gyvūnų, kurie bus numarinti numatyto laiko momentu, ir laiko momentų, kurių metu bus tiriami gyvūnai, skaičių.

▼B

Kai tiriamas metabolizmas, tai grupės dydis priklauso nuo tyrimo poreikių. Atliekant daugelio dozių ir daugelio laiko momentų tyrimus, reikėtų atsižvelgti į grupės dydį pagal laiko momentus ir numatomus numarinimus, tačiau grupėje turi būti ne mažiau kaip du gyvūnai. Grupė turėtų būti pakankamai didelė, kad būtų galima tinkamai apibūdinti tiriamosios medžiagos ir (ar) metabolitų pasisavinimą, stabilizavimąsi bei pašalinimą.

Dozė

Kai duodama pavienė dozė, tai mažiausiai dvi jos koncentracijos turėtų būti naudojamos. Turėtų būti duodama maža, nesukelianti toksinių efektų, dozė ir didelė dozė, kuriai esant, pasireiškia toksiniai efektai arba galėtų pakisti toksikokinetiniai parametrai.

Kai duodama pakartotinė dozė, užtenka tik mažos koncentracijos dozės, tačiau ypatingais atvejais reikėtų naudoti ir didelės koncentracijos dozę.

Davimo būdas

Toksikokinetinių tyrimų metu reikėtų naudoti tą patį davimo būdą ir, jei reikia, tą patį prietaisą kuris buvo naudojamas ar buvo pasirinktas naudoti kituose toksikologiniuose tyrimuose. Tiriamoji medžiaga eksperimentiniams gyvūnams paprastai duodama per os su zonu ar pašaru, uždedama ant odos arba duodama įkvėpti konkrečiais laiko momentais. Tiriamosios medžiagos intraveninė injekcija gali būti naudinga siekiant nustatyti santykinę medžiagos, duodamos kitais būdais, absorbciją. Be to, atlikus tiriamosios medžiagos intraveninę injekciją galima gauti naudingos informacijos apie jos pasiskirstymą.

Reikėtų apsvarstyti tą galimybę, kai priemonė gali trukdyti tiriamosios medžiagos davimui. Reikėtų atkreipti dėmesį į absorbcijos skirtumus, kai tiriamosios medžiagos duodamos per zondą ir su pašaru, bei nustatyti tikslią tiriamosios medžiagos, duodamos su pašaru, dozę.

Stebėjimai

Kiekvieną dieną reikėtų stebėti visus gyvūnus bei registruoti toksiškumo požymius ir kitus svarbius klinikinius parametrus, įskaitant efektų pasireiškimo laiką, laipsnį bei trukmę.

Procedūra

Pasvėrus visus tiriamuosius gyvūnus, atitinkamu būdu jiems duodama tiriamoji medžiaga. Jeigu reikia, tiriamieji gyvūnai įtvirtinami prieš duodant medžiagą.

▼B*Absorbcija*

Duodamos medžiagos absorbcijos greitis bei apimtis gali būti įvertinami įvairiais metodais, panaudoj ant arba nenaudoja ant etaloninių grupių ⁽¹⁾, pvz.:

- nustatant tiriamosios medžiagos ir (ar) metabolitų kiekį ekskretuose, tokiuose kaip šlapimas, tulžis, išmatos, iškvėptas oras ir tai, kas yra gyvūno lavone be vidurių,
- lyginant tiriamąją ir kontrolinę arba tiriamąją ir etaloninę grupes pagal biologinį atsaką (pvz., atliekant ūmaus toksiškumo tyrimus),
- lyginant tiriamąją ir etaloninę grupes pagal medžiagos ekskreciją per inkstus,
- nustatant tiriamosios medžiagos ir (ar) metabolitų zoną, esančią žemiau plazmos ir laiko kreivės ir gautus duomenis lyginant su etaloninės grupės tyrimų duomenimis.

Pasiskirstymas

Šiuo metu medžiagos pasiskirstymą galima analizuoti dviem būdais:

- tiriant visą kūną autoradiografijos metodu, gaunama naudingos kokybinės informacijos,
- pasibaigus veikimui tiriamąja medžiaga, skirtingu laiko momentu numarinant gyvūnus bei nustatant tiriamosios medžiagos ir (ar) metabolitų kiekį bei koncentraciją audiniuose ir organuose, gaunama kiekybinės informacijos.

Ekskrecija

Tiriant ekskreciją, surenkamas šlapimas, išmatos, iškvėptas oras ir tam tikrais atvejais, tulžis. Pasibaigus veikimui tiriamąja medžiaga, reikėtų kelis kartus nustatyti tiriamosios medžiagos ir (ar) metabolitų kiekį šiuose ekskretuose tol, kol ekskrecijos būdu pašalinis apie 95 % duotos medžiagos, arba kai praeis savaitė, pasirenkant vieną iš dviejų.

Ypatingais atvejais reikėtų apsvarstyti tiriamos medžiagos ekskreciją į laktacijos tyrime naudojamų gyvūnų pieną.

Metabolizmas

Biologiniai mėginiai turėtų būti tiriami atitinkamais metodais tam, kad būtų nustatyta metabolizmo apimtis bei pobūdis. Reikėtų nustatyti metabolitų struktūrą bei pasiūlyti galimus metabolitinės apykaitos kelius, jei anksčiau atliktų toksikologinių tyrimų metu liko neišspręstų problemų. Tyrimai *in vitro*, padėtų gauti informacijos apie metabolitinės apykaitos kelius.

Detalesnę informaciją apie metabolizmo ir toksiškumo sąsają galima gauti atlikus tokius biocheminius tyrimus, kaip metabolitinių fermentinių sistemų efektų tyrimai, endogeninių nebaltyminės kilmės sulfhidrilinių junginių pašalinimo analizė bei tiriamosios medžiagos susirišimo su makromolekulėmis tyrimas.

⁽¹⁾ Šiame metode: etaloninė grupė – tokia grupė, kurioje tiriamosios medžiagos duodamos kitokiu būdu siekiant užtikrinti dozės biologinį tinkamumą.

▼B**2. DUOMENYS**

Atsižvelgiant į atlikto tyrimo pobūdį, duomenys turėtų būti pateikiami apibendrintai, pasitelkiant lenteles ir, jei reikia, pateikiant papildomai ir paveikslus. Kiekvienos tirtos grupės atveju reikėtų nurodyti, jei to reikalaujama, laiko, dozės bei medžiagos pasiskirstymo audiniuose bei organuose matavimų vidurkius ir statistines variacijas. Absorbcijos laipsnis bei ekskrecijos apimtis ir greičiai turėtų būti nustatyti atitinkamais metodais. Kai atliekami metabolizmo tyrimai, reikėtų pateikti identifikuotų metabolitų struktūrą bei galimus metabolinės apykaitos kelius.

3. ATASKAITA**3.1. TYRIMO ATASKAITA**

Atsižvelgiant į atlikto tyrimo pobūdį, tyrimo ataskaitoje, jei įmanoma, turėtų būti pateikiama tokia informacija:

- panaudota rūšis, kamienas, šaltinis, aplinkos sąlygos,
- žymėtų medžiagų, jei šios buvo naudojamos, apibūdinimas,
- dozių dydžiai ir kaip dažnai jos buvo duodamos,
- davimo būdas ir bet kokie prietaisai, jei buvo naudoti,
- užregistruoti toksiniai ir kiti efektai,
- tiriamosios medžiagos ir (ar) metabolitų biologiniuose mėginiuose, įskaitant iškvėptą orą, nustatymo metodai,
- lyties, dozės, režimo, laiko, audinių bei organų atžvilgiu atliktų matavimų išdėstymas paeiliui,
- ekskrecijos ir absorbcijos apimtys laiko ribose pateikimas,
- metabolitų identifikacijos biologiniuose mėginiuose bei apibūdinimo metodai,
- biocheminiai metabolizmo įvertinimo metodai,
- galimi metabolinės apykaitos keliai,
- rezultatų aptarimas,
- rezultatų interpretavimas.

3.2. ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. NUORODOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

▼B**B.37. FOSFOROORGANINIŲ MEDŽIAGŲ ŪMAUS POVEIKIO SUKELTAS UŽDELSTAS NEUROTOKSIŠKUMAS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Vertinant toksinius medžiagų poveikius reikia žinoti, kad kai kurios medžiagų klasės sukelia specifinius neurotoksiškumo tipus, nenustatomus įprastais toksiškumo tyrimais. Pavyzdžiui, kai kurios fosforoorganinės medžiagos sukelia uždelstą neurotoksiškumą ir vertinant šios grupės medžiagas į tai reikėtų atsižvelgti.

Nustatant medžiagas, sukeliančias uždelstą polineuropatiją, gali būti taikomi atrankos tyrimai *in vitro*, tačiau neigiami tyrimo *in vitro* duomenys dar neįrodo, kad duotoji medžiaga yra ne neurotoksiška.

Žiūrėti Bendrojo įvado B dalį.

1.2. SĄVOKOS

Fosforoorganinės medžiagos reiškia fosforoorganinius esterius, tioesterius ar fosforoorganinius anhidridus, fosfonoorganines ar fosforamidoorganines rūgštis ar giminingas fosforotiono, fosforonotiono ar fosforotioamido rūgštis, ar kitas medžiagas, kurios gali sukelti uždelstą neurotoksiškumą, 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. KONTROLINĖS MEDŽIAGOS

Norint parodyti, jog laboratorinėmis sąlygomis tiriamųjų rūšių atsakas reikšmingai nesikeičia, pozityvinė kontrolės grupė gali gauti kontrolinę medžiagą.

Plačiai naudojamas neurotoksikantas yra tri-o-tolilfosfatas (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, CAS nomenklatura: fosforo rūgštis, tris(2-metilfenil)esteris), taip pat žinomas kaip tris-o-krezilfosfatas.

1.4. TIRIAMOJO METODO PRINCIPAS

Naminėms vištoms, kurios, jeigu reikia, yra apsaugotos nuo ūmaus cholinerginio poveikio, per virškinamąjį traktą duodama tiriamosios medžiagos vienkartinė dozė. 21 dieną stebimi gyvūnų elgesio nukrypimai, ataksija ir paralyžius. Paprastai praėjus 24 ir 48 valandoms po dozavimo, atsitiktiniu atrankos būdu paimtoms iš kiekvienos grupės vištoms atliekami biocheminiai tyrimai, t. y. nustatomas neuropatijos sukeltas esterazės slopinimas. Praėjus 21 dienai po medžiagos poveikio, likusios vištos nužudomos ir tam tikri nervų audiniai ištiriami histopatologiškai.

▼B

1.5. TIRIAMOJO METODO APRAŠYMAS

1.5.1. **Pasiruošimas**

Sveikos jaunos suaugusios vištos, nesirgusios virusinėmis ligomis ir negydytos, neturinčios eisenos pakitimų, atsitiktinės atrankos principu paskirstomos į tiriamąją ir kontrolinę grupes ir mažiausiai 5 dienas prieš tyrimą aklimatizuojamos laboratorijos sąlygomis.

Reikia naudoti pakankamai didelius narvus arba aptvarus, kurie leistų vištoms laisvai judėti bei laisvai stebėti jų eisena.

Tiriamoji medžiaga turėtų būti dozuojama per virškinamąjį traktą, naudojant zondą, želatinines kapsules arba panašiu metodu. Skysčiai gali būti leidžiami neskiesti arba ištirpinti tirpiklyje, tokiame, kaip kukurūzų aliejus; kadangi didelės dozės kietųjų medžiagų želatininėse kapsulėse gali būti neefektyviai absorbuojamos, jas reikėtų ištirpinti. Naudojamo tirpiklio (ne vandens) toksinės savybės turi būti žinomos, o jeigu nežinomos, tai prieš tyrimą jos turi būti nustatytos.

1.5.2. **Tyrimo sąlygos**1.5.2.1. *Tiriamieji gyvūnai*

Rekomenduojamos nuo 8 iki 12 mėnesių amžiaus jaunos suaugusios naminės vištos (*Gallus gallus domesticus*), dedančios kiaušinius. Turėtų būti naudojamos standartinio dydžio veislės ir linijos vištos, užaugintos sąlygomis, leidžiančiomis laisvai judėti.

1.5.2.2. *Skaičius ir lytis*

Be tiriamosios grupės turi būti dar tirpiklio kontrolinė bei pozityvinės kontrolės grupės. Su tirpiklio kontrolinės grupės gyvūnais reikia elgtis lygiai taip pat kaip ir su tiriamaisiais gyvūnais, išskyrus tai, kad jie negautų tiriamosios medžiagos.

Kiekvienoje paukščių grupėje reikia panaudoti tokį skaičių vištų, kad mažiausiai šešias galima būtų nužudyti biocheminiams tyrimams (po tris, praėjus dviem skirtingiems laiko tarpams) ir kad po 21 stebėjimo dienos patologiniams tyrimams išgyventų dar šešios vištos.

Pozityvinės kontrolės grupė gali būti tiriama paraleliai su kitomis grupėmis arba gali būti panaudojama nesena istorinė kontrolės grupė. Šioje grupėje turi būti mažiausiai šešios vištos, paveiktos žinomais uždelsto veikimo neurotoksikantais, trys vištos yra skirtos biochemijai ir trys patologijai. Rekomenduojama periodiškai atnaujinti istorinius duomenis. Kai tyrimo laboratorija pakeičia keletą esminių tyrimo elementų (pvz., vištų liniją, pašarus, laikymo sąlygas), turi būti gauti nauji pozityvinės kontrolės duomenys.

▼B1.5.2.3. *Dozių lygiai*

Pagrindiniame tyrime naudotinų dozių lygių nustatymui reikalingas preliminarinis tyrimas su atitinkamu vištų ir dozių grupių skaičiumi. Nustatant pagrindinio tyrimo dozės ribas, preliminariniame tyrime yra būtinos kelių paukščių žūtys. Norint užkirsti kelią dėl ūmaus cholinerginio poveikio kylančioms mirtims, galima naudoti atropiną ar kitą apsauginę medžiagą, kuri netrukdytų uždelsto neurotoksiškumo atsakams. Apskaičiuojant maksimalią nemirtiną tiriamosios medžiagos dozę, galima panaudoti daugybę tiriamųjų metodų (žiūrėkite metodą B. 1 bis). Parenkant dozę, gali būti naudingi jau turimi vištų duomenys arba bet kokia kita toksikologinė informacija.

Atsižvelgiant į preliminarinio tyrimo rezultatus ir aukščiausią ribinę 2 000 mg/kg kūno masės dozę, tiriamosios medžiagos dozės lygis pagrindiniame tyrime turi būti kuo aukštesnis. Bet kokia žūtis per 21 dieną turi nepakeisti reikalingo išgyvenusių paukščių skaičiaus – šešių biocheminiams ir šešių histologiniams tyrimams. Užkertant kelią dėl ūmaus cholinerginio poveikio kylančioms žūtims, galima naudoti atropiną arba bet kurią kitą apsauginę medžiagą, netrukdančią 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 nesitikima toksiškumo, didesnių dozių tyrimai nebūtini. Ribinis bandymas neatliekamas tais atvejais, kai nustatant poveikį žmogui, reikia naudoti didesnes dozes.

1.5.2.5. **Stebėjimo periodas**

Stebėjimo periodas turėtų trukti 21 dieną.

1.5.3. **Procedūra**

Po to, kai paukštis gauna apsauginę medžiagą, kuri užkerta kelią nuo dėl ūmaus cholinerginio poveikio galimai žūčiai, duodama tiriamosios medžiagos vienkartinė dozė.

1.5.3.1. Bendrasis stebėjimas

Stebėjimai prasideda tuoj pat po medžiagos gavimo. Pirmas dvi dienas visos vištos atidžiai stebimos kelis kartus, o vėliau mažiausiai vieną kartą dienoje, kol jos nužudomos arba praeina 21 diena. Visi toksiškumo požymiai turi būti registruojami, žymint jų pradžią, tipą, ryškumą ir elgesio nukrypimų trukmę. Ataksiją reikėtų vertinti mažiausiai pagal keturių lygių skalę, reikėtų žymėti 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. Dvesiantys ir patiriantys dideles kančias bei skausmą paukščiai išimami iš narvų, pažymimi, humaniškai nužudomi ir skrodžiami.

▼B

1.5.3.2. Kūno masė

Prieš tiriamosios medžiagos davimą visas vištas reikia pasverti, vėliau sveriami mažiausiai vieną kartą per savaitę.

1.5.3.3. Biochemija

Atsitiktinės atrankos būdu šešios vištos iš kiekvienos tiriamosios ir tirpiklio kontrolinių grupių bei trys vištos iš pozityvinės kontrolinės grupės (jei ši grupė paraleliai tirama) praėjus kelioms dienoms po dozavimo nužudomos, išimamos galvos smegenys ir juosmens dalies nugaros smegenys bei ištiriamas neuropatijos sukeltas esterazės slopinimo aktyvumas. Kartais naudinga ištirti sėdimąjo nervo audinio neuropatijos sukeltą esterazės slopinimo aktyvumą. Paprastai, praėjus 24 valandoms, nužudomi trys kontrolinės ir trys tiriamosios grupės paukščiai, o praėjus 48 valandoms, dar po tris, tuo tarpu trys pozityvinės kontrolės vištos nužudomos po 24 valandų. Jeigu klinikiniai intoksikacijos požymiai (tai visada gali būti nustatyta stebint cholinerginių požymių pradžios laiką) rodo, kad toksinė medžiaga perduodama labai lėtai, tada geriau paukščių audinių pavyzdžius imti du kartus tarp 24 ir 72 valandų po dozavimo.

Taip pat galima tirti acetilcholinesterazę (AChE). Tačiau gali įvykti spontaninė AChE reaktyvacija in vivo, o tai gali sąlygoti nepakanamą medžiagos, kaip AChE inhibitoriaus, įėgos įvertinimą.

1.5.3.4. Bendrasis skrodimas

Visų gyvūnų bendrojo skrodimo metu reikia apžiūrėti galvos bei nugaros smegenų išvaizdą.

1.5.3.5. Histopatologinis ištyrimas

Išgyvenusių visų stebėjimo periodą ir nepanaudotų biocheminiams tyrimams paukščių nervų audiniai turi būti mikroskopiškai ištirti. Audiniai turi būti fiksuojami in situ, naudojant perfuzijos techniką. Reikia ištraukti smegenėlių (vidurinįjį-pailgąjį lygį), pailgųjų smegenų, nugaros smegenų ir periferinių nervų dalis. Reikia paimti nugaros smegenų atkarpas iš viršutinio kaklinio segmento, vidurinės-krūtininės ir juosmens-kryžmens dalių. Reikia paimti blauzdikaulio nervo distalines ir jo atšakų į skrandžio raumenį bei sėdimąjo nervo atkarpas. Šias atkarpas reikia dažyti būdingais mielinui ir specifiniais aksonui dažais.

2. **DUOMENYS**

Pasirinktų metodų (biochemijos, histopatologijos ir elgesio stebėjimo) požiūriu gauti neigiami rezultatai paprastai nereikalauja uždelsto neurotoksiškumo tyrimo 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 tirtose grupėje tyrimo pradžioje buvusių paukščių skaičių, paukščių skaičių su pažeidimais, elgesio ar biocheminiais pakitimais, šių pažeidimų ar pakitimų tipus ir jų sunkumo laipsnį bei paukščių procentą su kiekvieno pažeidimo ar pakitimo tipu ir sunkumo laipsniu.

▼B

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 tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse.

Skaitmeniniai rezultatai turėtų būti apdoroti tinkamais ir priimtinais statistiniais metodais. Statistiniai metodai turėtų būti pasirinkti planuojant tyrimą.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

TYRIMO ATASKAITA

Tyrimo ataskaitoje turėtų būti ši informacija:

Tiriamieji gyvūnai:

- panaudotos linijos,
- gyvūnų skaičius ir amžius,
- gavimo šaltinis, laikymo sąlygos ir kt.,
- kiekvieno gyvūno kūno masė tyrimo pradžioje.

Tyrimo sąlygos:

- detalės apie tiriamosios medžiagos paruošimą, pastovumą ir homogeniškumą, kur to reikalaujama,
- tirpiklio pasirinkimo pagrindimas,
- detalės apie poveikį tiriamąja medžiaga,
- detalės apie pašarų ir vandens kokybę,
- dozės pasirinkimo pagrindimas,
- duotų dozių detalizavimas, tame tarpe naudotas tirpiklis, jo tūris ir duotos medžiagos fizikinė forma,
- detalės apie naudotas apsaugines medžiagas ir poveikį jomis.

Rezultatai:

- kūno masės duomenys,
- grupės toksinio atsako duomenys, taip pat ir žuvimai,
- stebėti klinikiniai pokyčiai, sunkumo laipsnis ir trukmė (kurie grįžtami, kurie ne),
- smulkus biocheminių metodų ir gautų duomenų aprašymas,
- skrodimo duomenys,
- smulkus visų gautų histopatologinių duomenų aprašymas,
- statistinis rezultatų apdorojimas ten, kur tinka.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

4. **LITERATŪRA**

Šis metodas yra analogiškas EBPO 418 tyrimo gairėms.

▼ B**B.38. FOSFOROORGANINIŲ MEDŽIAGŲ 28 DIENŲ
PAKARTOTINOS DOZĖS SUKELTO UŽDELSTO
NEUROTOKSIŠKUMO TYRIMAS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Vertinant toksinius medžiagų poveikius reikia žinoti, kad kai kurios medžiagų grupės sukelia specifinius neurotoksiškumo tipus, nenustatomus įprastais toksiškumo tyrimais. Pavyzdžiui, kai kurios fosforoorganinės medžiagos sukelia uždelstą neurotoksiškumą ir vertinant šios grupės medžiagas į tai reikėtų atsižvelgti.

Nustatant medžiagas, sukeliančias uždelstą polineuropatiją, gali būti taikomi atrankos tyrimai *in vitro*, tačiau neigiami tyrimo *in vitro* duomenys dar neįrodo, kad duotoji medžiaga yra ne neurotoksiška.

Šis 28 dienų uždelsto neurotoksiškumo tyrimas rodo kylančią riziką sveikatai, gaunant medžiagą pakartotinai per tam tikrą laiko tarpą. Šis tyrimas rodys reakciją į dozę bei įvertins nepastebimą neigiamą poveikio lygį, reikalingą nustatant medžiagos saugumo kriterijus.

Žiūrėti Bendrojo įvado B dalį.

1.2. SĄVOKOS

Fosforoorganinės medžiagos reiškia fosforoorganinius esterius, tioesterius ar fosforoorganinius anhidridus, fosfonoorganines ar fosforamidoorganines rūgštis ar giminingas fosforotiono, fosforonotiono ar fosforotioamidino rūgštis, ar kitas medžiagas, kurios gali sukelti uždelstą neurotoksiškumą, 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. TIRIAMOJO METODO PRINCIPAS

Naminėms vištoms per virškinamąjį traktą 28 dienas kasdien duodama tiriamoji medžiaga. Medžiagos davimo periodu ir praėjus 14 dienų po to rečiausiai vieną kartą dienoje stebimi gyvūnų elgesio nukrypimai, ataksija ir paralyžius. Paprastai praėjus 24 ir 48 valandoms po paskutinio dozavimo, atsitiktiniu atrankos būdu paimtoms iš kiekvienos grupės vištoms atliekami biocheminiai tyrimai, t. y. nustatomas neuropatijos sukeltas esterazės slopinimas. Praėjus dviem savaitėms po paskutinės dozės, likusios vištos nužudomos ir tam tikri nervų audiniai ištiriami histopatologiškai.

▼B

1.4. TIRIAMOJO METODO APRAŠYMAS

1.4.1. **Pasiruošimas**

Sveikos jaunos suaugusios vištos, nesirgusios virusinėmis ligomis ir negydytos, neturinčios eisenos pakitimų, atsitiktinės atrankos principu paskirstomos į tiriamąsias ir kontrolinę grupes ir mažiausiai 5 dienas prieš tyrimą aklimatizuojamos laboratorijos sąlygomis.

Turi būti naudojami pakankamai dideli narvai arba aptvarai, kurie leistų vištoms laisvai judėti bei laisvai stebėti jų eisena.

Tiriamoji medžiaga kasdien septynias dienas per savaitę dozuojama per virškinamąjį traktą, naudojant zondą arba želatinines kapsules. Skysčiai gali būti leidžiami neskiesti arba ištirpinti tirpiklyje, tokiame kaip kukurūzų aliejus; kadangi didelės dozės kietųjų medžiagų želatininėse kapsulėse gali būti neefektyviai absorbuojamos, jas reikėtų ištirpinti. Naudojamo tirpiklio (ne vandens) toksinės savybės turi būti žinomos, o jeigu nežinomos, tai prieš tyrimą jos turi būti nustatytos.

1.4.2. **Tyrimo sąlygos**1.4.2.1. *Tiriamieji gyvūnai*

Rekomenduojamos nuo 8 iki 12 mėnesių amžiaus jaunos suaugusios naminės vištos (*Gailus gailus domesticus*), dedančios kiaušinius. Turėtų būti naudojamos standartinio dydžio veislės ir linijos vištos, užaugintos sąlygomis, leidžiančiomis laisvai judėti.

1.4.2.2. *Skaičius ir lytis*

Reikia sudaryti mažiausiai tris tiriamąsias grupes bei vieną tirpiklio kontrolinę grupę. Su tirpiklio kontrolinės grupės gyvūnais reikia elgtis lygiai taip pat kaip ir su tiriamaisiais gyvūnais, išskyrus tai, kad jie negautų tiriamosios medžiagos.

Kiekvienoje paukščių grupėje reikia panaudoti tokį skaičių vištų, kad mažiausiai šešias galima būtų nužudyti biocheminiams tyrimams (po tris, praėjus dviem skirtingiems laiko tarpams) ir, kad praėjus 14 dienų po paskutinio dozavimo patologiniams tyrimams išgyventų dar šešios vištos.

1.4.2.3. *Dozių lygiai*

Dozės lygius reikia parinkti atsižvelgiant į uždelsto neurotoksiškumo ūmaus tyrimo tris rezultatus arba į jau turimus tiriamosios medžiagos toksiškumo ar kinetinius duomenis. Pasirinktas aukščiausias dozės lygis turi sukelti toksinius poveikius, geriausiai uždelstą neurotoksiškumą, tačiau turi nesukelti gyvūno žūties ar nepakeliamų kančių. Sekantys mažėjančia tvarka einantys dozių lygiai turi sukelti atitinkamai mažesnius pokyčius (atsakus), o mažiausias dozės lygis turėtų nesukelti pastebimų neigiamų poveikių.

▼ **B**1.4.2.4. *Ribinis bandymas*

Jeigu tirtas dozės lygis, ne žemesnis, negu 1 000 mg/kg kūno masės/d nesukelia pastebimų toksinių poveikių ir jeigu iš turimų duomenų apie struktūriškai panašias medžiagas nesitikima toksiškumo, didesnių dozių tyrimai nebūtini. Ribinis bandymas neatliekamas tais atvejais, kai nustatant poveikį žmogui, reikia naudoti didesnes dozes.

1.4.2.5. *Stebėjimo periodas*

Visi paukščiai stebimi mažiausiai vieną kartą per dieną visą medžiagos dozavimo periodą ir 14 dienų po to, iki atliekamas skrodimas.

1.4.3. **Procedūra**

Paukščiams tiriamoji medžiaga duodama 28 dienas kasdien septynias dienas per savaitę.

1.4.3.1. *Bendrasis stebėjimas*

Stebėjimai prasideda tuoj pat po medžiagos gavimo. 28 dozavimo dienas ir 14 dienų po to visos vištos atidžiai stebimos mažiausiai vieną kartą per dieną, po to jos nužudomos. Visi toksiškumo požymiai turi būti registruojami, žymint jų pradžią, tipą, sunkumo laipsnį ir elgesio nukrypimų trukmę. Nereikėtų apsiriboti elgesio nukrypimų stebėjimais. Ataksiją reikėtų vertinti mažiausiai pagal keturių lygių skalę, 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. Dvesiantys ir patiriantys dideles kančias bei skausmą paukščiai išimami iš narvų, pažymimi, humaniškai nužudomi ir skrodžiami.

1.4.3.2. *Kūno masė*

Prieš pirmąją tiriamosios medžiagos davimą visas vištas reikia pasverti, vėliau mažiausiai vieną kartą per savaitę.

1.4.3.3. *Biochemija*

Atsitiktinės atrankos būdu šešios vištos iš kiekvienos tiriamosios ir tirpiklio kontrolinių grupių, praėjus kelioms dienoms po paskutinės dozės, nužudomos, išimamos galvos smegenys ir juosmens dalies nugaros smegenys bei ištiriamas neuropatijos sukeltas esterazės slopinimo aktyvumas. Kartais naudinga ištirti sėdimąjo nervo audinio neuropatijos sukeltą esterazės slopinimo aktyvumą. Paprastai, praėjus 24 valandoms po paskutinės dozės, nužudomi trys kontrolinės ir trys kiekvienos tiriamosios grupės paukščiai, o praėjus 48 valandoms, dar po tris. Jeigu ūmaus arba kitų tyrimų (pvz. toksikokinetinių) duomenys rodo, kad po paskutinės dozės geriau pasirinkti kitą žudymo laiką, negu siūloma, tai reikia raštiškai pagrįsti.

Taip pat galima tirti acetilcholinesterazę (AChE). Tačiau gali įvykti spontaninė AChE reaktyvacija *in vivo*, o tai gali sąlygoti nepakanamą medžiagos, kaip AChE inhibitoriaus, įvertinimą.

▼B1.4.3.4. *Bendrasis skrodimas*

Bendrojo skrodimo 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 techniką. Reikia ištraukti smegenėlių (vidurinįjį-pailgąjį lygį), pailgųjų smegenų, nugaros smegenų ir periferinių nervų dalis. Reikia paimti nugaros smegenų atkarpas iš viršutinio kaklinio segmento, vidurinės-krūtininės ir juosmens-kryžmens dalių. Reikia paimti blauzdikaulio nervo distalines ir jo atšakų į skrandžio raumenį bei sėdimąjo nervo atkarpas. Šias atkarpas reikia dažyti būdingais mielinui ir specifiniais aksonui dažais. Pradžioje reikia mikroskopiškai ištirti visų kontrolinės ir didžiausios dozės grupių paukščių fiksuotus audinius. Jeigu didžiausios dozės grupėje nustatomi pakitimai, galima mikroskopiškai tirti vidurinėsios ir mažiausios dozės grupių paukščių audinius.

2. **DUOMENYS**

Pasirinktų metodų (biochemijos, histopatologijos ir elgesio stebėjimo) požiūriu gauti neigiami rezultatai paprastai nereikalauja uždelsto neurotoksiškumo tyrimo 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 tirtose grupėse tyrimo pradžioje buvusių paukščių skaičių, paukščių skaičių su pažeidimais, elgesio ar biocheminiais pakitimais, 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 tiriamosiose ir kontrolinėje grupėse.

Skaitmeniniai rezultatai turėtų būti apdoroti tinkamais ir priimtinais statistiniais metodais. Statistiniai metodai turėtų būti pasirinkti planuojant tyrimą.

3. **ATASKAITOS PATEIKIMAS**

TYRIMO ATASKAITA

Tyrimo ataskaitoje turėtų būti ši informacija:

Tiriamieji gyvūnai:

— panaudotos linijos,

— gyvūnų skaičius ir amžius,

— gavimo šaltinis, laikymo sąlygos ir kt.,

— kiekvieno gyvūno kūno masė tyrimo pradžioje.

▼B

Tyrimo sąlygos:

- detalės apie tiriamosios medžiagos paruošimą, pastovumą ir homogeniškumą, kur to reikalaujama,
- tirpiklio pasirinkimo pagrindimas,
- detalės apie poveikį tiriamąja medžiaga,
- detalės apie pašarų ir vandens kokybę,
- dozės pasirinkimo pagrindimas,
- duotų dozių detalizavimas, taip pat ir naudotas tirpiklis, jo turis ir duotos medžiagos fizikinė forma,
- pagrindimas, pasirinkus biocheminiams tyrimams kitą laiką (ne po 24 ir 48 valandų).

Rezultatai:

- kūno masės duomenys,
- duomenys apie toksinį atsaką pagal dozės lygį, taip pat ir žuvimai,
- nepastebimas neigiamas poveikio lygis,
- stebėti klinikiniai pokyčiai, sunkumo laipsnis ir trukmė (kurie grįžtami, kurie ne),
- smulkus biocheminių metodų ir gautų duomenų aprašymas,
- skrodimo duomenys,
- smulkus visų gautų histopatologinių duomenų aprašymas,
- statistinis rezultatų apdorojimas ten, kur tinka.

Rezultatų aptarimas.

Išvados.

4. **LITERATŪRA**

Šis metodas yra analogiškas EBPO 419 tyrimo gairėms.

▼ B**B.39. NENUMATYTOS DNR SINTEZĖS (NDS) TYRIMAS
ŽINDUOLIŲ KEPENŲ LĄSTELĖSE *IN VIVO*****1. METODAS**

Šis metodas pakartoja OECD TG 486 Nenumatytos DNR sintezės (NDS) tyrimą žinduolių kepenų ląstelėse *in vivo* (1997).

1.1 ĮVADAS

Nenumatytos DNR sintezės (NDS) tyrimo žinduolių kepenų ląstelėse *in vivo* tikslas -identifikuoti medžiagas, kurios vykdo DNR pažeidimų reparaciją žinduolių, paveiktų tiriamąja medžiaga, kepenų ląstelėse 1, 2, 3, 4.

Šio tyrimo metu galima ištirti kepenyse esančių cheminių medžiagų sukeltus genotoksinius efektus. Galutinis nustatytas dydis parodo, kad iš pradžių kepenų ląstelėse atsiranda DNR pažeidimai, o vėliau vyksta DNR pažeidimų reparacija. Apskritai, absorbuotų junginių metabolizmo pagrindinė vieta yra kepenys. Todėl kepenys yra tinkamas DNR pažeidimų tyrimo *in vivo* objektas.

Jeigu nustatoma, kad tiriamoji medžiaga nepasiekia audinio, į kurį buvo nukreipta, tai ji laikoma netinkama šiam tyrimui.

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) tyrimus *in vitro*, daugiausiai naudojamos žiurkių kepenys. Galima naudoti ir kitus audinius, tačiau jie nėra šio tyrimo objektas.

Nenumatytos DNR sintezės (NDS) nustatymas priklauso nuo pažeidimo vietoje iškirptų DNR bazių, pakeistų kitomis, skaičiaus. Todėl nenumatytos DNR sintezės tyrimas ypač vertingas tada, kai siekiama identifikuoti „ilgų fragmentų pažeidimų“ (fragmentų ilgis siekia nuo 20 iki 30 bazių), sukeltų, paveikus tiriamąja medžiaga, reparacijas. Tuo tarpu „trumpų fragmentų pažeidimų“ nustatomos, esant žymiai mažesniai jautrumui. Be to, mutageniniai įvykiai pasireiškia dėl nevykstančios pažeidimų reparacijos, klaidingai vykstančios reparacijos ar klaidingos DNR replikacijos. Nenumatytos DNR sintezės aktyvumas neparodo pažeidimų reparacijos efektyvumo. Visai įmanoma, kad mutagenas sąveikauja su DNR, tačiau pažeidimų reparacija iškirpos atstatymo būdu nevyksta. Nenumatytos DNR sintezės tyrimo metu negaunant specifinės informacijos apie mutageninį aktyvumą, šį trūkumą kompensuoja didelis matavimo jautrumas, nes tiriamas visas genomas.

Taip pat žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2 SĄVOKOS

Ląstelės, kuriose vyksta reparacija – atliekant šį tyrimą laboratorijoje, patvirtinama, kad branduolinio tinklo granulių (BTG) išraiška didesnė negu nustatytoji vertė.

Branduolinio tinklo granulės (BTG) – kiekybinis nenumatytos DNR sintezės aktyvumo ląstelėse, atliekant nenumatytos DNR sintezės tyrimą autoradiografijos metodu, įvertinimo matas, išreiškiamas iš branduolinio tinklo granulių (BG) skaičiaus atimant vidutinį citoplazminių granulių, esančių nukleoplazminiuose ploteliuose, skaičių (CG): BTG = BG -CG. BGT nustatomas kiekvienoje ląstelėje ir tada apskaičiuojama kultūroje ar paraleliose kultūrose esančių ląstelių BTG bendra vertė.

▼ **B**

Nenumatyta DNR sintezė (NDS) – DNR reparacinė sintezė, vykstanti po cheminėmis medžiagomis ar fiziniais agentais sukeltos DNR pažaidos apimto regiono iškirpimo bei pašalinimo.

1.3 TYRIMO 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 agentais sukeltos DNR pažaidos apimtas regionas iškerpamas ir pašalinamas. Šis tyrimas bendru atveju yra pagrįstas ^3H žymėto timidino įterpimu į kepenų ląstelių, kurios sudaro labai nedidelę ląstelių, esančių ląstelinio ciklo S fazėje, dalį, DNR. ^3H 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 TYRIMO METODO APIBŪDINIMAS

1.4.1 **Preparatai**1.4.1.1 *Gyvūnų rūšies pasirinkimas*

Dažniausiai yra naudojamos žiurkės, tačiau gali būti panaudotos ir kitos atitinkamos žinduolių rūšys. Reikia panaudoti dažniausiai vartojamus jaunų sveikų suaugusių gyvūnų laboratorinius kamienus. Tyrimo pradžioje gyvūnų svorio variacijos turi būti minimalios ir neviršyti $\pm 20\%$ 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 tiriamąją grupes. Narvai išdėstomi taip, kad būtų iki minimumo sumažinti aplinkos efektai, susiję su narvų laikymu. Kiekvienas gyvūnas turi savo identifikacijos ženklą. Prieš pradėdant tyrimą, gyvūnams leidžiama aklimatizuotis prie laboratorinių sąlygų mažiausiai 5 dienas.

1.4.1.4 *Dozių paruošimas*

Kietosios tiriamosios cheminės medžiagos ištirpinamos arba suspenduojamos atitinkamuose tirpikliuose ar tirpinamuosiuose įrenginiuose ir jei reikia, tai, prieš paruošiant jų dozes, skirtas gyvūnams, jos praskiedžiamos. Skystųjų tiriamųjų medžiagų dozės ruošiamos iškart arba prieš dozių paruošimą, jos praskiedžiamos. Prieš kiekvieną bandymą šviežiai paruošiami tiriamosios cheminės preparatai ir neatšizvelgiama į stabilumo tyrimo metu gautus duomenis, rodančius, kad medžiaga atitinka jos laikymui keliamus reikalavimus.

1.4.2 **Tyrimo sąlygos**1.4.2.1 *Tirpiklis/tirpinantysis įrenginys*

Tirpiklis ar tirpinantysis prietaisas neturėtų sukelti jokio toksinio efekto, atitinkančio vartojamas dozes ir neturėtų kilti spėlionių, kad jis gali chemiškai reaguoti su tiriamąja medžiaga. Jeigu naudojami kiti, skirtingai nei žinomi, tirpikliai/tirpinantieji įrenginiai, tai prieš pradėdant juos vartoti, reikia pateikti jų tinkamumą įrodančius duomenis. Jei yra įmanoma, tai pirmiausia rekomenduojama naudoti skystosios fazės tirpiklį arba tirpinantįjį įrenginį.

▼ B

1.4.2.2 *Kontroliniai mėginiai*

Atliekant kiekvieną nepriklausomą eksperimento dalį, vienu metu turi būti naudojami teigiami ir neigiami (tirpiklis/tirpinantysis įrengimas) kontroliniai mėginiai.. Išskyrus tą atvejį, kai gyvūnai veikiami tiriamąja chemine medžiaga, kontrolinės grupės gyvūnai turi būti laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip ir gyvūnai, paveikti tiriamąja chemine medžiaga (tiriamoji grupė).

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 vartojamos vidutinį atsaką sukeliančios dozės, tai reikia naudoti teigiamus kontrolinius mėginius, kuriems yra būtina metabolinė aktyvacija 4. Dozės turi būti taip parenkamos kad gaunami efektai būtų aiškūs, bet tyrėjas negalėtų iškart dešifruoti užkoduotų skaidrių. 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 tiriamoji 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 tiriamieji gyvūnai. Jei sukaupiama anksčiau atliktų bandymų duomenų bazė, tai vienu metu naudojamose teigiamose ir neigiamose kontrolinėse grupėse turi būti po 1 ar 2 gyvūnus.

Jei tyrimo metu galima gauti anksčiau atliktų tyrimų, panaudojant tą pačią gyvūnų rūšį ir tą patį poveikio tiriamąja medžiaga būdą, duomenis, kurie rodo, toksiškumo tarp atskirų lyčių skirtumai yra labai nedideli, tai tada užteks ištirti vienos lyties, pirmiausia patinus, gyvūnus. Jeigu žmogaus jautrumas cheminėms medžiagoms, kuriomis jis veikiamas, priklauso nuo lyties, kaip antai jautrumo kai kurioms farmakologiškai aktyvioms medžiagoms atveju, tai reikia ištirti atitinkamą gyvūnų rūšį.

1.5.2 **Veikimo tvarkaraštis**

Bendru atveju tiriamosios medžiagos duodamos tik vieną kartą.

1.5.3 **Dozės dydžiai**

Paprastai naudojami 2 dozės dydžiai. Didžiausia doze laikoma dozė, kuri sukelia toksiškumo požymius taip, kad didesniosios dozės, duodamos tokiu pačiu būdu, bus mirtinos. Apskritai, žemesnioji dozė turi sudaryti nuo 25 % iki 50 % didesniosios dozės.

▼ **B**

Medžiagos, pasižyminčios specifiniu biologiniu aktyvumu, kai jų dozės būna žemos ir netoksinės (pavyzdžiui tokios kaip hormonai ir mitogenai) gali būti laikomos išimtimi, kai joms taikomi dozė 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 kamieno, lyties gyvūnus bei tą patį veikimo būdą kaip ir pagrindinio tyrimo metu.

Didžiausia dozė gali taipogi būti apibrėžiama kaip dozė, kurią davus, kepenyse pasireiškia kai kurie toksiškumo požymiai (pavyzdžiui, piknotiniai branduoliai).

1.5.4 Ribų paieškos tyrimas

Jeigu tyrimas atliekamas, esant vienam doziniam lygmeniui, kuris, per vieną dieną atliekant pavienį arba du poveikius tiriamąją medžiaga, mažiausiai sudaro 2 000 mg/kūno/kg ir jei nepastebima jokių toksinių efektų bei, remiantis struktūriškai panašių cheminių medžiagų tyrimų duomenimis, nebus tikimasi užregistruoti genotoksiškumo, tai tada laikomasi nuostatos, kad yra tikslinga atlikti pilną tyrimą, panaudojant 3 dozinius lygmenis. Prognozuojamas tiriamosios medžiagos poveikis žmogui gali parodyti, kad, atliekant ribų paieškos tyrimą reikia naudoti aukštesnį dozinį lygmenį.

1.5.5 Dozių davimas

Tiriamoji medžiaga yra paprastai duodama, priverstinai maitinant per vamzdelį, įstatant jį į skrandį, tinkamai įvedant kanulę per vamzdelį arba injekciją į pilvą. Tiriamąją medžiagą galima įvesti ir kitais būdais, jei jie yra pagrindžiami. Tačiau įvedimas į pilvo ertmę nerekomenduojamas, nes tiriamoji medžiaga gali tiesiogiai paveikti kepenis per cirkuliacinę sistemą. Maksimalus skysčio, priverstinai duodamo per vamzdelį arba injekuojamo į pilvą vienu metu, tūris priklauso nuo tiriamojo gyvūno dydžio. Tūris neturi viršyti 2 ml/100 mg kūno masės. Didesnių nei šitų tūrių davimas turi būti pagrindžiamas. Išskyrus sujaudrinančias ar irimą sukeliančias medžiagas, kurios, būdamos didesnėmis koncentracijomis, sukelia žalingus efektus, tiriamosios medžiagos tūrio kitimas turi būti sumažinamas iki minimumo, koncentraciją taip sureguliuojant, kad esant visiems doziniam lygmenims, tūris būtų pastovus.

1.5.6 Kepenų ląstelių paruošimas

Kepenų ląstelės yra paruošiamos, paimant jas iš gyvūnų, paveiktų tiriamąją medžiaga, po dozės davimo praėjus 12–16 valandų. Apskritai, anksčiau atliekamas papildomas mėginio paėmimas (įprastiniu atveju – po veikimo praėjus 2–4 valandoms) yra būtinas, nebent 12–16 valandų laikotarpiu buvo gautas aiškus teigiamas atsakas. Tačiau mėginius paimti galima ir kitu metu, kuris pagrindžiamas, remiantis toksikokinetinių tyrimų 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 sudrėkinamos, fiksuojamos bei džiovinamos. Jei inkubacija užtrunka ilgiau, tai nežymėto timidino perteklius terpėje nėra būtinas. Skaidrės pamerkiamos į autoradiografinę emulsiją, eksponuojamos tamsoje (jas šaldant 1-2 savaites), išryškinamos, dažomos ir skaičiuojamos sidabro granulės, susidariusios ekspozicijos metu. Iš kiekvieno gyvūno paimtų mėginių paruošiama nuo 2 iki 3 skaidrių.

▼B

1.5.8 **Analizė**

Ląstelės, esančios paruoštose skaidrėse, turi pasižymėti normaliomis morfologinėmis ypatybėmis tam, kad būtų galima įvertinti svarbią neplanuotą DNR sintezę. Preparatai tiriama mikroskopu, ieškant akivaizdžių toksiškumo požymių (pavyzdžiui, piknotinių branduolių arba sumažėjusio įvestos žymės radioaktyvumo).

Prieš skaičiuojant granules, skaidrės užkoduojamos. Normaliai kiekvieno gyvūno atveju 2 skaidrėse 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.

³H žymėto timidino įjungimas į morfologiškai normalių ląstelių branduolius bei citoplazmą, įvertinamas pagal sidabro granulių sankaupas, turi būti tiriamas atitinkamais metodais.

Grain counts are determined over the nuclei (nuclear grains, NG) and nucleus equivalent areas over the cytoplasm (cytoplasmic grains, CG). CG counts are measured by either taking the most heavily labelled area of cytoplasm, or by taking an average of two to three random cytoplasmic grain counts adjacent to the nucleus. Other counting methods (e.g. whole cell counting) may be used if they can be justified (6).

2. **DUOMENYS**

2.1 **REZULTATŲ APDOROJIMAS**

Turi būti pateikiami duomenys apie kiekvieną skaidrę bei tirtą gyvūną. Be to visi duomenys pateikiami apibendrintai, lentelių forma. Branduolinio tinklo granulių (BTG) 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 INTERPRETAVIMAS**

Teigiamų/neigiamų atsakų kriterijų pavyzdžiai:

teigiami	i) BTG vertės yra aukščiau nustatyto slenkstinio lygio, kuris pagrindžiamas, remiantis anksčiau laboratorijoje gautais duomenimis;
arba	ii) BTG vertės yra žymiai didesnės už kontrolinio mėginio, naudojamo tuo tuo pačiu metu, vertę;
neigiami	i) BTG vertės atitinka arba yra mažesnės už anksčiau naudoto kontrolinio mėginio slenkstinį lygį;
arba	ii) BTG vertės yra nežymiai didesnės už kontrolinio mėginio, naudojamo tuo pačiu metu, vertę.

▼B

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 tiriamosios 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 tiriamoji medžiaga sukelia DNR pažeidimus žinduolių kepenų ląstelėse *in vivo*, o pažeidimų reparacija vyksta neplanuotos DNR sintezės (NDS) metu *in vitro*. Neigiamas rezultatas rodo, kad esant tyrimo sąlygoms, tiriamoji medžiaga nesukelia DNR pažeidimų, nustatomų šio tyrimo metu.

Reikia aptarti tą galimybę, ar tiriamoji medžiaga ar jos metabolitai pasieks bendrąją cirkuliaciją ar specifiniu būdu tą audinį, į kurį jie yra nukreipti (pavyzdžiui, sisteminio toksiškumo atveju).

3. ATASKAITA

TYRIMO ATASKAITA

Tyrimo ataskaitoje turi būti pateikiama tokia informacija:

Tirpiklis/tirpinantysis įrenginys:

- priežastys, dėl kurių buvo pasirinktas šis įrenginys,
- tiriamosios cheminės medžiagos, esančios tirpiklyje/tirpinančiajame įrenginyje, tirpumas ir stabilumas, jei toks yra žinomas.

Tiriamieji gyvūnai:

- panaudota rūšis ar kamienas,
- gyvūnų skaičius, amžius ir lytis,
- šaltinis, laikymo sąlygos, maitinimas ir pan.,
- kiekvieno gyvūno svoris prieš pradedant tyrimą ir kiekvienos grupės svorio riba, vidurkiai bei standartinis nukrypimas.

Tyrimo sąlygos:

- teigiami ir neigiami (tirpiklis/tirpinantysis įrenginys) kontroliniai mėginiai,
- intervalo paieškos tyrimo, jei jis buvo vykdomas, duomenys,
- pagrindinė priežastis, nulėmusi dozės dydžio pasirinkimą,
- duomenys apie tiriamosios medžiagos paruošimą,
- duomenys apie tiriamosios medžiagos davimą,
- pagrindinė priežastis, nulėmusi davimo būdo pasirinkimą,
- metodai, kuriais patvirtinama, kad tiriamoji cheminė medžiaga pateko į bendrąją cirkuliaciją ar audinį, į kurį ji buvo nukreipta, jei tai įmanoma nurodyti,

▼B

- tiriamosios cheminės medžiagos, esančios pašaruose ir geriamajame vandenyje, koncentracijos (pm) perversimas į tikrąją dozę (mg/kūno masės kg/dienai), jei tai įmanoma,
- duomenys apie pašarų ir geriamojo vandens kokybę,
- detalus veikimo tiriamąja medžiaga ir mėginio paėmimo tvarkaraščio aprašymas,
- metodai toksiškumui įvertinti,
- kepenų ląstelių paruošimo ir kultivavimo metodai,
- panaudotas autoradiografinis metodas,
- paruoštų skaidrių ir įvertintų ląstelių skaičius,
- įvertinimo kriterijai,
- teigiamų, neigiamų ar abejotinių rezultatų nustatymo kriterijai.

Rezultatai:

- branduolinių, citoplazminių bei branduolinio tinklo granulių, esančių kiekvienos skaidrės, gyvūno ar gyvūnų grupės ląstelėse, skaičiaus vidurkiai,
- 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/-tirpinantysis įrenginys) 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.

▼B

- 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.

▼B**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). Kadangi buvo susirūpinta, kad ši procedūra gyvūnams sukelia skausmą ir kančias, buvo pataisytas B.4 bandymo metodas, pagal kurį odos suardymą galima nustatyti taikant alternatyvius *in vitro* metodus ir išvengti gyvūnams sukeliama skausmo ir kančių.

Pirmasis žingsnis apibrėžiant alternatyvius bandymus, kurie gali būti naudojami odos suardomumui bandyti reguliavimo tikslais, buvo pradiniai tinkamumo patvirtinimo tyrimai (3). Vėliau buvo atliekamas oficialus odos suardymui įvertinti skirtų *in vitro* metodų (4) (5) tinkamumo patvirtinimas (6) (7) (8). Pagal šių tyrimų 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 tyrimuose buvo gauti duomenys, 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.

▼B

1.2 SĄVOKOS

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 lupimosi, 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 pastovus metodas užtvaro funkcijai įvertinti, registruojant jonų praėjimą per odos sluoksnį jonais 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
Tetrachloretenas	204-825-9	27-18-4	Neardanti
Izostearino rūgštis	250-178-0	30399-84-9	Neardanti
4-(metiltio)-benzaldehydas	222-365-7	3446-89-7	Neardanti

Didesnė dalis išvardytų medžiagų yra paimta iš ECVAM tarptautiniam tinkamumo patvirtinimo tyrimui (4) atrinktų cheminių medžiagų sąrašo. Jų atranka pagrįsta šiais kriterijais:

i) vienodas ardančių ir neardančių medžiagų skaičius;

▼B

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 nužudytų 28–30 parų amžiaus žiurkių odos diskai. Ardančios medžiagos identifikuojamos 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 plačiam cheminių medžiagų ratui, 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.

▼ B

Jaunų, maždaug 22 parų amžiaus patinų arba patelių (*Wistar* arba panašios veislės žiurkių) nugaros ir šonų plaukai atsargiai nukerpami mažomis žirkėmis. 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* atsi-gauna po plaukų kirpimo.

1.5.2 Odos diskų paruošimas

Gyvūnai humaniškai nužudomi, 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. Išpjunami odos diskai, kurių kiekvieno skersmuo maždaug 20 mm. Odą diskų gamybai galima 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 MgSO₄ tirpalu (154 mmol/l) (1 paveikslas). Odos diskas turi būti visiškai panardintas į MgSO₄ 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 kΩ, kad likusius diskus būtų galima naudoti bandymui. Jei varžos vertė yra mažesnė kaip 10 kΩ, 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.

▼B

Kiekvienai bandomajai ir kontrolinei medžiagai naudojami trys odos diskai. Bandomoji medžiaga uždedama 24 h esant 20 – 23 °C. Bandomoji medžiaga pašalinama plaunant ją ne didesnės kaip 30 °C temperatūros vandentiekio vandens srove tol, kol daugiau medžiagos nebeįmanoma pašalinti.

1.5.4 OSEV matavimai

Odos pilnutinė varža matuojama kaip OSEV, išmatuota naudojant žemos įtampos, kintamosios srovės Vitstono tiltelį (13). Bendrosios tiltelio specifikacijos: 1–3 V darbinė įtampa, sinusinė arba stačiakampio formos kintamoji 50–1 000 Hz srovė ir bent 0,1–30 kΩ matavimo intervalas. Tinkamumo patvirtinimo matavimams naudojamas tiltelis matuoja induktyvumą, talpą ir varžą iki 2 000 H, 2 000 μF ir 2 MΩ, esant 100 Hz arba 1 kHz dažniui, ir naudojant nuoseklaus arba lygiagretaus jungimo vertes. Atliekant suardomumo bandymo OSEV matavimus, užrašoma varža, esant 100 Hz dažniui ir naudojant nuoseklaus jungimo vertes. Prieš matuojant elektrinę varžą odos paviršiaus įtemptis sumažinama įpilant epidermiui padengti pakankamą tūrį 70 % etanolio. Po kelių sekundžių etanolis iš vamzdelio pašalinamas ir audinys drėkinamas įpilant 3 ml MgSO₄ tirpalo (154 mmol/l). Tiltelio elektrodai dedami iš abiejų odos disko pusių jo varžai kΩ išmatuoti (1 paveikslas). Elektrodo matmenys ir elektrodo 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 MgSO₄ tirpalą. Išorinis elektrodas įstatomas į rinktuvo kamerą taip, kad jis remtųsi į kameros dugną. Užtikrinamas nekintamas atstumas tarp spyruoklinio spaustuko ir PTFE vamzdelio dugno (2 paveikslas), kadangi šis atstumas turi įtakos gautai varžos vertei. Dėl tos pačios priežasties atstumas tarp vidinio elektrodo ir odos disko turi būti pastovus ir kiek įmanoma mažesnis (1–2 mm).

Jei išmatuota varžos vertė yra didesnė kaip 20 kΩ, tai gali būti dėl bandomosios medžiagos likučių, dengiančių odos disko epidermio paviršių. Galima mėginti dar kartą pašalinti šią dangą, pvz., užkimšti PTFE vamzdelio angą pirštiniu nykščiu ir purtyti maždaug 10 s; MgSO₄ tirpalas išpilamas ir varža dar kartą matuojama, įpylus naujo MgSO₄ tirpalo.

Bandymo aparato savybės bei matmenys ir taikoma matavimo procedūra gali turėti įtakos gautoms OSEV vėrtėms. 5 kΩ ardymo ribinė vertė buvo nustatyta pagal duomenis, gautus naudojant šiame metode aprašytą konkretų aparatą ir procedūrą. Gali būti taikomos kitos ribinės ir kontrolinės vėrtės, jei pakinta bandymo sąlygos arba naudojamas kitas aparatas. Taigi metodą ir varžos ribines vertes būtina kalibruoti, bandant eilę etalonų, pasirinktų iš tinkamumo patvirtinimo tyrime naudotų cheminių medžiagų (4) (5), arba iš medžiagų, kurių klasė atitinka tiriamų cheminių medžiagų klasę. Tinkamų etaloninių cheminių medžiagų rinkinys pateiktas 1 lentelėje.

▼ B**1.5.5 Dažiklio surišimo metodai**

Veikiant tam tikroms neardančioms medžiagoms varža gali sumažėti iki mažesnės kaip ribinė 5 k Ω 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 k Ω 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 μ l 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 $\sim 175 \times g$). 1 ml tirpalo virš nuosėdų skiedžiamas penkis kartus (V/V) [t.y. 1 ml + 4 ml] 30 % (m/V) natrio dodecil sulfato tirpalu distiliuotame vandenyje. Tirpalo optinis tankis matuojamas esant 565 nm bangos ilgiui.

1.5.5.2 Dažiklio kiekio apskaičiavimas

Sulforodamino B dažiklio kiekis vienam diskui apskaičiuojamas pagal optinio tankio vertes (5) (sulforodamino B dažiklio molinis ekstinkcijos koeficientas = $8,7 \times 10^4$, 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 (k Ω) ir vidutinės dažiklio kiekio vertės (μ g/diskui), jei tinka, pateikiamos lentelėse (atskirų bandymų duomenys ir vidutinė vertė $\pm$ standartinis nuokrypis), įskaitant lygiagrečių/kartotinių bandymų rezultatus, vidurkius ir atskiras vertes.

▼B

2.1 REZULTATŲ INTERPRETAVIMAS

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 (kΩ)
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 kΩ, arba
- ii) OSEV vidutinė vertė yra lygi 5 kΩ arba mažesnė kaip 5 kΩ, 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 kΩ arba mažesnis kaip 5 kΩ, ir odos diskas yra akivaizdžiai pažeistas, arba
- ii) OSEV vidurkis yra lygus 5 kΩ arba mažesnis kaip 5 kΩ, 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.

▼B**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;
- fizikocheminės 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.

Bandymo gyvūnai:

- naudota rūšis ir lytis;
- gyvūnų amžius, kai naudojami odos donorais;
- 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 taikomos bandymų procedūros detalės;
- dažiklio surišimo įvertinimui taikomos bandymo procedūros detalės; 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](http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6).

▼ **B**

- 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., Poncet, 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.

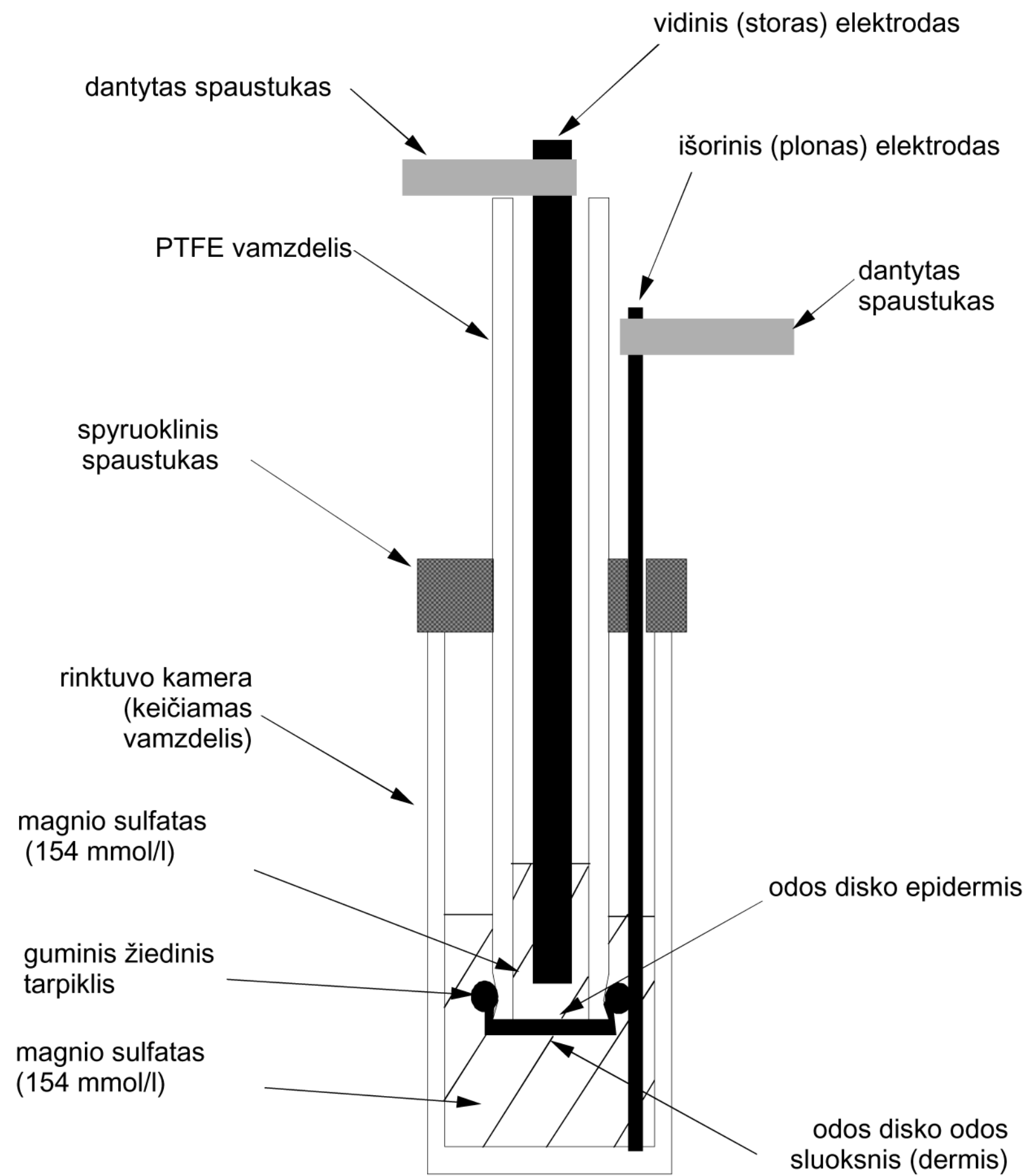
- 10) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH 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 -modifications and validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, p. 507–512.

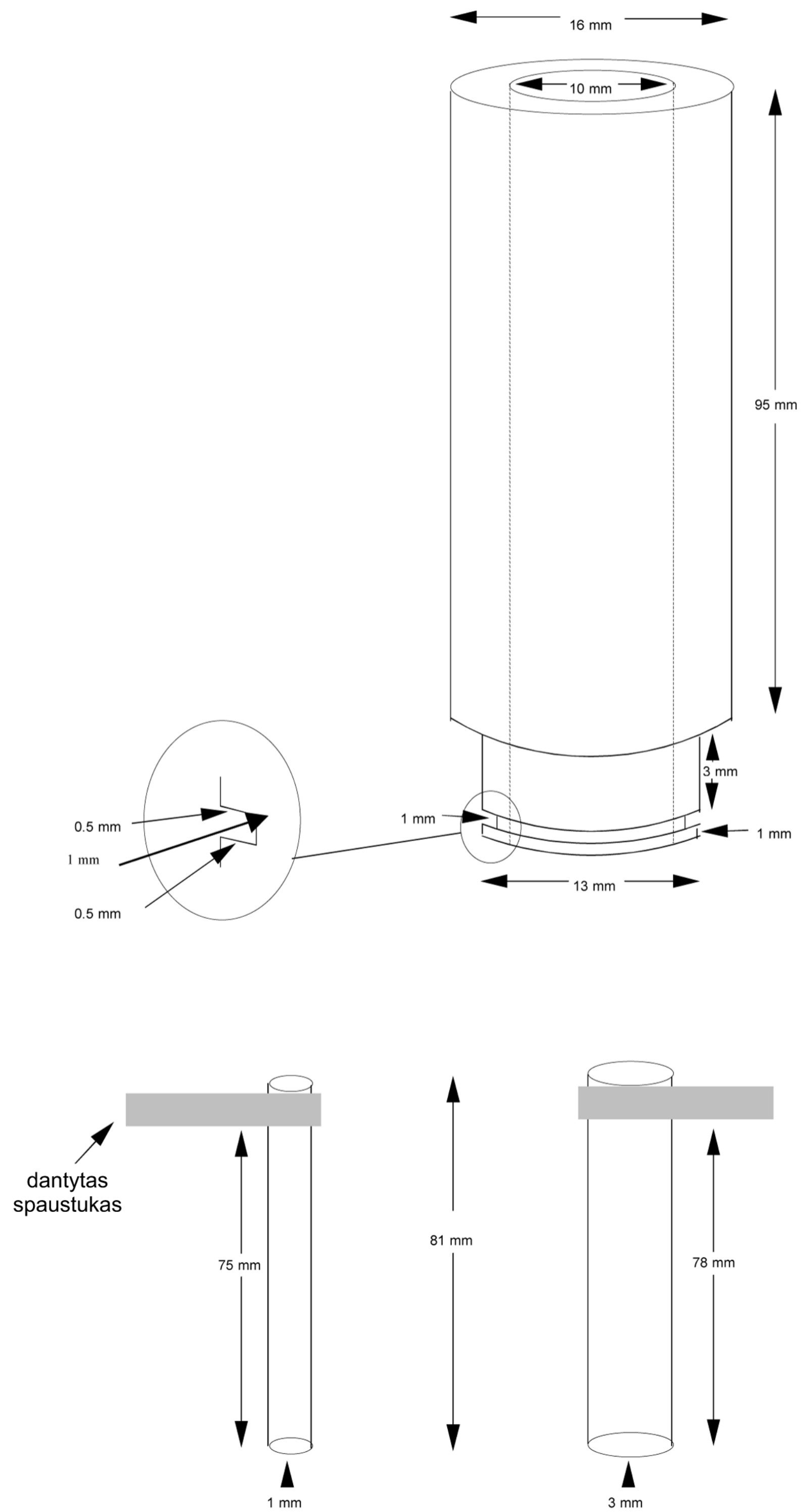
▼B

- 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.

▼ B*1 paveikslas***Žiurkių odos OSEV bandymo aparatas**

▼ B*2 paveikslas*

Politetrafluoretileno (PFTE) ir rinktuvo vamzdelių bei naudojamų elektrodų matmenys



▼B**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.

▼B**B.40BIS. 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). Kadangi buvo susirūpinta, kad ši procedūra gyvūnams sukelia skausmą ir kančias, buvo pataisytas B.4 bandymo metodas, pagal kurį odos suardymą galima nustatyti taikant alternatyvius *in vitro* metodus, taip išvengiant gyvūnams sukeliama skausmo ir kančių.

Pirmasis žingsnis apibrėžiant alternatyvius bandymus, kurie gali būti naudojami odos suardomumui bandyti reguliavimo tikslais, buvo pradiniai tinkamumo patvirtinimo tyrimai (3). Vėliau buvo atliekamas oficialus odos suardymui įvertinti skirtų *in vitro* metodų (4) (5) tinkamumo patvirtinimas (6) (7) (8). Pagal šių tyrimų 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 tyrimuose buvo gauti duomenys, 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.

▼B

1.2 SAŲVOKOS

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 lupimosi, 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 suminių 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
Tetrachloretenas	204-825-9	27-18-4	Neardanti
Izostearino rūgštis	250-178-0	30399-84-9	Neardanti
4-(metiltio)-benzaldehydas	222-365-7	3446-89-7	Neardanti

Didesnė išvardytų medžiagų dalis yra įtraukta į ECVAM tarptautiniam tinkamumo patvirtinimo tyrimui (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;

▼B

- 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 funkcinis *stratum corneum*. Ardančios medžiagos nustatomos pagal jų sugebėjimą po tam tikro veikimo laikotarpio sumažinti ląstelių gyvybingumą [nustatoma, 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 Procedūra

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 modelio sąlygos

Epiteliui sukurti turi būti naudojami žmogaus keratinocitai. Po veikiančiu *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 būtų gautas veikiantis užtvaras, kurio tvirtumo pakaktų citotoksinių markerių greitai skverbčiai atsispirti. 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 modelio sąlygos

Gyvybingumas paprastai kiekybiškai įvertinamas naudojant MTT arba kitus medžiagų apykaitoje dalyvaujančius vitalinius dažiklius. Šiais atvejais iš neigiamo kontrolinio bandinio audinio ekstrahuoto (ištirpinto) dažiklio poptinis 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 % (ET₅₀) (pvz., EpiDerm™ ir EPISKIN™ modeliams šis laikas > 2 h). Turi akivaizdžiai matytis, 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.

▼B1.4.1.2 *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 $25 \mu\text{L}/\text{cm}^2$. Jei tiriamos 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 kiekybiniais patvirtintais metodais. Be to, naudojamas gyvybingumo matavimas turi tiktai 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.

▼B**2.1 REZULTATŲ INTERPRETAVIMAS**

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 tyrimą. Kaip pavyzdys, pateikiama suardymo savybių prognozė, taikant EpiDermTM 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, bet 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));
- fizikocheminės savybės, pvz., fizikinė būseną, 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 prietaisą (pvz., spektrofotometro), naudoto ląstelių gyvybingumui matuoti, kalibravimą;

▼ B

- visa konkretų odos modelių patvirtinanti informacija, įskaitant jo tinkamumą;
- taikytos bandymo procedūros detalės;
- naudotos bandomosios dozės;
- visų bandymo procedūros pakeitimų aprašymas;
- nuoroda į anksčiau sukauptus duomenis apie modelį;
- taikytų vertinimo kriterijų aprašymas.

Rezultatai:

- atskirų tiriamųjų bandinių duomenų lentelės;
- 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](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., Ponc, 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>.

▼ **B**

- 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 assays. *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) Ponc, 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. *Cyotechnology* 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.

▼B

- 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.

▼B**B.41. 3T3 NRU FOTOKSIŠKUMO BANDYMAS *IN VITRO*****1. METODAS**

Šis metodas atitinka OECD TG 432 (2004).

1.1 ĮVADAS

Fototoksiškumas apibrėžiamas kaip toksinis atsakas į ant kūno uždėtą medžiagą, kuri atsiranda arba padidėja (matosi, esant mažesnėms dozėms) paveikus šviesa, arba kai sistemingai veikiama chemine medžiaga, oda yra apšvitinama.

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 fototoksinės *in vivo* po to, kai jomis sistemingai buvo veikiama oda ir kai jos joje pasiskirsto arba kai jomis paveikiama 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 pirmąją 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 tyrimų rekomendaciją 101. Buvo padaryta prielaida, kad jei molinis ekstinkcijos/sugerties koeficientas yra mažesnis kaip $10 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, 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 priedą.

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, bandymu nebuvo siekiama 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 metaboline sistemas, fototoksikologijoje iki šiol yra tik reti pavyzdžiai, kai medžiaga turi patirti metabolinį virsmą, kad *in vivo* arba *in vitro* ji veiktų kaip fototoksinė medžiaga. Todėl reikavimas šį bandymą atlikti naudojant metabolinės aktyvacijos sistemą nėra laikomas būtinu arba moksliškai pagrįstu.

▼ B

1.2 SAVOKOS

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 $\times$ laikas), išreikštas J (= $W \times s$) ploto vienetui, pvz., J/m^2 arba J/cm^2 .

UV šviesos bangų juostos – TRK (*Tarptautinė radiacijos 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 nustčius 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 neigiamiems kontroliniams bandiniams (tirpikliams), 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 koncentracijų verčių (IC_{50}), gautų nesant (–Irr) ir esant (+Irr) necitotoksiniam švitinimui UVA/matomąją šviesą, 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) necitotoksiniui švitinimui UVA/matomąją šviesą, matematinę analizę.

Fototoksiškumas – ūmus toksinis atsakas, kuris atsiranda, kai oda iš pradžių veikiamas tam tikromis cheminėmis medžiagomis, o vėliau šviesa, arba kuris panašiai sukeliamas, kai oda švitinama po to, kai į ją buvo sistemingai injekuojama 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 susietas vitalinio neutraliojo raudonojo (NR) dažiklio sugėrimo mažėjimas, išmatuotas praėjus 24 h po apdorojimo 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 membraną 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, kuo ir grindžiamas šis bandymas.

▼ **B**

Balb/c 3T3 ląstelės 24 h laikomos kultūroje monosluoksniui gauti. Iš pradžių 1 h inkubuojama po dvi 96 duobučių lėkšteles vienai bandomajai cheminei medžiagai, esant aštuonioms skirtingoms bandomosios medžiagos koncentracijos vertėms. Vėliau viena iš lėkštelių apšvitinama didžiausia necitotoksinio švitinimo doze, o kita lėkštelė laikoma tamsoje. Tuomet abiejų lėkštelių apdorojimo terpė yra keičiama kultūros terpė 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 medžiagas, apšvitintos arba laikytos tamsoje, koncentracijas, kai lygis paprastai būna IC₅₀, 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 tyrimą, 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 priedą).

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 streptomycinu (100 µg/ml); inkubuojama drėgnoje atmosferoje, esant 37 °C, o CO₂ kiekis siekia 5–7,5 %, priklausomai nuo buferinio tirpalo (žr. 1.4.1.4 skirsnio antrą pastraipą). Ypač svarbu, kad ląstelių kultivavimo sąlygos užtikrintų 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 fototoksiškumo bandyme *in vitro*.

▼ **B**

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*

Tiriamos cheminės medžiagos turi būti iš naujo ruošiamos prieš pradėdant 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 pusiausvriuose 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 CO₂ 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 % CO₂. Jei ląstelės inkubuojamos esant tik 5 % CO₂, reikėtų pasirinkti didesnės talpos buferinį tirpalą.

Cheminės medžiagos, kurių tirpumas vandenyje yra ribotas, turi būti tirpinamos atitinkamame tirpiklyje. Jei naudojamas tirpiklis, jo turis visose kultivavimo terpėse, t. y. neigiamuose (tirpiklių) kontroliniuose bandiniuose ir visų bandomosios medžiagos koncentracijos verčių bandiniuose, turi būti vienodas, ir tirpiklis neturi būti citotoksinis 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 efekto gesinimas, 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.

▼B1.4.1.5 *Švitinimo sąlygos*

1.4.1.5.1 Šviesos šaltinis

Tiriant 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 bandomąją chemine medžiaga sugeriamos spinduliuotės bangos ilgį (sugerties spektrą), o šviesos dozės (pasiekiamos per priimtina veikimo trukmę) pakaktų žinomoms fototoksinėms medžiagoms rasti. 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 filtras 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 tyrimą, spinduliuotės spektro skirstinio pavyzdys pateiktas (8) (16). Taip pat žr. 2 priedo 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 spektrometras.

Buvo nustatyta, kad 5 J/cm dozė (išmatuota UVA srityje) nėra citotoksinė Balb/c 3T3 ląstelėms ir jos pakanka sužadinti chemines medžiagas, kad būtų sukeltos fototoksinės reakcijos (6) (17), pvz., norint pasiekti 5 J/cm² per 50 min laikotarpį, nustatoma 1,7 mW/cm² energinė apšvieta. Žr. 2 priedo 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 trukmę apskaičiuojama taip:

▼ **B**

$$t(\text{min}) = \frac{\text{švitinimodozė } (J/cm^2) \times 1000}{\text{energinė apšvieta } (mW/cm^2) \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W} \times \text{s})$$

1.4.2 **Bandymo sąlygos**1.4.2.1 *Bandomosios medžiagos koncentracijos vertės*

Cheminės medžiagos, bandomos šviesoje (+Irr) ir tamsoje (-Irr), koncentracijos verčių intervalas turi būti tinkamai nustatytas dozės intervalo radimo bandymais. Gali būti naudinga nustatyti pradinį tirpumą ir po 60 min. (arba po tiek laiko, kiek skiriama apdorojimui), kadangi tirpumas laikui bėgant arba švitinimo laikotarpiu gali pasikeisti. Siekiant išvengti toksiškumo, 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 fizikochemines 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 citotoksinė iki pat ribinės koncentracijos, bet švitinama (+Irr) yra labai citotoksinė, 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 fototoksiškumo *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 tyrimą: 5 J/cm [UVA]) pakanka etaloninėms cheminėms medžiagoms (1 lentelė) tinkamai klasifikuoti.

▼B**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 priimtumo kriterijus, jei vidutinė neapdorotų kontrolinių bandinių OD540 Nru vertė yra $> 0,4$ (t. y. maždaug dvidešimt kartų didesnė už fonui naudojamą tirpiklio optinį tankį).

1.4.2.2.4 Teigiamas kontrolinis bandinys:

Lygiagrečiai kiekvienam 3T3 NRU fototoksiškumo *in vitro* bandymui turi būti bandoma žinoma fototoksinė medžiaga. Rekomenduojamas chlorpromazinas (CPZ). CPZ bandant pagal etaloninį 3T3 NRU fototoksiškumo *in vitro* bandymo protokolą, buvo apibrėžti šie bandymo priimtumo kriterijai: CPZ apšvitinus (+Irr): $IC_{50} = 0,1-2,0$ ug/ml, CPZ tamsoje (-Irr): $IC_{50}=7,0-90,0$ ug/ml. Fotodirginimo faktorius (FDF) turėtų būti > 6 . Turi būti kontroliuojami teigiamam kontroliniam bandiniui anksčiau gauti duomenys.

Vietoj chlorpromazino kaip lygiagrečiai bandomi teigiami kontroliniai bandiniai gali būti naudojamos kitos fototoksinės medžiagos, tinkančios dėl cheminės medžiagos klasės arba tirpumo charakteristikų.

1.4.3 Bandymo procedūra (6) (7) (8) (16) (17):**1.4.3.1 1-oji diena:**

Į kraštines 96 duobučių audinių kultūros mikrotitravimo lėkštelės duobutes įlašinama po 100 μ l kultivavimo terpės (= tuštieji bandiniai). Į likusias duobutes įlašinama po 100 μ l 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 susiliejančią 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 μ l inkubavimui naudoto buferinio tirpalo. Įpilama 100 μ l 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).

▼B

Esant kambario temperatūrai, ląstelės 50 min. veikiamos šviesa (+Irr) per 96 duobučių lėkštelės dangtį, naudojant didžiausią dar necitotoksinę spinduliuotės dozę (taip pat žr. 2 priedą). 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-oji 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 nusauginant 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 kratytuvo 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 reikšmingą koncentracijos ir atsako, gauto veikiant šviesa ir tamsoje, analizę ir, jei įmanoma, nustatyti bandomosios medžiagos koncentraciją, kuriai esant ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % (IC₅₀). 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.

▼ B

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:

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)}$$

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

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^n w_i PE_{C_i}}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

Kurią nors koncentraciją C atitinkantis fotoefektas PE_C apibrėžiamas kaip atsako RE_C ir dozės DE_C efektų sandauga, t. y. $PE_C = RE_C \times DE_C$. Atsako efektas RE_C yra atsakų, nustatomų tamsoje ir veikiant šviesa, skirtumas, t. y. $RE_C = R_C(-Irr) - R_C(+Irr)$. 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 tinklėlis 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 fototoksinė.

▼B

Programinės įrangos rinkinį, kuris naudojamas apskaičiuojant FDF ir VFE, galima rasti (20).

2.3 REZULTATŲ INTERPRETAVIMAS

Pagal tinkamumo patvirtinimo tyrimo 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 fototoksinė; o kai FDF > 5 arba VFE > 0,15, prognozuojama: fototoksinė.

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]	> 14,4	0,27 – 0,54	242 nm 300 nm (petys)	etanolis
Cholorpromazina s HCl	200-701-3	[69-09-0]	> 71,6	0,33 – 0,63	309 nm	etanolis
Norfloksacinas	274-614-4	[70458-96-7]	> 18,5	0,34– 0,90	316 nm	acetonitrilas
Antracenas	204-371-1	[120-12-7]	> 45,3	0,19 – 0,81	356 nm	acetonitrilas
Fotoporfirinas IX, dinatrio	256-815-9	[50865-01-5]	nėra FDF	0,54– 0,74	402 nm	etanolis
L-histidinas		[7006-35-1]	1,1 - 1,7	0,05 – 0,10	211 nm	vanduo
Heksachlorofena s	200-733-8	[70-30-4]	1,0-1,9	0,00– 0,05	299 nm 317 nm (petys)	etanolis
Natrio laurilsulfatas	205-788-1	[151-21-3]	> 14,4	0,00– 0,05	nesugeriamas	vanduo

(1) Tirpiklis, naudotas sugerčiai matuoti.

2.4 DUOMENŲ INTERPRETAVIMAS

Jei fototoksinis poveikis 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.

▼B

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:

- identifikavimo duomenys, įprasti bendrieji pavadinimai, IUPAC pavadinimai ir CAS numeris, jei žinomas,
- fizikinė būseną ir grynumas,
- fizikocheminės savybės, svarbios atliekamam tyrimui,
- 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 fototoksiškumo *in vitro* bandymą.

Bandymo sąlygos (1); *inkubacija prieš ir po apdorojimo*:

- kultivavimo terpės tipas ir sudėtis,
- inkubacijos sąlygos (CO₂ koncentracija, temperatūra, drėgmė),
- inkubacijos trukmė (prieš apdorojimą, po apdorojimo).

Bandymo sąlygos (2); *apdorojimas 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,
- apdorojimo terpės tipas ir sudėtis (buferinis druskos tirpalas),
- cheminio apdorojimo trukmė.

Bandymo sąlygos (3); *švitinimas*:

- pasirinkto šviesos šaltinio pagrindimas,

▼B

- šviesos šaltinio ir radiometro gamintojas ir tipas,
- šviesos šaltinio spektrinės energinės apšvietos charakteristikos,
- naudojamo (-ų) filtro (-ų) praleidimo ir sugerties charakteristikos,
- radiometro charakteristikos ir jo kalibravimo detalės,
- 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,
- spektrofotometriniams 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 priimtumo kriterijai; lygiagretus tirpiklio kontrolinis bandinys,
- švitintų ir nešvitintų ląstelių absoliutusias gyvybingumas (neutraliojo raudonojo ekstrakto optinis tankis),
- anksčiau gauti neigiamų ir tirpiklių kontrolinių bandinių duomenys; vidutinės vertės ir standartiniai nuokrypiai,
- bandymo priimtumo kriterijai; lygiagretus teigiamas kontrolinis bandinys,

▼ B

— 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.

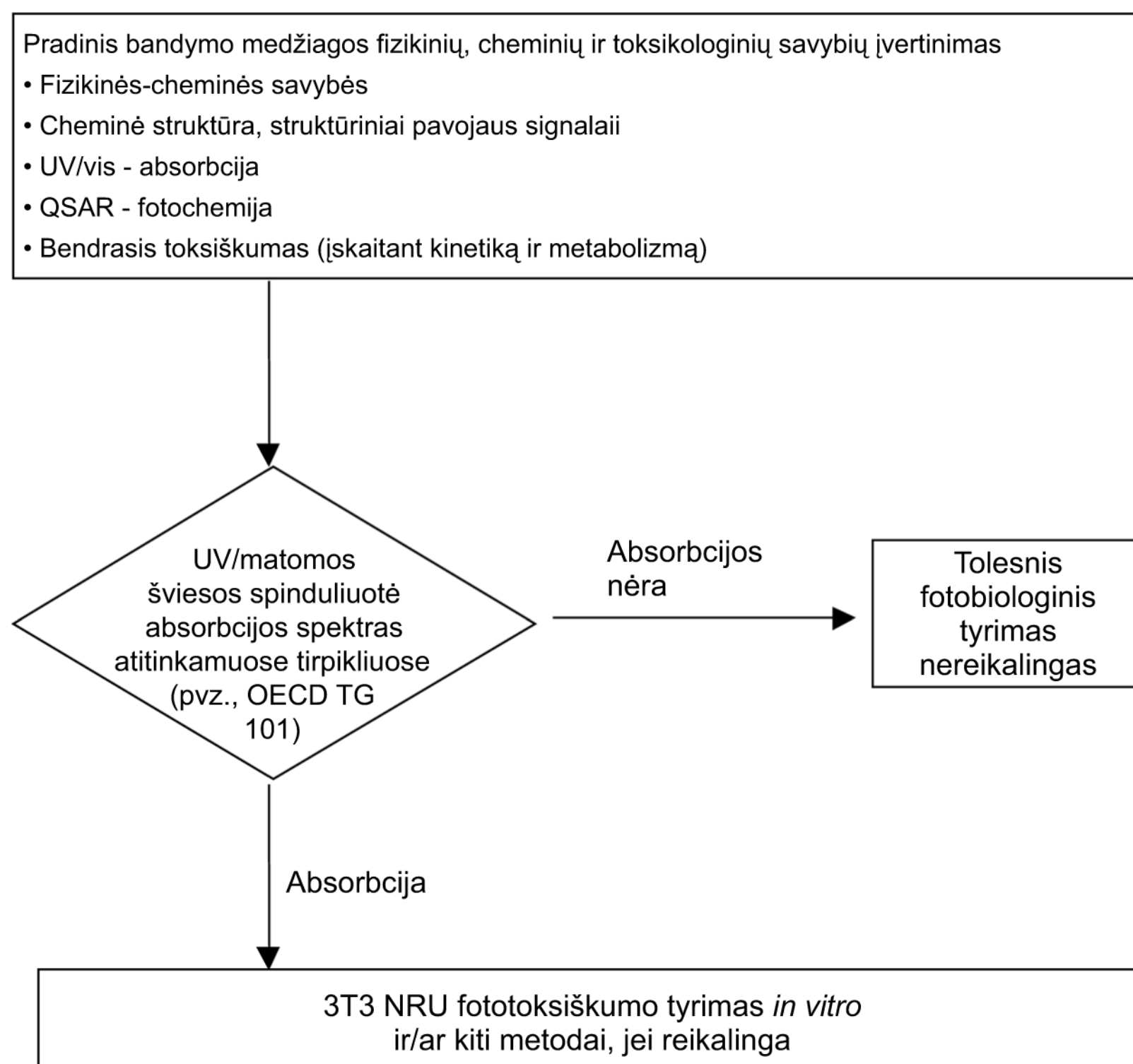
Išvados.

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., Holzhütter, 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., Holzhütter, 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 EU/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, 15th 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.

▼ **B**

- 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 ultra-violet, 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 Illumination, 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., Holzhütter, 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) Holzhütter, H.G, and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. *J. Biol. Systems* 3, p. 127–138.
- 20) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. *ATLA*, 25, p. 445–462.
- 21) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

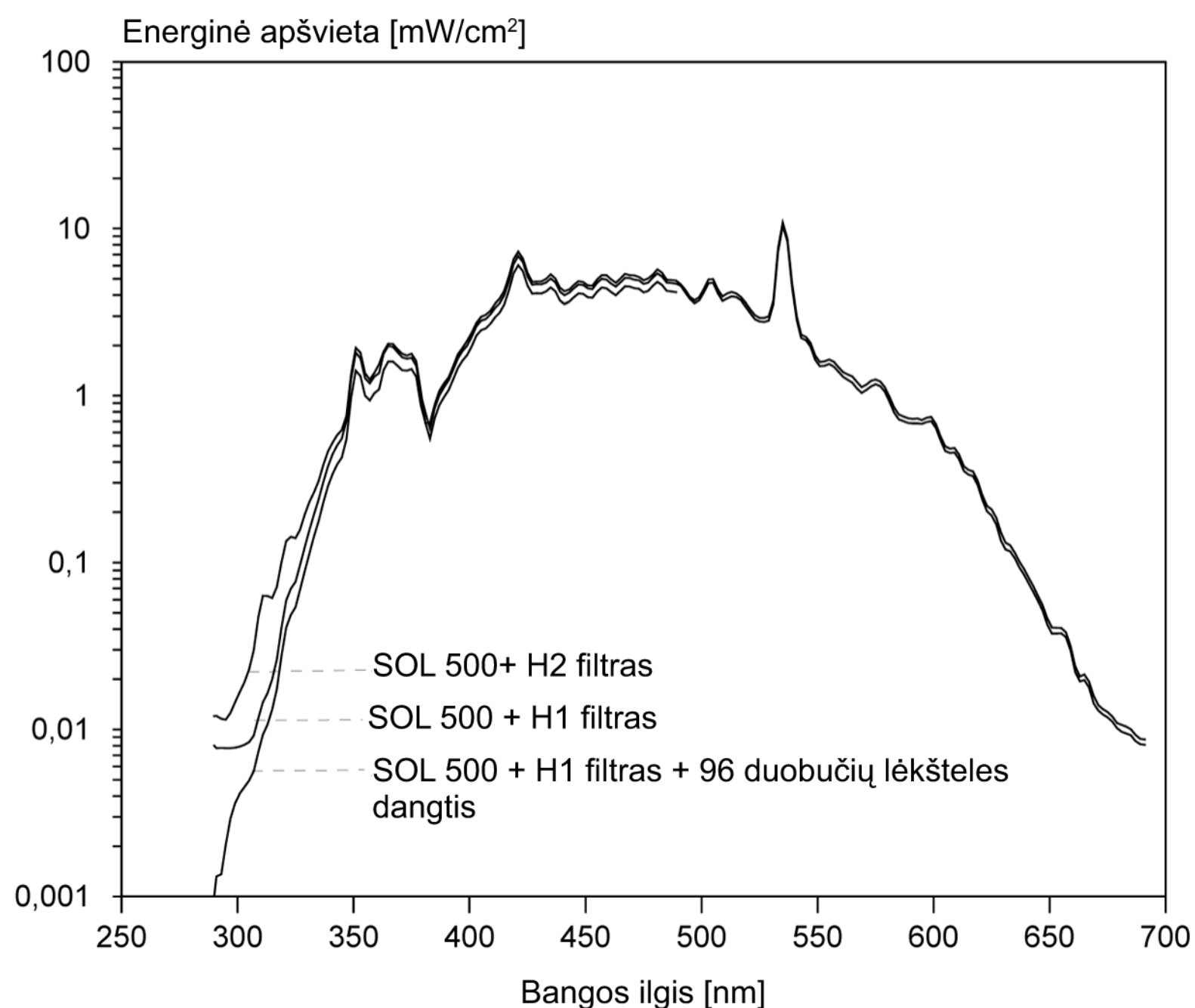
*I PRIEDAS***3T3 NRU fototoksiškumo bandymo svarba, taikant nuoseklų metodą cheminių medžiagų fototoksiškumui tirti**

▼ B

2 PRIEDAS

1 paveikslas

Filtruoto saulės šviesos imitatoriaus spektrinės galios skirstinys



(žr. 1.4.1.5.1 skirsnio antrąją pastraipą)

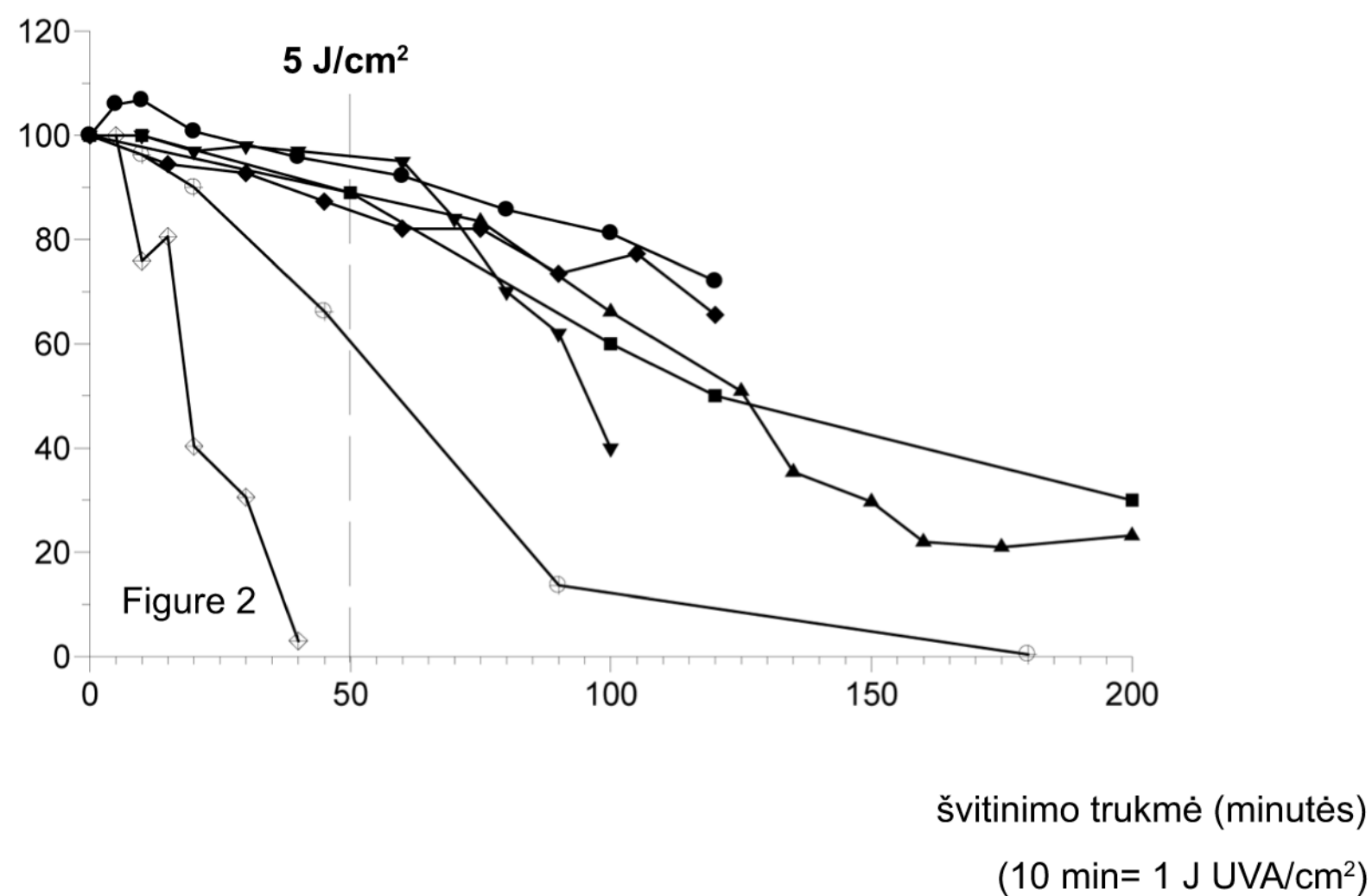
1 paveiksle pateiktas filtruoto saulės šviesos imitatoriaus priimtino spektrinės energinės apšvietos skirstinio pavyzdys. Jis yra gautas metalų halogenidais legiruotam šaltiniui, naudojamam 3T3 NRU fototoksiškumo bandymo tinkamumo patvirtinimo tyrime (6) (8) (17). Parodyta dviejų skirtingų filtrų ir 96 duobučių ląstelių kultūros lėkštelės dangčio filtruojamojo poveikio įtaka. H2 filtras buvo naudojamas tik toms bandymo sistemoms, kurios gali išverti didesnę 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).

▼ **B**

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/cm² (vertikali brūkšniuota linija). Horizontali brūkšniuota linija papildomai rodo didžiausią priimtina švitinimo poveikį, nurodytą 1.4.2.2 skirsnyje.

▼B**B.42. ODOS JAUTRINIMAS. VIETINIO LIMFMAZGIO TYRIMAS****1. METODAS**

Šis bandymų metodas atitinka OECD TG 429 (2002)

1.1 ĮVADAS

Vietinio limfmazgio tyrimas (*Local Lymph Node Assay* - LLNA) yra pakankamai įteisintas ir priimtas, kad būtų galima pagrįsti jo, kaip naujo metodo, patvirtinimą (1) (2) (3). Tai yra antrasis metodas, leidžiantis nustatyti galimą cheminių medžiagų sukeliama gyvūnų odos jautrinimą. Pagal kitą metodą (B.6) naudojami bandymai su jūrų kiaulytėmis, ypač, maksimizacijos ir Buehlerio bandymas su jūros kiaulytėmis (4).

LLNA yra pakaitinis metodas odą jautrinančioms cheminėms medžiagoms identifikuoti ir patvirtinti, kad tam tikrų medžiagų geba jautrinti odą nėra didelė. Nereikia manyti, kad visais atvejais vietoj bandymo su jūrų kiaulytėmis reikėtų 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.

LLNA turi tam tikrų pranašumų atsižvelgiant į mokslo pažangą ir gyvūnų gerovę. Tiriamas odos jautrinimo indukcinis periodas ir gaunami kiekybiniai duomenys, tinkami reakcijai į dozę įvertinti. Yra paskelbta išsami informacija apie LLNA tinkamumo patvirtinimą ir susijusių darbų apžvalga (5) (6) (7) (8). Be to, reikia pažymėti, kad silpnai arba vidutiniškai jautrinančios medžiagos, kurios yra rekomenduotos kaip tinkamos teigiamo poveikio kontrolinės medžiagos bandymams su jūrų kiaulytėmis, tinka naudoti LLNA metodei (6) (8) (9).

LLNA yra *in vivo* metodas, todėl jautrinančiam poveikiui dėl sąlyčio įvertinti naudojami gyvūnai. Tačiau taikant šį metodą yra galimybė sumažinti šiam tikslui reikalingų gyvūnų skaičių. Be to, LLNA iš esmės pagerina būdą, kuriuo gyvūnai naudojami jautrinimui dėl sąlyčio bandyti. LLNA yra pagrįstas imunologinių reiškinių, kuriuos cheminės medžiagos sukelia jautrinimo indukcijos periodu, nagrinėjimu. Kitaip nei darant bandymus su jūrų kiaulytėmis, taikant LLNA nereikia sukelti ypač didelio odos jautrumo reakcijų. Be to, taikant LLNA nereikia naudoti aktyvuojančiųjų priedų, kurie reikalingi darant maksimizacijos bandymą su jūrų kiaulytėmis. Taigi LLNA sumažina gyvūnų kančias. Nežiūrint į LLNA pranašumus palyginti su tradiciniais bandymais su jūrų kiaulytėmis, reikia pripažinti, kad yra tam tikrų apribojimų, dėl kurių gali tekti taikyti tradicinius bandymus su jūrų kiaulytėmis (pvz., klaidingi neigiami rezultatai tiriant kai kuriuos metalus taikant LLNA, klaidingi teigiami rezultatai tiriant tam tikrus odos dirgiklius) (10).

Dar žr. B dalies įvadą.

▼B**1.2 BANDYMŲ METODO ESMĖ**

Pagrindinis principas, kuriuo pagrįstas LLNA metodas, yra jautrinančių medžiagų sukelta pirminė limfocitų proliferacija cheminės medžiagos uždėjimo vietą drenuojančiame limfmazgyje. Ši proliferacija yra proporcinga naudojamai dozei (ir alergeno gebai jautrinti), taigi tai yra paprastas būdas objektyviai ir kiekybiškai išmatuoti jautrinimą. Taikant LLNA, ši proliferacija įvertinama kaip dozės ir reakcijos santykis, lyginant proliferaciją bandymo grupėse ir nešiklių gavusiose kontrolinėse grupėse. Nustatomas proliferacijos paveiktose grupėse ir kontrolinėse nešiklio grupėse santykis, vadinamas dirginimo rodikliu, kuris turi būti lygus mažiausiai trims, kad bandomoji medžiaga galėtų būti toliau vertinama kaip galinti odą dirginanti medžiaga. Čia aprašyti metodai yra pagrįsti radioaktyviųjų indikatorių naudojimu ląstelių proliferacijai išmatuoti. Tačiau gali būti naudojami kiti parametrai proliferacijai įvertinti, jei jie pagrįsti atitinkamais moksliniais duomenimis, įskaitant išsamias nuorodas ir metodo aprašymą.

1.3 BANDYMO METODO APRAŠYMAS**1.3.1 Pasiruošimas****1.3.1.1 *Laikymo ir šėrimo sąlygos***

Gyvūnai turėtų būti laikomi atskirai. Patalpos, kurioje laikomi bandomieji gyvūnai, 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 užtikrinti 50–60 %. Apšvietimas turi būti dirbtinis, esant 12 h šviesos ir 12 h tamsos sekai. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, neribojant geriamo vandens kiekio.

1.3.1.2 *Gyvūnų ruošimas*

Gyvūnai pasirenkami atsitiktinai, ženklinami, kad būtų įmanoma kiekvieną identifikuoti (tačiau netaikomas joks ausų ženklavimas), ir laikomi narveliuose mažiausiai 5 paras prieš pradedant duoti dozes, kad galėtų priprasti prie laboratorijos sąlygų. Prieš apdorojimo pradžią visi gyvūnai tiriama, siekiant įsitikinti, ar jie neturi pastebimų odos pažeidimų.

1.3.2 Bandymo sąlygos**1.3.2.1 *Bandymo gyvūnai***

Šiam bandymui pasirinkta gyvūnų rūšis – pelės. Naudojamos jaunos suaugusios CBA/Ca arba CBA/J veislės pelių patelės, kurios yra be vados ir neapvaisintos. Pradedant tyrimą, 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 reakcijos į LLNA skirtumų.

▼B1.3.2.2 *Patikimumo tikrinimas*

Teigiamo poveikio kontrolinės gyvūnų grupės naudojamos siekiant parodyti bandymo tinkamumą ir laboratorijos kompetenciją sėkmingai atlikti bandymą. Teigiamo poveikio kontrolinių gyvūnų grupėms turi pasireikšti teigiama LLNA reakcija esant veikimo dozei, kuri turėtų užtikrinti jautrinimo rodiklio padidėjimą (SI) > 3 palyginti su neigiamo poveikio kontroline grupe. Teigiamo poveikio kontrolinė dozė pasirenkama taip, kad indukcija būtų aiški, bet ne per didelė. Tinkamiausios medžiagos yra heksilcinamono aldehidas (CAS Nr. 101-86-0, EINECS Nr. 202-983-3) ir merkaptobenzotiazolas (CAS Nr. 149-30-4, EINECS Nr. 205-736-8). Gali pasitaikyti aplinkybės, kai pateikus pakankamai įrodymų galima naudoti kitas kontrolines medžiagas, atitinkančias pirmiau nurodytus kriterijus. Nors paprastai teigiamo poveikio kontrolinė grupė gali būti reikalinga darant kiekvieną tyrimą, gali būti situacijų, kai bandymų laboratorijos turės ankstesnius teigiamo poveikio kontrolinius duomenis, kurie leistų parodyti patenkinamos reakcijos pastovumą šešis mėnesius arba ilgesnį laikotarpį. Tokiais atvejais gali pakakti rečiau daromo teigiamo poveikio kontrolinio bandymo, esant ne didesniems kaip 6 mėnesių intervalams. Nors teigimo poveikio kontrolinė medžiaga turi būti bandoma nešiklyje, kuris būtų žinomas, kaip sukeliantis vienodą reakciją (pvz., acetonas, alyvuogių aliejus), gali būti reikalaujama bandyti naudojant netipinį nešiklį (klinikiniu arba cheminiu požiūriu atitinkantį mišinį). Tokiu atveju reikia patikrinti galimą teigiamo poveikio kontrolinės medžiagos ir tokio netipinio nešiklio sąveiką.

1.3.2.3 *Gyvūnų skaičius, dozės dydis ir nešiklio pasirinkimas*

Vienos dozės grupėje naudojami mažiausiai keturi gyvūnai, esant ne mažiau kaip trims bandomosios medžiagos koncentracijos vertėms, taip pat neigiamo poveikio kontrolinė grupė, paveikiama tik bandomosios medžiagos nešikliu, ir, prireikus, teigiamo poveikio kontrolinė grupė. Tais atvejais, kai reikia surinkti atskirų gyvūnų duomenis, vienos dozės grupėje turi būti ne mažiau kaip penki gyvūnai. Kontrolinių grupių gyvūnai prižiūrimi kaip ir medžiaga veikiamų grupių gyvūnai, išskyrus tai, kad jie negauna bandomosios medžiagos.

Dozė ir nešiklis turi būti pasirenkami atsižvelgiant į rekomendacijas, pateiktas nuoroje (1). Dozės pasirenkamos iš koncentracijos verčių eilutės 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % ir t. t. Pasirenkant tris nuoseklias koncentracijos vertes, turėtų būti atsižvelgta į turimus ūmaus toksiškumo ir odos dirginimo duomenis, kad didžiausia koncentracija turėtų kiek įmanoma didesnę poveikį, bet būtų išvengta sisteminio toksiškumo ir per didelio vietinio odos dirginimo (2) (11).

Nešiklis pasirenkamas taip, kad bandymo koncentracijos vertės ir tirpumas būtų kiek įmanoma didesni ir kad tirpalas ar suspensija tikėtų bandomajai medžiagai uždėti. Pirmumo tvarka rekomenduojamas nešiklis yra acetonas arba alyvuogių aliejus (4:1 V/V), dime-tilformamidas, metiletilketonas, propilenglikolis ir dimetilsulfoksidas (2) (10), tačiau galima naudoti kitus nešiklius, jei tai būtų tinkamai mokslškai pagrįsta. Tam tikrais atvejais papildomai kontrolei gali tekti naudoti klinikiniu požiūriu atitinkantį tirpiklį arba komercinį preparatą, turintį bandomosios medžiagos. Reikia ypač stengtis užtikrinti, kad į nešiklį būtų dedama hidrofilinių medžiagų, kurios drėkintų odą ir iš karto nenutekėtų. Taigi reikėtų vengti naudoti grynai vandeninius nešiklius.

▼ B**1.3.3 Bandyto eiga****1.3.3.1 Bandyto planas**

Eksperimentinis tyrimo planas atrodo taip:

1 diena

Atskirai nustatoma ir užrašoma kiekvieno gyvūno masė. Ant kiekvienos ausies išorinės pusės užlašinama 25 μ l atitinkamai atskiesto bandomosios medžiagos tirpalo, vien tik nešiklio arba teigiamo poveikio kontrolinės medžiagos (prireikus).

2 ir 3 dienos

Kartojama 1 dieną daryta procedūra.

4 ir 5 dienos

Bandomoji medžiaga nenaudojama.

6 diena

Užrašoma kiekvieno gyvūno masė. Į visų pelių uodegos veną suleidžiama 250 μ l valgomosios druskos ir fosfatinio buferio tirpalo (PBS), turinčio 20 μ Ci (7,4e + 8 Bq) ^3H -metiltimidino. Galima suleisti 250 μ L PBS, turinčio 2 μ Ci (7,4e + 7 Bq) ^{125}I -joddeoksiuridino ir 10^{-5} mol/l fluordeoksiuridino.

Po penkių valandų gyvūnai nužudomi. Drenuojamieji ausų limfmazgiai išpjunami iš kiekvienos ausies ir kiekvienos bandymo grupės išpjovos sudedamos į PBS (jungtinio apdorojimo grupės metodas); taikant kitą metodą, galima išpjauti atskirų gyvūnų limfmazgius ir kiekvieno gyvūno atskirai sudėti į PBS (atskiro gyvūnų apdorojimo metodas). Limfmazgių identifikavimo ir skrodimo aprašymą bei schemas galima rasti 10 nuorodos I priede.

1.3.3.2 Ląstelių suspensijos ruošimas

Ruošiama jungtinio apdorojimo grupių arba atskirų gyvūnų poros limfmazgių ląstelių suspensija (LNC), švelniai mechaniniškai susmulkinant per 200 μ m nerūdijančio plieno tinklėlį. Limfmazgių ląstelės du kartus plaunamos PBS pertekliumi ir 18 h nusodinamos 5 % trichloracto rūgšties (TCA) esant 4 °C (2). Nuosėdos vėl suspenduojamos 1 ml TCA ir suspensija supilama į scintiliacinius mėgintuvėlius, turinčius 10 ml scintiliacinio skysčio, kai reikia skaičiuoti H, arba tiesiai į mėgintuvėlius gama impulsams skaičiuoti, kai reikia nustatyti ^{125}I .

1.3.3.3 Ląstelių proliferacijos nustatymas (radioaktyviųjų junginių patekimas)

^3H -metiltimidino patekimas matuojamas skaičiuojant β scintiliacijas kaip skilimų skaičių per minutę (DPM). ^{125}I -joddeoksiuridino patekimas matuojamas skaičiuojant ^{125}I ir išreiškiamas kaip DPM. Atsižvelgiant į taikomą metodą, patekimas bus išreiškiamas DPM/-apdorotai grupei (jungtinis metodas) arba DPM/gyvūnui (atskirų gyvūnų metodas).

1.3.3.4 Stebėjimai**1.3.3.4.1 Klinikiniai stebėjimai**

Gyvūnai kruopščiai apžiūrimi kartą per dieną bet kokiems klinikiškiems požymiams (vietiniam dirginimui lašinimo vietoje arba sisteminiam toksiškumui) nustatyti. Visi pastebėjimai yra sistemingai registruojami apie kiekvieną atskirą gyvūną.

▼B

1.3.3.4.2 K ū n o m a s ė

Kaip nurodyta 1.3.3.1 skirsnyje, atskirai kiekvieno gyvūno masė nustatoma bandymo pradžioje ir po numatyto gyvūno nužudymo.

1.3.4 **Rezultatų apskaičiavimas**

Rezultatai išreiškiami kaip dirginimo rodiklis (Stimulation Index – SI). Taikant jungtinio apdorojimo metodą, SI gaunamas bendrą visos apdorotos grupės gautą radioaktyviųjų junginių patekimo dydį dalijant iš visai nešiklio kontrolinei grupei gauto patekimo dydžio; šis dalmuo yra vidutinė SI vertė. Taikant atskirų gyvūnų apdorojimo metodą, SI gaunamas dalijant kiekvienos bandomosios medžiagos grupės vidutinę DPM/gyvūnui vertę ir teigiamo poveikio kontrolinės grupės vidutinę DPM/gyvūnui vertę iš tirpiklio/nešiklio kontrolinės grupės vidutinės DPM/gyvūnui vertės. Taigi nešiklio kontrolinės grupės vidutinė SI vertė lygi 1.

Jei SI apskaičiuoti taikomas atskiro gyvūno metodas, galima daryti statistinę duomenų analizę. Pasirinkdamas tinkamą statistinės analizės metodą, tyrėjas turi suvokti netolygios sklaidos ir kitų susijusių problemų galimybę, dėl to gali tekti duomenis transformuoti arba taikyti neparametrinę statistinę analizę. Tinkamas būdas duomenims interpretuoti – įvertinti visus atskirus duomenis, gautus tiriant apdorotos grupės ir kontrolinės grupės, kurioje naudojamas nešiklis, gyvūnus, ir iš šių duomenų gauti geriausiai atitinkančią dozės ir reakcijos santykio kreivę, atsižvelgiant į pasikliautinuosius režius (8) (12) (13). Tačiau tyrėjas turi būti pasiruošęs galimiems atskirų grupės gyvūnų reakcijos „riktams“, ir dėl to gali tekti taikyti kitą reakcijos matą (pvz., medianinę, bet ne vidutinę vertę) arba pašalinti riktą.

Sprendžiant dėl teigiamos reakcijos, dirginimo rodiklis turi būti ≥ 3 , kartu būtina atsižvelgti į dozės ir reakcijos santykį ir, jei tinka, statistinį reikšmingumą (3) (6) (8) (12) (14).

Jei gauti rezultatai nėra visiškai aiškūs, reikėtų atsižvelgti į įvairias bandomosios medžiagos savybes, įskaitant tai, ar jos struktūra gimi-ninga žinomų odą jautrinančių medžiagų struktūrai, ar ji sukelia per didelį odos dirginimą, ir pasireiškusio dozės ir reakcijos santykio tipą. Šie ir kiti klausimai yra išsamiai aptarti kitur (7).

2. **DUOMENYS**

Duomenys turi būti suvesti į lenteles, kuriose nurodomos vidutinės bei atskiros DPM vertės ir dirginimo rodikliai, taikomi kiekvienos dozės grupei (įskaitant nešiklio kontrolinę grupę).

3. **ATASKAITOS RENGIMAS**3.1. **BANDYMŲ ATASKAITA**

Ataskaitą turi sudaryti ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

— identifikavimo duomenys (pvz., CAS numeris, jei yra; grynumas; žinomos priemaišos; siuntos numeris),

— fizikinė būseną ir fizikocheminės savybės (pvz., lakumas, stabilumas, tirpumas),

— jei mišinys, jo sudėtis ir komponentų procentinė dalis.

▼ B

Nešiklis:

- identifikavimo duomenys [grynumas; koncentracija (jei tinka); naudojamas tūris],
- nešiklio pasirinkimo pagrindimas.

Bandomo gyvūnai:

- naudota pelių veislė,
- gyvūno mikrobiologinė būseną, jei žinoma,
- gyvūnų šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.,
- gyvūnų skaičius, amžius ir lytis.

Bandymo sąlygos:

- išsami informacija apie bandomosios medžiagos ruošimą ir dėjimą,
- dozės koncentracijos pasirinkimo pagrindimas, įskaitant intervalo nustatymo tyrimo rezultatus, jei tyrimas buvo daromas; naudotos nešiklio ir bandomosios medžiagos koncentracijos vertės, suminis dedamos medžiagos kiekis,
- išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę (įskaitant pašaro tipą ar šaltinį, vandens šaltinį).

Patikimumo tikrinimas:

- paskutinės patikimumo patikros rezultatų santrauka, įskaitant informaciją apie medžiagą, koncentraciją ir naudojamą nešiklį,
- lygiagrečiai ir (arba) anksčiau bandymo laboratorijoje gauti teigiamo ir neigiamo poveikio kontroliniai duomenys.

Rezultatai:

- atskirų gyvūnų masė dozės gavimo ir numatyto nužudymo dieną,
- vidutinių DPM verčių (jungtinio apdorojimo metodas) ir atskirų verčių (atskiro apdorojimo metodas) lentelės, taikant abu metodus gautų verčių intervalas ir dirginimo rodikliai kiekvienos dozės grupei (įskaitant nešiklio kontrolinę grupę),
- statistinė analizė, jei tinka,
- toksiškumo atsiradimo laikas ir požymiai, įskaitant kiekvieno gyvūno odos dirginimą medžiagos uždėjimo vietoje, jei yra.

Rezultatų aptarimas:

- trumpas rezultatų, dozės ir reakcijos santykio analizės ir statistinės analizės, jei tinka, aiškinimas, padarant išvadą, ar bandomoji medžiaga turėtų būti laikoma odą jautrinančia medžiaga.

4. NUORODOS

- 1) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992). The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. Food and Chemical Toxicology 30, p. 165–169.
- 2) Kimber, I., Derman, R.J., Scholes E.W, and Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. Toxicology, 93, p. 13–31.
- 3) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C. A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Lovelless, S.E., Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. Journal of Toxicology and Environmental Health, 53, p. 563-79.
- 4) Testing Method B.6.

▼B

- 5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food and Chemical Toxicology*, 34, p. 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 and Chemical Toxicology*, 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 and Chemical Toxicology*. 36, p. 327–33.
- 8) Van Och, F.M.M, Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., 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. *Toxicology*, 146, p. 49–59.
- 9) 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. *Journal of Applied Toxicology*, 18, 281-4.
- 10) National Institute of Environmental Health Sciences (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. (<http://iccvam.niehs.nih.gov>).
- 11) Testing method B.4.
- 12) Basketter, D.A., Selbie, E., Scholes, E.W. Lees, D. Kimber, I. and Botham, P.A. (1993) Results with OECD recommended positive control sensitisers in the maximisation, Buehler and local lymph node assays. *Food and Chemical Toxicology*, 31, p. 63–67.
- 13) Basketter D.A., Lea L.J., Dickens A., Briggs D., Pate I., Dearman R.J., Kimber I. (1999). A comparison of statistical approaches to the derivation of EC₃ values from local lymph node assay dose responses. *J. Appl. Toxicology*, 19, p. 261–266.
- 14) Basketter DA, Blaikie L, Derman RJ, Kimber I, Ryan CA, Gerberick GF, Harvey P, Evans P, White IR and Rycroft RTG (2000). Use of local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* 42 , p. 344–48.

▼B**B.43. NEUROTOKSIŠKO POVEIKIO GRAUŽIKAMS TYRIMAS****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 neurotoksišką poveikį suaugusiems gyvūnams. Šį metodą galima derinti su egzistuojančiais bandymo metodais, darant kartotinės dozės toksiškumo tyrimus, arba daryti atskirą tyrimą. Rekomenduojama susipažinti su OECD neurotoksiškumo tyrimo strategijos ir metodų vadovu (1), kuris padėtų planuoti tyrimus, 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 neurotoksišką poveikį vystymuisi.

1.1 ĮVADAS

Vertinant cheminių medžiagų toksiškumo savybes, svarbu atsižvelgti į neurotoksiško poveikio galimybę. Jau kartotinės dozės bandymų metode sisteminiam toksiškumui nustatyti vykdomi galimo neurotoksiškumo stebėjimai. Šis bandymo metodas gali būti taikomas planuojant tyrimą, kuris leistų gauti papildomos informacijos arba patvirtinti neurotoksišką poveikį, pastebėtą kartotinės dozės sisteminio toksiškumo tyrimuose. 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 tyrimus. Tai galėtų būti, pvz.:

— neurologinių požymių arba neuropatologinių pažeidimų stebėjimas, darant kitus nei kartotinės dozės sisteminio toksiškumo tyrimus; 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 nuorojoje (1).

Šis metodas buvo kuriamas taip, kad jį būtų galima pritaikyti konkrečioms poreikiams, norint patvirtinti specifinį cheminės medžiagos histopatologinį neurotoksiškumą ir jos neurotoksiškumą, veikiantį elgseną, be to, apibūdinti ir kiekybiškai įvertinti neurotoksišką poveikį.

▼B

Anksčiau neurotoksiškumas buvo prilyginamas neuropatijai, esant neuropatologiniams pažeidimams arba neurologiniams funkcijų sutrikimams, pvz., konvulsijos, paralyžius arba drebulys. Nors neuropatija yra svarbus neurotoksiškumo pasireiškimas, dabar paaiškėjo, kad yra daug kitų toksiško poveikio nervų sistemai požymių (pvz., motorinės koordinacijos netekimas, jutimo trūkumai, mokymosi ir atminties sutrikimai), kurių galima nepastebėti darant neuropatologinius arba kitų tipų tyrimus.

Šis neurotoksiškumo bandymo metodas skirtas nustatyti pagrindinį neurobiheavioristinį 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 toksiškumo tipų duomenimis. Šiam metodui numatytus bandymus neurotoksiškam 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).

Neurotoksiškos medžiagos gali veikti įvairias nervų sistemos vietas ir įvairiais veikimo mechanizmais. Kadangi joks vienas bandymų rinkinys negali 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 tyrimo strategijos ir metodų vadove (1), siekiant parengti tyrimus, skirtus papildomai apibūdinti dozės ir reakcijos santykį arba padidinti jo kiekybinio įvertinimo jautrumą, kad būtų galima geriau įvertinti nesančio neigiamo poveikio lygį arba pateikti neginčijamų įrodymų apie žinomus arba spėjamus cheminės medžiagos keliamus pavojus. Pvz., galima parengti tyrimus neurotoksiškumo mechanizmui (-ams) identifikuoti ir įvertinti arba papildyti duomenis, kurie jau buvo gauti taikant bazinės elgesio ir neuropatologinių stebėjimų metodikas. Darant tokius tyrimus 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 tyrimas, daromas atskirai arba kartu su kitais tyrimais, suteikia informacijos, kuri leidžia:

— identifikuoti, ar nervų sistema yra visam laikui arba grįžtamai veikiamą bandomąja chemine medžiaga;

— papildomai apibūdinti nervų sistemos pakitimus, susijusius su cheminės medžiagos veikimu, ir suprasti veikiančio mechanizmo esmę;

▼ B

— nustatyti dozės ir reakcijos bei laiko ir reakcijos santykius, kad būtų galima įvertinti nesančio neigiamo poveikio lygį (kuris gali būti naudojamas nustatant cheminės medžiagos saugos kriterijus).

Taikant šį bandymo metodą, bandomoji medžiaga duodama per burną. Kiti medžiagos davimo būdai (pvz., per odą arba įkvepiant) gali būti tinkamesni ir gali tekti keisti rekomenduojamas metodikas. Davimo būdo pasirinkimas priklauso nuo žmonių veikimo aplinkybių ir turimos informacijos apie toksikologiją ir kinetiką.

1.2 SAVOKOS

Neigiamas poveikis – bet koks su apdorojimu susijęs pakitimas palyginti su etalonu, mažinantis organizmo gebą išgyventi, daugintis arba prisitaikyti prie aplinkos.

Dozė – skirtas bandomosios medžiagos kiekis. Dozė išreiškiama bandomosios medžiagos mase bandymo 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 neurotoksiškumą.

NOAEL – nesančio neigiamo poveikio lygio santrumpa, ir tai yra didžiausia dozė, kai nėra su apdorojimu susieto neigiamo poveikio.

1.3 BANDYMO METODO ESMĖ

Bandomoji cheminė medžiaga duodama kelioms laboratorinių graužikų grupėms per burną, 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 tyrimą. 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) tyrimas neurotoksiškumui aptikti arba neurotoksiškam poveikiui apibūdinti, kiekvienos grupės gyvūnai, kurie nebuvo panaudoti perfuzijai ir vėlesniam histopatologiniam tyrimui (žr. 1 lentelę), gali būti naudojami darant specialius elgesio tyrimo, neuropatologinius, neurocheminius arba elektrofiziologinius tyrimus, kuriais galima būtų papildyti duomenis, gautus darant šiame bandymo metode numatytus tipinius tyrimus (1). Šie papildomi tyrimai 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 tyrimų metodus.

▼B

Kai šis bandymo metodas vykdomas kartu su kitais bandymo metodais, reikia turėti pakankamą gyvūnų skaičių norint vykdyti abiem tyrimams 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 be vados 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 dėl to kai tyrimas daromas kartu su kitais tyrimais, šį amžiaus reikalavimą gali tekti keisti. Naudojamų gyvūnų masė ir vidutinė kiekvienos lyties masė tyrimo pradžioje neturi skirtis daugiau kaip $\pm 20\%$. Kai prieš ilgalaikį tyrimą daromas trumpalaikis kartotinės dozės tyrimas, abiem tyrimams turi būti naudojami tos pačios veislės ir šaltinio gyvūnai.

1.4.2 Laikymo ir šėrimo sąlygos

Eksperimentinių gyvūnų patalpos temperatūra turėtų būti $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nors santykinė oro drėgmė turėtų būti mažiausiai 30% ir pageidautina ne didesnė kaip 70% , išskyrus patalpos plovimo laiką, reikėtų užtikrinti $50\text{--}60\%$. Apšvietimas turi būti dirbtinis, esant 12 h šviesos ir 12 h tamsos sekai. Reikia kiek įmanoma mažinti didelį su pertrūkiais 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 apdorojimo ir kontrolines 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 tyrimo pradžią, kad galėtų priprasti prie laboratorinių sąlygų.

1.4.4 Davimo būdas ir dozių ruošimas

Taikant šį bandymo metodą, bandomoji medžiaga duodama per burną. Duoti per burną galima naudojant zondą, su pašaru, su geriamuoju vandeniu arba duodant kapsules. Galima naudoti kitus davimo būdus (pvz., per odą arba įkvepiant), bet tada gali tekti keisti rekomenduojamas metodikas. Davimo būdo pasirinkimas priklauso nuo poveikio žmonėms aplinkybių ir turimos informacijos apie toksikologiją ar kinetiką. Reikia pagrįsti davimo būdo pasirinkimą ir nurodyti dėl to daromus šio bandymo metodo procedūrų pakeitimus.

▼B

Prireikus bandomoji medžiaga ištirpinama arba suspenduojama tinkamame nešiklyje. Rekomenduojama 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 toksiškumo savybės. Be to, reikėtų atsižvelgti į šias nešiklio charakteristikas: poveikį absorbcijai, pasiskirstymui, medžiagų apykaitai ir bandomosios medžiagos sulai-kymui, dėl ko gali keistis bandomosios medžiagos cheminės savybės; poveikį maisto ar vandens suvartojimui arba gyvūnų įmitimui.

1.5 DARBO EIGA

1.5.1 Gyvūnų skaičius ir lytis

Darant atskirą tyrimą 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 tyrimą 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 neurotoksiško poveikio požymiai pasireiškia tik ribotam tam tikros dozės grupės gyvūnų skaičiui, reikėtų numatyti šiuos gyvūnus įtraukti į pasirinktųjų perfuzijai gyvūnų skaičių. Kai tyrimas daromas kartu su kartotinės dozės toksiškumo tyrimu, abiejų tyrimų tikslams pasiekti turi būti naudojamas atitinkamas gyvūnų skaičius. Įvairiems tyrimų deriniams reikalingas mažiausias gyvūnų skaičius grupėje pateiktas 1 lentelėje. Jei numatomi tarpiniai nužudymai arba planuojama sudaryti grupes poveikio grįžtamumui, jo išsilaikymui arba po apdorojimo vėluojančiam toksiškam 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 Apdorotos ir kontrolinės grupės

Paprastai turi būti naudojamos mažiausiai trijų 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 tyrimą, siekiant palengvinti naudojamos dozės pasirinkimo kelią. Kontrolinės grupės gyvūnai prižiūrimi kaip ir medžiagą gaunančių grupių gyvūnai, išskyrus tai, kad jie neapdorojami bandomąja medžiaga. Jei duodant bandomąją medžiagą naudojamas nešiklis, kontrolinė grupė turi gauti didžiausią naudojamą nešiklio tūrį.

1.5.3 Patikimumo tikrinimas

Tyrimą daranti laboratorija turi pateikti duomenis, įrodančius jos kompetenciją atlikti tyrimą ir naudojamų metodikų jautrumą. Tokie duomenys turi patvirtinti įrodymus dėl sugebėjimo rasti ir prireikus kiekybiškai įvertinti stebėti skirtų skirtingų parametrų pakitimus, pvz., autonominių požymių, jutiminio aktyvumo, grybšnio jėgos ir motorinio aktyvumo. Informacija apie chemines medžiagas, kurios sukelia įvairių tipų nerotoksišką 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.

▼B**1.5.4 Dozės pasirinkimas**

Dozės koncentracijos vertes reikėtų pasirinkti atsižvelgiant į visus anksčiau gautus toksiškumo ir kinetinius duomenis apie bandomąją medžiagą arba giminę medžiagą. Didžiausia dozė turėtų būti pasirinkta siekiant sukelti neurotoksišką poveikį arba aiškų sisteminių toksišką poveikį. Vėliau turėtų būti pasirinkta mažėjanti dozės koncentracijos seka siekiant parodyti kiekvieną su dozės dydžiu susietą reakciją ir nesančio neigiamo poveikio lygį (NOAEL), atitinkančią mažiausią dozę. Iš esmės turėtų būti nustatyti tokių dozių dydžiai, kad būtų įmanoma atskirti pirminį toksišką 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 poveikio žmonėms duomenų, į tai irgi reikia atsižvelgti.

1.5.5 Ribinis bandymas

Jei darant bandymą pagal šiame tyrime aprašytas metodikas su viena mažiausiai 1 000 mg/kg kūno masės/parą doze neurotoksiškas poveikis nepastebimas arba jei toksiško poveikio nelaukiama, atsižvelgiant į turimus duomenis apie giminę struktūros junginius, nėra nebūtina daryti visą tyrimą, naudojant tris dozių koncentracijas. Atsižvelgiant į laukiamą poveikį žmonėms gali tekti naudoti didesnes per burną duodamas ribinio bandymo dozes. Kalbant apie kitus davimo būdus, pvz., įkvėpimą arba veikimą per odą, bandomosios medžiagos fizikocheminės savybės dažnai gali apibrėžti didžiausią pasiekiamą veikimo koncentraciją. Darant ūmaus poveikio per burną tyrimą ribinio bandymo dozė turi būti mažiausiai 2 000 mg/kg.

1.5.6 Dozių davimas

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 sunkesnę 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 tyrimą daromas kartotinės dozės tyrimas, darant abu tyrimus turi būti naudojamas panašus pašaras. Jei darant ūmaus toksiškumo tyrimus neįmanoma duoti vienkartinę dozę, ji gali būti duodama mažesnėmis dalimis ne ilgiau kaip per 24 h.

▼B

1.6 STEBĖJIMAI

1.6.1 **Stebėjimų ir bandymų dažnumas**

Darant kartotinės dozės tyrimus, stebėjimo laikotarpis turi atitikti dozavimo laikotarpį. Darant ūmaus toksiškumo tyrimus, stebima 14 parų po medžiagos davimo. Pagalbinių grupių gyvūnai, kurie negauna bandomosios medžiagos pasibaigus apdorojimo laikotarpiui, irgi turi būti stebimi tokį laikotarpį.

Stebėjimai turi būti daromi pakankamu dažniu siekiant kiek įmanoma padidinti tikimybę aptikti bet kokių elgesio ir (arba) neurologines anomalijas. Reikėtų stebėti kasdien vienodu laiku, atsižvelgiant į didžiausio laukiamo poveikio pasireiškimo laiką po medžiagos davimo. Klinikinių stebėjimų ir funkcinių bandymų dažnis apibendrintas 2 lentelėje. Jei ankstesniuose tyrimuose gauti kinetiniai duomenys rodo, kad stebėjimų, bandymų arba stebėjimų po bandymų 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 apžiūrėti 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 tyrimo 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 dydis. Klinikiniai stebėjimai turi apimti odos, kailio, akių, gleivinių, sekrecijų ir ekskrecijų dažnį ir autonominį aktyvumą (pvz., ašarojimą, drebulį, vyzdžių dydį, neįprastą kvėpavimą ir (arba) kvėpavimą per burną, visus neįprastus šlapinimosi arba tuštinimosi požymius, šlapimo išblukimą), tačiau neapsiriboti vien tuo.

▼B

Turi būti pažymėta bet kokia neįprasta reakcija dėl kūno padėties, aktyvumo lygio (pvz., naudojimosi tipiniu plotu sumažėjimas arba padidėjimas) ir judesių koordinacijos. Užrašomi eisenos (pvz., krypuojanti eiseną, 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 laižymas, 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, funkcinį bandymų dažnumas priklauso nuo tyrimo trukmės (žr. 2 lentelę). Be 2 lentelėje nustatytų stebėjimo laikotarpių, turėtų būti daromi funkciniai pagalbinių grupių sveikimo stebėjimai kiek įmanoma prieš pat numatytą nužudymą. 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. Kitos metodikų detalės pateiktos atitinkamose nuorodose. Jei nėra duomenų (pvz., informacijos apie struktūros ir aktyvumo santykį, epidemiologinių duomenų, kitų toksikologinių tyrimų), kurie rodytų galimą neurotoksišką poveikį, reikėtų numatyti ištraukti labiau specializuotus jutiminės ir motorinės funkcijos arba mokymo ir atminties bandymus šiam poveikiui išsamiau ištirti. Daugiau informacijos apie specializuotus bandymus pateikta (1).

Išimtiniais atvejais funkcinį bandymų su gyvūnais galima nedaryti, jei gyvūnams pasireiškia tokio laipsnio toksiškumo požymiai, koks labai trukdytų tyrimui. Sprendimas neįtraukti gyvūnų į funkcinį bandymą turi būti pagrįstas.

1.6.2 **Kūno masė ir pašaro ar vandens suvartojimas**

Jei tyrimai 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 tyrimus, 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.

▼B**1.6.3 Oftalmologiniai tyrimai**

Jei tyrimas trunka ilgiau kaip 28 paras, prieš bandomosios medžiagos davimą ir pasibaigus tyrimui 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 tyrimus, akys tiriamos po 13 savaičių. Oftalmologinių tyrimų daryti nebūtina, jei šie duomenys yra gauti darant kitus panašios trukmės ir panašaus dydžio dozių tyrimus.

1.6.4 Hematologiniai ir klinikiniai biocheminiai tyrimai

Kai neurotoksiškumo tyrimas daromas kartu su kartotinės dozės sisteminio toksiškumo tyrimu, hematologiniai tyrimai ir klinikiniai biocheminės analizės daromos taip, kaip nurodyta atitinkamame sisteminio toksiškumo tyrimo metode. ūminius 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 tyrimo *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 tyrimas daromas kaip atskiras tyrimas neutoksiškoms medžiagoms atrinkti arba neurotoksiškam 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 tyrimų 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 mėginiai. Be to, klinikiniai požymiai gali nurodyti papildomas tyrimo 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).

▼B

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, vidurinėsios 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 tyrimus.

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 žuvusių arba dėl humanišku priežasčių nužudytų gyvūnų skaičius, toksiškumo požymių turinčių gyvūnų skaičius, stebimų toksiškumo požymių aprašymas, įskaitant bet kokio toksiško poveikio pradžios laiką, trukmę, tipą ir sunkumą, pažeidimų turinčių gyvūnų skaičius, įskaitant pažeidimo (-ų) tipą ir sunkumą.

▼B**2.2 REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS**

Tyrimo 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 tyrimo planą.

3. ATASKAITOS RENGIMAS**3.1. BANDYMŲ ATASKAITA**

Bandymų ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

- fizinė būseną (įskaitant izomerizavimą, grynumą ir fizikochemines savybes),
- identifikavimo duomenys.

Nešiklis (jei naudojamas):

- nešiklio pasirinkimo pagrindimas.

Bandomi 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 dėvimą į maistą, gautą koncentraciją, preparato stabilumą ir vienalytiškumą,
- duodamos dozės specifikacija, įskaitant išsamią informaciją apie nešiklį, duodamos medžiagos turį ir fizikinį pavidalą,
- bandomosios medžiagos davimo būdo detalės,
- 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,

▼B

- 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,
- 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 nužudant,
- 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,
- skrodimo 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 koku 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 Guidance 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.

▼ **B**

- 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. *Neurotoxicol. 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 Practice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

1 lentelė

Mažiausias gyvūnų skaičius vienoje grupėje darant neurotoksiškumo tyrimą atskirai arba kartu su kitais tyrimais

	NEUROTOKSIŠKUMO TYRIMAS, DARYTAS KAIP:			
	atskiras tyrimas	tyrimas, daromas kartu su 28 parų tyrimu	tyrimas, daromas kartu su 90 parų tyrimu	tyrimas, daromas kartu su lėtinio toksiškumo tyrimu
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 bandymui, 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 <i>in situ</i> 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/pusiaus lėtinio/lėtinio toksiškumo stebėjimui, hematologiniam, klinikiniam biocheminiam, histopatologiniam ir t. t. tyrimui, kaip nurodyta atitinkamose rekomendacijose, skaičius		5 patinai ir 5 patelės	10 patinų † ir 10 patelių †	20 patinų † ir 20 patelių †
Papildomi stebėjimai, jei reikia	5 patinai ir 5 patelės			

† įskaitant penkis gyvūnus, atrinktus funkciniam bandymui ir nuodugniems klinikiniams stebėjimams, kurie yra neurotoksiškumo tytimo dalis

▼B

2 lentelė

Klinikinių stebėjimų ir funkcinių bandymų dažnumas

Stebėjimų tipas		Tyrimo 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 funkciniam stebėjimams	Nuodugnūs klinikiniai stebėjimai	— prieš pirmą veikimą — po 8 h nuo dozės davimo, didžiausio numatomo poeikio momentu — 7 ir 14 parų 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 bandymai	— prieš pirmą veikimą — po 8 h nuo dozės davimo, didžiausio numatomo poeikio momentu — 7 ir 14 parų po dozės davimo	— prieš pirmą veikimą — ketvirtą apdorojimo savaitę, ku 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

▼B**B.44. SUGERTIS PER ODA. *IN VIVO* METODAS****1. METODAS**

Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 427 (2004).

1.1 ĮVADAS

Dauguma cheminių medžiagų veikia iš esmės per odą, o atliekant didesnę dalį toksikologinių tyrimų su laboratoriniais gyvūnais, medžiagos dozė duodama oraliniu būdu. Šioje rekomendacijoje aprašytas *in vivo* sugerties per odą tyrimas užtikrina sąsają, kuri yra būtina tyrimų per burną duomenims ekstrapoliuoti, kai daromi veikimo 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 jūros 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 tyrimų vykdymo (2), kuris padėtų pasirinkti konkrečiam atvejui tinkamiausią metodą, kadangi šiame dokumente pateikta daugiau detalių 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 tiktį *in vitro* sugerties per odą tyrimai, būna atvejų, kai reikiamus duomenis galima gauti tik atliekant *in vivo* tyrimą.

Prie *in vivo* metodo pranašumų reikėtų priskirti tai, kad jame naudojama fiziologiniu ir medžiagų apykaitos požiūriu vientisa sistema, naudojamos daugumai toksiškumo tyrimų įprastos rūšys, be to, metodą galima modifikuoti pritaikant jį kitoms rūšims. Trūkumai: gyvū gyvūnų naudojimas, būtinybė naudoti žymėtąsias medžiagas, kad rezultatai būtų patikimi, sunkumai nustatant ankstyvąją sugerties tarpsnį ir tinkamiausios 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.

▼ **B**

1.2 SĄVOKOS

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

Vienos arba kelių tinkamo dydžio dozių bandomoji medžiaga, geriau žymėtoji, dedama 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 nuriimo. 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 tyrime paprastai naudojamos kelios gyvūnų grupės, veikiamos bandomuoju preparatu. Viena grupė nužudoma pasibaigus veikimo laikotarpiui. Kitos grupės nužudomos vėliau pagal nustatytą laiko grafiką (2). Pasibaigus bandinių ėmimo laikui, nužudomi 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.

▼B**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 nužudoma, 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 ($\pm$ 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 plaukamas acetonu odos riebalams pašalinti. Papildomai plauti muilu ir vandeniui 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 cm² odos, pageidautina ne mažesnis kaip 10 cm². 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 žymėtąją bandomąją medžiagą.

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), kuriuo gali būti veikiami žmonės arba kitos galimos tikslinės rūšys. Visi nukrypimai nuo 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.

▼B

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 potencialiai žmonėms naudojamą kiekį, dažniausiai 1– 5 mg/cm² kietosios medžiagos arba mažiau kaip 10 µl/cm² skysčio. Visas kitas dozes reikia pagrįsti numatomomis naudojimo sąlygomis, tyrimo 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 nepriimtina 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 nereaguotų 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 veikimo trukme. Pasibaigus veikimo laikotarpiui, gyvūnai laikomi medžiagų apykaitos matavimo narveliuose iki jie nužudomi pagal grafiką. Visą tyrimo 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 tyrimo laikotarpį turi būti įmanoma medžiagų apykaitos matavimo narveliuose atskirai rinkti susikaupiančius šlapimą ir išmatas. Be to, turi būti įmanoma rinkti ¹⁴C žymėtą anglies dioksidą ir lakiuosius ¹⁴C žymėtus anglies junginius, kurie turi būti analizuojami, jei susidaro didelis jų kiekis (> 5 %). Šlapimas, išmatos ir sugerčiai (pvz., ¹⁴C žymėto anglies dioksido ir lakiųjų ¹⁴C 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 tyrimo etapams, į atskirus narvelius, ant jų apdorotos vietos uždedamas naujas jai apsaugoti skirtas apdangalas.

▼B**1.4.9 Baigiamosios procedūros**

Atskiri kiekvienos grupės gyvūnai nužudomi 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 nužudymo) nuimami visi apsauginiai apdangalai. Žiurkės oda uždėjimo vietoje ir aplink ją esančios odos žiedas išpjauamas 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 pradėdant 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 nužudymo pagal grafiką, turi būti supilamas kartu su anksčiau surinktu šlapimu. Iš medžiagų apykaitos tyrimo narvelių surinkus išmatas po nužudymo pagal grafiką, narvelius ir jų gaudyklės reikia išplauti atitinkamu tirpikliu. Panašiu būdu turi būti analizuojama kita potencialiai užteršta įranga.

1.4.10 Analizė

Visuose tyrimuose 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,

▼B

- 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:

- identifikavimo duomenys [pvz., CAS numeris, jei žinomas; šaltinis; grynumas (radiocheminis grynumas); žinomos priemaišos; siuntos numeris],
- fizikinė būseną ir fizikocheminės savybės (pvz., pH, lakumas, tirpumas, stabilumas, molekulinė masė ir $\log P_{\text{ov}}$).

Bandomasis preparatas:

- sudėtis ir naudojimo pagrindimas,
- bandomojo preparato detalės, uždedamas kiekis, koncentracija, tirpiklis, stabilumas ir vienalytiškumas.

Bandymo gyvūnai:

- naudota rūšis/veislė,
- skaičius, amžius ir lytis,
- šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.,
- atskirų gyvūnų kūno masė bandymo pradžioje.

Bandymo sąlygos:

- bandomojo preparato uždėjimo detalės (uždėjimo vieta, mėginių ėmimo metodai, sandarus/nesandarus apdangalas, tūris, ekstrahavimas, aptikimas),
- pašaro ir vandens kokybės detalės.

Rezultatai:

- visi toksiškumo požymiai,
- sugerties duomenys (išreikšti kaip greitis, kiekis arba procentinė dalis), pateikiami lentelėse,

▼B

- suminiai per bandymą regeneruoti kiekiai,
- rezultatų interpretavimas, lyginimas su visais turimais bandomojo junginio sugerties per odą duomenimis.

Rezultatų aptarimas.

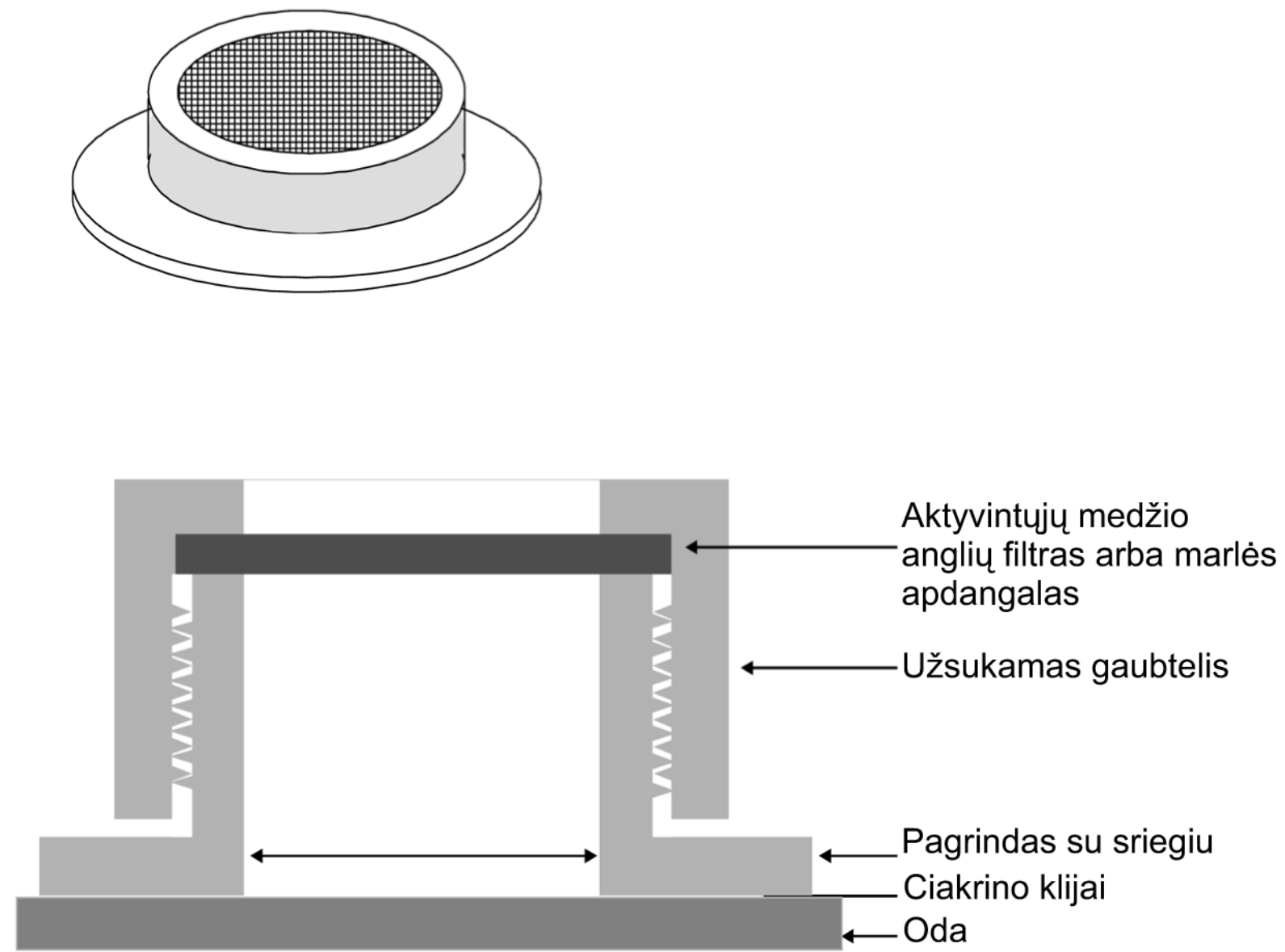
Išvados.

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, Pesticides and Toxic Substances.
- 8) Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in rhesus 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.

▼B*1 paveikslas*

Tipinio įtaiso, naudojamo uždėjimo ant odos vietai apibrėžti ir apsaugoti, atliekant *in vivo* sugerties per odą tyrimus, konstrukcijos pavyzdys



▼B**B.45. SUGERTIS PER ODA. *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 tyrimų vykdymo (2), kuris padėtų planuoti šiuo metodu pagrįstus tyrimus. 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 tyrimai 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 tyrimą *in vivo* duomenimis. Reikėtų ieškoti informacijos rekomendaciniame dokumente (2) toliau tikslinti aplinkybes, kuriomis tiktų *in vitro* metodas. Papildoma detali informacija 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.

▼B

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 dvi 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 detaliau įvertinti duomenis, įskaitant bandomosios medžiagos pasiskirstymą ir regeneravimo laipsnį.

Norint įrodyti tyrimų 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.

▼B**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, anatomicinė 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 žymėtąją bandomąją medžiagą.

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, kuriuo gali būti veikiami žmonės arba kitos galimos tikslinės rūšys. Visi nukrypimai nuo preparato naudojimo sąlygų turi būti pagrįsti.

▼ **B****1.4.7 Bandomųjų medžiagų koncentracijos vertės ir preparatai**

Paprastai naudojamos kelios bandomosios medžiagos koncentracijos vertės, į kurių diapazoną patenka viršutinės galimo žmonių veikimo vertės. Be to, reikėtų numatyti tipinės sudėties preparatų bandymą.

1.4.8 Uždėjimas ant odos

Paprastai, kai žmonės veikiami cheminėmis medžiagomis, šių medžiagų dozės yra ribotos. Todėl naudojamas kiekis paprastai turėtų kartoti galimą žmones veikiantį kiekį, dažniausiai 1 – 5 mg/cm² kietosios medžiagos arba mažiau kaip 10 µl/cm² skysčio. Kiekį reikia pagrįsti numatomomis naudojimo sąlygomis, tyrimo 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 veikama bandomuoju preparatu visą bandymo trukmę arba trumpiau (t. y. kartoti konkretų žmonių veikimo tipą). 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 prasiskverbiantis 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 jungę, bei į *stratum corneum*, epidermį ir odą atskirai analizei atlikti.

1.4.12 Analizė

Visuose tyrimuose 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.

▼ B**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 tyrimui bandomoji medžiaga lieka odoje, šį kiekį gali tekti įtraukti į suminį sugertos medžiagos kiekį (žr. 3 nuorodos 66 skirsnį). Kai oda veikiama neribota doze, duomenų gali pakakti skvarbos konstantai (K_p) 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 būseną, fizikocheminės 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 būseną, naudojimo pagrindimas,
- kameros konstrukcija, rinktuvo skysčio sudėtis, rinktuvo skysčio srautas arba mėginių ėmimo laikas ir procedūros,
- bandomojo preparato uždėjimo detalės 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,

▼B

- 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 lentelės 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**

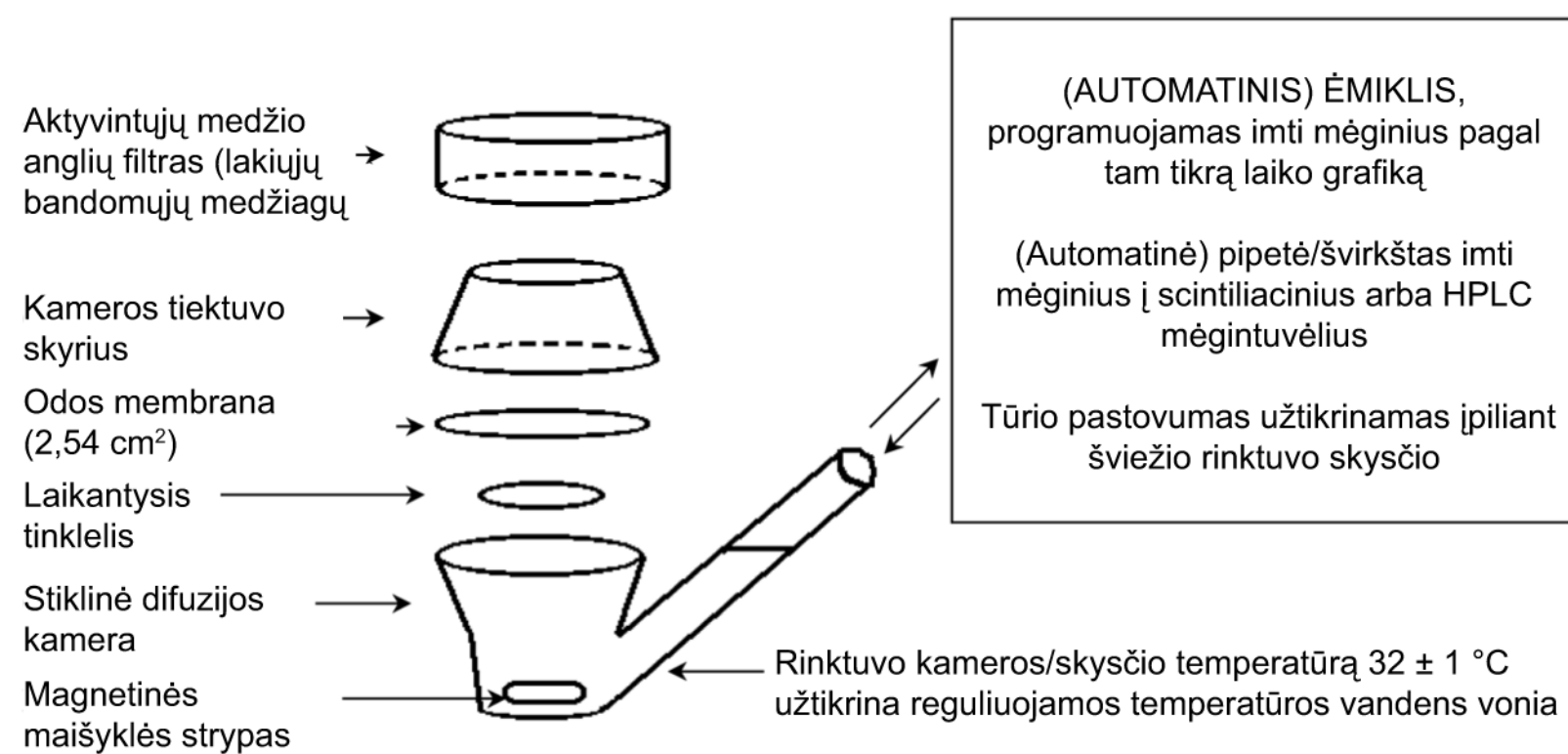
- 1) Testing Method B.44. Skin Absorption: *In vivo* Method.
- 2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD. Paris.
- 3) OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, 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.

▼ B

- 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 tyrimams atlikti konstrukcijos pavyzdys



▼ **M1****B.46. IN VITRO ODOS DIRGINIMAS. REKONSTRUOTO ŽMOGAUS EPIDERMIO MODELIO BANDYMAS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Odos dirginimu vadinama grįžtamoji odos pažeida po bandomosios medžiagos uždėjimo ne ilgiau kaip 4 valandoms [kaip apibrėžta Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemoje (GHS)](1). Šis bandymo metodas apima *in vitro* procedūrą, pagal kurią, atsižvelgiant į informacijos reikalavimus, galima nustatyti cheminių medžiagų gebą dirginti odą atliekant atskirą pakaitinį bandymą kaip bandymų strategijos dalį, taikant įrodomosios vertės nustatymo metodą (2).

Odos dirginimas paprastai buvo vertinamas naudojant laboratorinius gyvūnus (žr. B.4 metodą)(3). Rūpinantis gyvūnų gerove, B.4 metodu galima nustatyti esdinamąjį 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 esdinimo bandymams tinka trys patvirtinto tinkamumo *in vitro* bandymų metodai ar bandymų rekomendacijos: B.40, B.40bis ir TG 435 (4, 5, 6).

Šis bandymo metodas yra pagrįstas rekonstruoto žmogaus epidermio modeliais, kurių bendroji schema (kaip ląstelių šaltinis naudojami žmogaus epidermio keratinocitai, reprezentatyvusis audinys ir citoarchitektūra) labai artima žmogaus odos viršutinių dalių, t.y., epidermio biocheminėms ir fiziologinėms savybėms. Taikant šiame bandymo metode aprašytą procedūrą galima identifikuoti JT GHS 2 kategorijos dirginančių medžiagų pavojų. Be to, į šį bandymo metodą įtrauktas naudojimo charakteristikų standartų rinkinys, skirtas įvertinti panašius ir modifikuotus bandymo metodus, pagrįstus rekonstruoto žmogaus epidermio tyrimu (7).

Buvo atlikti dviejų *in vitro* bandymo metodų (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17), kuriuos galima pirkti kaip *EpiSkin*TM ir *EpiDerm*TM, pradinio tinkamumo patvirtinimo, optimizavimo ir tinkamumo patvirtinimo tyrimai, naudojant rekonstruoto žmogaus epidermio modelius. Šios nuorodos pateiktos remiantis R.38. Tam tikri perskaičiavimo aspektai, taikytini pagal GHS, aptariami 25 nuorodoje. Metodus, kurių naudojimo charakteristikos atitinka *EpiSkin*TM (patvirtinto tinkamumo 1-ojo pamatinio metodo) naudojimo charakteristikas, rekomenduojama naudoti kaip atskirus pakaitinius traušius *in vivo* bandymo metodus GHS 2 kategorijos dirginančioms cheminėms medžiagoms klasifikuoti. Metodus, kurių naudojimo charakteristikos atitinka *EpiDerm*TM (patvirtinto tinkamumo 2-ojo pamatinio metodo) naudojimo charakteristikas, rekomenduojama naudoti tik kaip atrankos bandymo metodus arba kaip nuosekliosios bandymų strategijos dalis taikant įrodomosios vertės nustatymo metodą GHS 2 kategorijos dirginančioms cheminėms medžiagoms klasifikuoti. Prieš taikant siūlomą *in vitro* rekonstruoto žmogaus epidermio modelio bandymą reglamentavimo tikslais, reikėtų nustatyti jo patikimumą, tinkamumą (tikslumą) ir siūlomo naudojimo apribojimus, siekiant užtikrinti jo panašumą į patvirtinto tinkamumo 1-ąjį pamatinį metodą pagal šiame bandymo metode nustatytus naudojimo charakteristikų standartus (priedėlis).

▼ **M1**

Dviejų kitų *in vitro* rekonstruoto žmogaus epidermio bandymo metodų tinkamumas buvo patvirtintas pagal šio bandymo metodo reikalavimus, o gauti rezultatai buvo panašūs į patvirtinto tinkamumo 1-ojo pamatinio metodo rezultatus (18). Tai yra modifikuotas *EpiDerm*TM bandymo metodas (modifikuotas 2-asis pamatinis metodas) ir *SkinEthic RHE*TM bandymo metodas (1-asis *me-too* metodas).

1.2. APIBRĖŽTYS

Šiame bandymo metode taikomos šios 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 kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ tinkamų bandymo metodo rezultatų daliai išreikšti.

Partijos kontrolinė medžiaga – palyginamoji medžiaga, kurią naudojant gaunamas audinio ląstelių gyvybingumo atsako intervalo vidurkis.

Ląstelių gyvybingumas – parametras suminiam ląstelių populiacijos aktyvumui matuoti, pvz., ląstelių mitochondrinių dehidrogenazių geba redukuoti vitalinį dažiklį MTT ([3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolinio bromidą, tiazolilo mėlyną]), kuris, atsižvelgiant į galutinį matuojamą dydį ir taikomą bandymo schemą, yra susijęs su suminių ląstelių kiekiu ir (arba) jų gyvybingumu.

ET₅₀ – veikimo trukmė, per kurią ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % jas veikiant tam tikros pastovios koncentracijos cheminiu žymekliu, žr. taip pat IC₅₀.

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

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

Neribota dozė – ant odos dedamas bandomosios medžiagos kiekis, didesnis už kiekį, kurio reikia visiškai ir tolygiai uždengti odos paviršių.

GHS (Visuotinai suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklavimo 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, pavojaus pareiškimai, išpėjamieji 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), ES įgyvendinama Reglamentu (EB) Nr. 1272/2008.

IC₅₀ – cheminio žymeklio koncentracija, kuriai esant ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % (IC₅₀) praėjus nustatytai veikimo trukmei, žr. taip pat ET₅₀.

▼ **M1**

Naudojimo charakteristikų standartai – standartai, pagrįsti patvirtinto tinkamumo pamatiniu metodu, kuriuo grindžiamas siūlomo struktūriniu ir funkcinio požiūriu panašaus bandymo metodo palyginamumas. Įtraukti: I) esminiai bandymo metodo komponentai; II) trumpiausias sąrašas pamatinių cheminių medžiagų, atrinktų iš cheminių medžiagų, naudojamų įrodant patvirtinto tinkamumo pamatinio metodo priimtinas naudojimo charakteristikas; III) palyginamieji tikslumo ir patikimumo lygiai, pagrįsti gautais patvirtinto tinkamumo pamatiniame metodo duomenimis, kuriuos siūlomas bandymo metodas turėtų atitikti, kai yra vertinamas naudojant trumpiausią pamatinių cheminių medžiagų sąrašą.

Patikimumas – bandymo metodo, tam tikrą laiką taikomo laboratorijose ir tarp laboratorijų pagal tą patį protokolą atkuriamumo laipsnio matai. Patikimumas įvertinamas apskaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų.

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.

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.

Odos dirginimas – grįžtamosios odos pažaidos gavimas po bandomosios medžiagos uždėjimo ne ilgiau kaip 4 valandoms. Odos dirginimas yra vietinis neimunogeninis atsakas, kuris atsiranda netrukus po veikimo medžiaga (24). Jo pagrindinė savybė – grįžtamasis procesas vykstant uždegiminiams atsakams ir esant su uždegiminiu procesu susijusiems būdingiems klinikiams dirginimo požymiams (eritemai, edemai, niežėjimui ir skausmui).

1.3. TAIKYMO SRITIS IR APRIBOJIMAI

Rekonstruoto žmogaus epidermio bandymų, kuriems taikomas šis bandymo metodas, apribojimas yra tai, kad pagal juos tik JT GHS 2-osios kategorijos cheminės medžiagos klasifikuojamos kaip odos dirgikliai. Kadangi pagal šiuos bandymus medžiagų negalima priskirti papildomai 3-iajai kategorijai, kuri apibrėžta JT GHS, visos likusios medžiagos nebus klasifikuojamos (nėra kategorijos). Atsižvelgiant į kontrolės institucijų reikalavimus ir galimą naujų galutinių matuojamųjų dydžių įtraukimą, naujų *me-too* bandymų tobulinimą arba sukūrimą, šį bandymo metodą gali tekti persvarstyti.

Šiuo bandymo metodu galima identifikuoti vieno komponento dirginančių medžiagų pavojų (19), bet juo negalima gauti tinkamos informacijos apie odos ėsdinimą. Dujų ir aerozolių bandyti negalima, o mišiniai dar nėra įvertinti atliekant tinkamumo patvirtinimo tyrimą.

1.4. BANDYMO METODO PRINCIPAS

Bandomoji cheminė medžiaga uždedama ant trijų matmenų rekonstruoto žmogaus epidermio modelio, sudaryto iš normalių žmogaus odos keratinocitų, kurie buvo auginami, kad galėtų būti gautas daugiasluoksnis labai gerai diferencijuotas žmogaus epidermio modelis. Jį sudaro suformuoti pamatinis, dygliuotasis ir grūdėtasis sluoksniai ir daugiasluoksnis *stratum corneum*, turintis tarpląstelinį žvynelių pavidalo lipidų sluoksnį, kurių struktūra yra analogiška *in vivo* nustatyti struktūrai.

▼ **M1**

Rekonstruoto žmogaus epidermio modelio bandymas pagrįstas prielaida, kad dirginančios cheminės medžiagos gali prasiskverbti per *stratum corneum* difuzijos būdu ir kad jos yra citotoksinės po juo esančių sluoksnių ląstelėms. Ląstelių gyvybingumas matuojamas dehidrogenazėmis redukuojant vitalinį dažiklį MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolinio bromidą, tiazolilo mėlyną]; EINECS numeris 206–069–5, CAS numeris 298–93–1)] į mėlyną formazano druską, kuri kiekybiškai nustatoma ją ekstrahavus iš audinių (20). Dirginančios medžiagos identifikuojamos pagal jų gebą sumažinti ląstelių gyvybingumą iki mažesnio nei nustatytas ribinio lygio (*t. y.* ≤ 50 % JT GHS 2-osios kategorijos dirginančioms medžiagoms). Medžiagos, kurių atveju gaunamas didesnis nei nustatyto ribinio lygio ląstelių gyvybingumas, nebus klasifikuotos (*t. y.* > 50 %, nėra kategorijos).

Rekonstruoto žmogaus epidermio modelio sistemos gali būti naudojamos kietosioms medžiagoms, skysčiams, pusiau kietoms medžiagoms ir vaškams bandyti. Skysčiai gali būti vandeniniai arba nevandeniniai; kietosios medžiagos gali būti tirpios arba netirpios vandenyje. Jei įmanoma, kietąsias medžiagas reikėtų bandyti smulkių miltelių pavidalu. Kadangi į rekonstruoto žmogaus epidermio modelio sistemų tinkamumo patvirtinimo tyrimą buvo įtrauktos 58 kruopščiai parinktos cheminės medžiagos, reprezentuojančios įvairias cheminių junginių klases, manoma, kad aptariamieji metodai iš esmės tinka visoms cheminių junginių klasėms (16). Į tinkamumo patvirtinimo tyrimą įtraukta 13 GHS 2-osios kategorijos medžiagų. Reikėtų pabrėžti, kad antikorozinės rūgštys, bazės, druskos ir kitos neorganinės medžiagos nebuvo įtrauktos į tinkamumo patvirtinimo tyrimą. Kai kurios žinomos organinių medžiagų klasės, tokios kaip hidroperoksidai, fenoliai ir aktyviosios paviršiaus medžiagos, taip pat nebuvo įtrauktos į tyrimą arba įtrauktos tik iš dalies.

1.5. BANDYMŲ KOKYBĖS ĮRODYMAS

Prieš pradėdamos įprastu būdu taikyti patvirtinto tinkamumo metodą, kuris susietas su šiuo bandymo metodu, laboratorijos gali pareikšti norą įrodyti techninę kvalifikaciją, naudodamos dešimt cheminių medžiagų, rekomenduotų 1 lentelėje. Pagal šį bandymo metodą JT GHS papildomos 3-iosios kategorijos medžiagos priskiriamos prie kategorijos neturinčių medžiagų. Pagal šį bandymo metodą sukurtiems naujiems panašiams (*me-too*) bandymo metodams, kurie struktūros ir funkcijų požiūriu yra panašūs į patvirtinto tinkamumo pamatinius metodus, arba patvirtinto tinkamumo metodų pakeitimams reikėtų naudoti šio bandymo metodo priedėlyje aprašytus naudojimo charakteristikų standartus, kad būtų galima įrodyti naujų bandymo metodų palyginamąjį patikimumą ir tikslumą prieš pradedant juos taikyti bandymams reglamentavimo tikslais.

1 lentelė

Bandymų kokybei įrodyti naudojamos cheminės medžiagos, kurios yra priedėlyje išvardytų pamatinių cheminių medžiagų pogrupis

Cheminė medžiaga	CAS numeris	<i>In vivo</i> balas	Fizikinė būseną	GHS kategorija
naftalenacto rūgštis	86–87–3	0	K	nėra kat.
izopropanolis	67–63–0	0,3	S	nėra kat.
metilstearatas	112–61–8	1	K	nėra kat.
heptilbutiratas	5870–93–9	1,7	S	Papildoma 3-ioji kat.

▼ **M1**

Cheminė medžiaga	CAS numeris	<i>In vivo</i> balas	Fizikinė būseną	GHS kategorija
heksilsalicilatas	6259–76–3	2	S	Papildoma 3-ioji kat.
ciklamenaldehidas	103–95–7	2,3	S	2-oji kat.
1-bromheksanas	111–25–1	2,7	S	2-oji kat.
butilmetakrilatas	97–88–1	3	S	2-oji kat.
1-metil-3-fenil-1-piperazinas	5271–27–2	3,3	K	2-oji kat.
Heptanalis	111–71–7	4	S	2-oji kat.

1.6. METODO APIBŪDINIMAS

Toliau aprašomi odos dirginimui įvertinti naudojamo rekonstruoto žmogaus epidermio modelio bandymų komponentai ir procedūros. Rekonstruoto žmogaus epidermio modelis gali būti sukurtas, paruoštas arba nupirktas (pvz., *EpiSkin*TM, *EpiDerm*TM ir *SkinEthic RHE*TM). *EpiSkin*TM, *EpiDerm*TM ir *SkinEthic RHE*TM standartinius bandymo metodų protokolus galima gauti adresu http://ecvam.jrc.ec.europa.eu(21, 22, 23). Bandymai turi būti atliekami kaip nurodyta toliau.

1.6.1. Rekonstruoto žmogaus epidermio modelio komponentai

1.6.1.1. Bendrosios modelio sąlygos

Epiteliui gauti turėtų būti naudojami normalūs žmogaus odos keratinocitai. Po funkcinio *stratum corneum* turi būti keli gyvybingų epitelio ląstelių sluoksniai (pamatinis sluoksnis, dygliuotasis (*stratum spinosum*), grūdėtasis (*stratum granulosum*)). *Stratum corneum* turėtų 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. Barjero funkcija gali būti įvertinta nustatant koncentraciją, kuriai esant cheminis žymeklis sumažina audinių gyvybingumą 50 % (IC₅₀), praėjus nustatytai veikimo trukmei, arba nustatant tam tikros pastovios koncentracijos cheminio žymeklio veikimo trukmę, per kurią ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % (ET₅₀). Modelis turėtų turėti sulaikymo savybes, kurios apsaugotų nuo medžiagos patekimo į gyvąjį audinį apeinant *stratum corneum*, dėl ko būtų blogai modeliuojamas odos veikimas medžiaga. Ant odos modelio neturėtų būti bakterijų, virusų, mikoplazmų arba grybelių užkrato.

1.6.1.2. Funkcinės modelio sąlygos

1.6.1.2.1. Gyvybingumas

Gyvybingumo dydžiui nustatyti dažniausiai taikomas MTT bandymas (20). Dažiklio, ekstrahuoto (ištirpinto) iš neigiama kontroline medžiaga apdoroto audinio, optinis tankis turėtų būti bent 20 kartų didesnis už ekstrahavimui naudoto tirpiklio optinį tankį. Reikėtų patvirtinti dokumentais, kad neigiama kontroline medžiaga apdorotas audinys yra stabilus kultūroje (gaunami panašūs gyvybingumo matavimai) visą veikimo medžiaga laikotarpio trukmę.

1.6.1.2.2. Barjero funkcija

Stratum corneum ir jo lipidų sudėtis turėtų būti pakankama, kad jie būtų atsparūs greitam cheminių citotoksinių žymeklių, pvz., SDS arba Triton X-100, prasiskverbimui, įvertintam matuojant IC₅₀ arba ET₅₀.

▼ **M1**

1.6.1.2.3. Morfologija

Rekonstruotos odos (epidermio) histologinį tyrimą, siekiant įrodyti, kad ji turi į žmogaus odą (epidermį) panašią struktūrą (įskaitant daugiasluoksnį *stratum corneum*), turėtų atlikti tinkamą kvalifikaciją turintys darbuotojai.

1.6.1.2.4. Atkuriamumas

Reikėtų įrodyti metodo rezultatų, gautų taikant tam tikrą modelį, atkuriamumą bėgant laikui; tam pageidautina naudoti partijos kontrolinę (palyginamąją) medžiagą (žr. priedėlį).

1.6.1.2.5. Kontrolinės medžiagos modelio kokybei nustatyti

Kiekviena naudojamo epidermio modelio partija turėtų atitikti apibrėžtus produkcijos išleidimo kriterijus, iš kurių svarbiausi būtų gyvybingumo (1.6.1.2.1 punktą) ir barjero funkcijos (1.6.1.2.2 punktą) kriterijai. IC₅₀ arba ET₅₀ priimtino intervalo (viršutinę ir apatinę ribą) turėtų nustatyti odos modelio tiekėjas (arba tyrėjas, kai naudojamas vidinis modelis). Gavusi audinius, laboratorija turėtų patikrinti jų apsaugines savybes. Tik su kokybiškais audiniais gauti rezultatai gali būti laikomi patikimais prognozuojant dirginimo reiškinius. Kaip pavyzdys, toliau pateikti patvirtinto tinkamumo metodų priimtino intervalo.

2 lentelė

Partijos gamybos kokybės kontrolės kriterijų pavyzdžiai

	Apatinė priimtino riba	Priimtino intervalo vidurkis	Viršutinė priimtino riba
Patvirtinto tinkamumo 1-asis pamatinis metodas (18 h apdorojimas SDS)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 2,32 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
Patvirtinto tinkamumo 2-asis pamatinis metodas (1 % Triton X100)	ET ₅₀ = 4,8 h	ET ₅₀ = 6,7 h	ET ₅₀ = 8,7 h

1.6.1.3. Bandomosios ir kontrolinės medžiagų uždėjimas

Turėtų būti naudojamas pakankamas kartotinių audinio bandinių skaičius kiekvienam apdorojimo ir kontroliniam bandymui (bent trys kartotiniai bandiniai vienam bandymui). Tiriant skystąsias ir kietąsias medžiagas, naudojamos bandomosios medžiagos kiekis turi būti pakankamas, kad odos paviršius būtų tolygiai padengtas medžiaga, bet vengiama neribotos dozės (žr. 1.2 *Apibrėžtys*), t. y. reikėtų naudoti ne mažiau kaip 25 µl/cm² arba 25 mg/cm². Jei bandomos kietosios medžiagos, prieš jų uždėjimą epidermio paviršių reikėtų suvilgyti dejonizuotu arba distiliuotu vandeniu, kad būtų užtikrintas geras sąlytis su oda. Jei įmanoma, kietąsias medžiagas reikėtų bandyti smulkių miltelių pavidalu. Pasibaigus veikimo medžiaga laikotarpiui, bandomoji medžiaga turi būti kruopščiai nuplauta nuo odos paviršiaus vandeniniu buferiniu tirpalu arba 0,9 % NaCl. Atsižvelgiant į naudotą rekonstruoto žmogaus epidermio modelį, veikimo medžiaga trukmė gali būti nuo 15 iki 60 min, o inkubavimo temperatūra – nuo 20 iki 37 °C. Išsami informacija pateikta trijų metodų standartinėse taikymo procedūrose (21, 22, 23).

▼ **M1**

Kiekviename tyrime lygiagrečiai turėtų būti naudojamos neigiamos (NC) ir teigiamos (PC) kontrolinės medžiagos siekiant įrodyti, kad audinių gyvybingumas (NC), barjero funkcija ir gautas audinių jautrumas (PC) atitinka anksčiau sukaupytų duomenų priimtino intervalą. Siūloma PC medžiaga būtų 5 % vandeninis SDS. Siūlomos NC medžiagos yra vanduo arba fiziologinis tirpalas fosfatiniame buferyje (PBS).

1.6.1.4. *Ląstelių gyvybingumo matavimai*

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 (9, 10, 11, 12, 13) buvo nustatyta, kad optimali inkubacinio laikotarpio po apdorojimo trukmė lygi 42 h, todėl ji buvo naudojama patvirtinant pamatinių bandymo metodų tinkamumą.

MTT virsmo bandymas yra patvirtinto tinkamumo kiekybinis metodas, kuris turėtų būti taikomas ląstelių gyvybingumui matuoti. Jis yra suderinamas su trijų matmenų audinio modeliu. Odos ėminys 3 h 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 optinį tankį esant 570 nm bangos ilgiui ir ne didesniai kaip ± 30 nm praleidimo juostos pločiui.

Bandomosios medžiagos optinės savybės arba jos cheminis poveikis MTT gali trukdyti atliekant bandymą 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 nevysiškai pašalinama iš odos skalaujant arba kai ji prasiskverbia į epidermį. Jei bandomoji medžiaga tiesiogiai veikia MTT, yra iš prigimties spalvota arba nusidažo apdorojant audinį, reikėtų naudoti papildomas kontrolines medžiagas, kad būtų galima aptikti bandomosios medžiagos trikdžius taikomam gyvybingumo matavimo metodui ir padaryti pataisą. Išsamų tiesioginio MTT redukavimo aprašymą galima rasti patvirtinto tinkamumo pamatinių metodų protokole (21, 22, 23). Dėl šių trikdžių atsiradusios nespecifinės spalvos (NSC) dalis neturėtų būti didesnė kaip 30 % NC (pataisoms daryti). Jei NSC > 30 %, bandomoji medžiaga laikoma netinkama bandymui atlikti.

1.6.1.5. *Bandymo priimtino kriterijai*

Per kiekvieną bandymą, kurį atliekant naudojamos patvirtinto tinkamumo partijos (žr. 1.6.1.2.5 punktą), turėtų būti gautos tokios neigiama kontroline medžiaga apdorotų audinių optinio tankio vertės, kurios rodytų visus vežimo bei priėmimo etapus ir visą dirginimo bandymo protokolo procesą praėjusių audinių kokybę. Gautos kontrolinių medžiagų optinio tankio vertės neturėtų būti mažesnės nei pagal ankstesnius duomenis nustatytos apatinės ribinės vertės. Panašiai, teigiama kontroline medžiaga, t. y. 5 % vandeniniu SDS, apdoroti audiniai turėtų rodyti audinių išsaugotą jautrumą ir jų gebą atsakyti į dirginančios cheminės medžiagos veikimą kiekvieno atskiro bandymo sąlygomis (pvz., gyvybingumas ≤ 40 % taikant patvirtinto tinkamumo 1-ąjį pamatinį metodą ir ≤ 20 % taikant patvirtinto tinkamumo 2-ąjį pamatinį metodą). Reikėtų nustatyti susijusius ir tinkamus kartotinių bandinių kintamumo matus (pvz., jei taikomi standartiniai nuokrypiai, jie turėtų būti ≤ 18 %).

▼ M1**2. DUOMENYS****2.1. DUOMENYS**

Lentelėse turėtų būti pateikti kiekvieno atskiro apdoroto audinio kartotinio bandinio duomenys (pvz., optinio tankio vertės ir apskaičiuotų ląstelių gyvybingumo procentinių verčių duomenys kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai, įskaitant klasifikavimą), įskaitant pakartotų bandymų, jei reikia, duomenis. Be to, ataskaitoje reikėtų pateikti kiekvieno bandymo vidutinės vertės $\pm$ standartinio nuokrypio duomenis. Ataskaitoje reikėtų nurodyti pastebėtas spalvotų bandomųjų medžiagų sąveikas su MTT reagentu.

2.2. REZULTATŲ INTERPRETAVIMAS

Gautos kiekvieno bandinio optinio tankio vertės gali būti naudojamos nustatant gyvybingumo procentinę dalį, palyginti su neigiamais kontroliniais bandiniais, kurių gyvybingumas prilyginamas 100 %. Ribinė ląstelių gyvybingumo procentinės dalies vertė, skirianti dirginančias bandomąsias medžiagas nuo neklasifikuojamųjų, ir statistinė (-ės) procedūra (-os), taikyta (-os) rezultatams įvertinti ir dirginančioms medžiagoms identifikuoti, turi būti aiškiai apibrėžtos ir patvirtintos dokumentais, taip pat turi būti įrodytas jų tinkamumas. Toliau pateikiamos dirginimui prognozuoti naudojamos ribinės vertės, atitinkančios patvirtinto tinkamumo pamatinius metodus:

Laikoma, kad bandomoji medžiaga yra dirginanti odą pagal JT GHS 2-ąją kategoriją:

- i) jei audinio gyvybingumas po veikimo medžiaga ir paskesnio inkubavimo yra mažesnis arba lygus ($\leq$) 50 %.

Laikoma, kad bandomoji medžiaga nepriskiriama jokiai kategorijai:

- ii) jei audinio gyvybingumas po veikimo medžiaga ir paskesnio inkubavimo yra didesnis ($>$) kaip 50 %.

3. ATASKAITOS PATEIKIMAS**3.1. BANDYMO ATASKAITA**

Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikta ši informacija:

Bandomosios ir kontrolinės medžiagos:

- cheminis (-iai) pavadinimas (-ai), pvz., IUPAC arba CAS pavadinimas, ir CAS numeris, jei žinomas,
- medžiagos grynumas ir sudėtis (masės procentine (-ėmis) dalimi (-is)),
- fizikocheminės savybės (pvz., fizikinė būseną, stabilumas ir lakumas, pH, tirpumas vandenyje, jei žinomas), svarbios atliekamam tyrimui,
- bandomųjų ir (arba) kontrolinių medžiagų apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas),
- laikymo sąlygos.

Odos modelio ir naudoto protokolo pagrindimas.

Bandymo sąlygos:

- naudota ląstelių sistema,

▼ M1

- informacija apie ląstelių gyvybingumui matuoti naudoto matavimo prietaiso (*pvz.*, spektrofotometro) kalibravimą ir praleidimo juostą,
- visa su konkrečiu odos modeliu susijusi informacija, įskaitant jo naudojimo charakteristikas. Ją turėtų sudaryti šie ir kiti duomenys:
 - i) gyvybingumas;
 - ii) barjero 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. Turėtų būti pateikti šie ir kiti duomenys:
 - i) kokybės kontrolės duomenų priimtinumas atsižvelgiant į anksčiau sukauptus partijos duomenis;
 - ii) teigiamų ir neigiamų kontrolinių verčių priimtinumas atsižvelgiant į teigiamų ir neigiamų kontrolinių medžiagų vidurkius ir intervalus;
- taikytų vertinimo kriterijų, įskaitant prognozės modelio ribinio (-ių) taško (-ų) pagrindimo kriterijus, aprašymas.

Rezultatai:

- atskirų tiriamųjų bandinių duomenų lentelės,
- kitų pastebėtų reiškinių aprašymas.

Rezultatų aptarimas.**Išvados.****4. NUORODOS**

1. United Nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Galima rasti adresu http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/-ghs_rev02/02files_e.html.
2. REACH: Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Galima rasti adresu http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/-information_requirements_en.htm?time=1232447649.
3. Test Method B.4. ACUTE TOXICITY; DERMAL IRRITATION/CORROSION.
4. Test Method B.40. IN VITRO SKIN CORROSION: TRANSCUTANEOUS ELECTRICAL RESISTANCE TEST TER.

▼ **M1**

5. Test Method B.40 BIS. IN VITRO SKIN CORROSION: HUMAN SKIN MODEL TEST.
6. OECD (2006). Test Guideline 435. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. *In Vitro* Membrane Barrier Test Method. Adopted July 19, 2006. Galima rasti adresu http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html.
7. ECVAM (2009) Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation. Galima rasti adresu <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>, spustelėjus *Download Study Documents*.
8. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J.M. & Botham, P. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 15, 57–93.
9. Portes, P., Grandidier, M.H., Cohen, C. & Roguet, R.(2002). Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. *Toxicology in Vitro* 16, 765–770.
10. Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. & Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests. *ALTEX* 21, 107–114.
11. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. & Spielmann H. (2005) The EpiDerm Test Protocol fort the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test. *ATLA* 33, 351–367.
12. Cotovio, J., Grandidier, M.–H., Portes, P., Roguet, R. & G. Rubinstein. (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, 329–249.
13. Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. & Worth, A.(2002). Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation. ECVAM Skin Irritation Task Force Report 2. *ATLA* 30,109–129.
14. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovió, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. *ATLA* 35, 559–601.
15. Hoffmann, S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1- α . 135 pp. + annexes. Galima rasti adresu <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>, spustelėjus *Download Study Documents*.

▼ **M1**

16. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang, V (2007) ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. ATLA 35, 603–619.
17. J. Cotovio, M.–H. Grandidier, D. Lelièvre, R. Roguet, E. Tinois-Tessonnaud, J. Leclaire (2007). In vitro acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy -Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, Special Issue-proceedings from WC6. Vol.14, 351–358.
18. ESAC statement on updated EpiDerm and similar SkinEthic assays. 5 November 2008.
19. 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 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. *Europos Sąjungos oficialusis leidinys* L396/1, 2006 12 30. OPOCE, Liuksemburgas.
20. Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55–63.
21. EpiSkin™ SOP, Version 1.6 (January 2005). Validation of the EpiSkin Skin Irritation Test – 42 Hours Assay For The Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals. Galima rasti adresu <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>, spustelėjus *Download Study Documents*.
22. EpiDerm™ SOP, Version 5.0 (October 2004). Draft Standard Operating Procedure. *In Vitro* Skin Irritation Test: Human Skin Model. Model: EpiDerm™- 200. Galima rasti adresu <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>, spustelėjus *Download Study Documents*.
23. SkinEthic RHE™ SOP. Bus galima rasti adresu <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>, spustelėjus *Download Study Documents*.
24. Harvell, J.D., Lammintausta, K. Maibach H.I. (1995) Irritant contact dermatitis IN: Guin J.D. *Practical Contact Dermatitis* Mc Graw-Hill New York, pp 7–18.
25. Griesinger C, Barroso J & Zuang V: ECVAM background document on the recent adaptations of the ECVAM performance standards for *in vitro* skin irritation testing in the context of the drafting process of an EU test method and an OECD draft test guideline. Ispra, November 13, 2008

▼ **M1***Priedėlis***Odos dirginimui nustatyti pasiūlytų in vitro rekonstruoto žmogaus epidermio modelių naudojimo charakteristikų įvertinimas****IVADAS**

Reikėtų įvertinti procedūras, siūlomas naudoti pagal šį bandymo metodą, kad būtų galima nustatyti jų patikimumą ir tikslumą naudojant medžiagas, kurios atitinka visą Draize dirginimo balų intervalą. Kai įvertinama naudojant 20 rekomenduojamų pamatinių cheminių medžiagų (2 lentelė), pasiūlytų procedūrų patikimumo ir tikslumo vertės turėtų būti panašios į vertes, gautas patvirtinto tinkamumo 1-uoju pamatiniu metodu (3 lentelė) (1). Tikslumo ir patikimumo standartai, kuriuos reikėtų pasiekti, pateikti II ir III dalyse. Įtrauktos atitinkamas cheminių medžiagų klases reprezentuojančios neklasifikuojamos ir klasifikuojamos (JT GHS 2-osios kategorijos) medžiagos, kad pasiūlyto bandymo metodo patikimumą ir naudojimo charakteristikas (jautrumą, specifiškumą, klaidingai neigiamų bei klaidingai teigiamų rezultatų dalis ir tikslumą) būtų galima palyginti su patvirtinto tinkamumo 1-ojo pamatinio metodo naudojimo charakteristikomis. Bandymo metodo patikimumas ir jo geba tinkamai identifikuoti JT GHS 2-osios kategorijos dirginančias medžiagas turėtų būti nustatyti prieš pradedant jį taikyti naujų medžiagų bandymams.

NAUDOJIMO CHARAKTERISTIKŲ STANDARTAI

Naudojimo charakteristikų standartus sudaro šie trys elementai: I) esminiai bandymo metodo komponentai, II) pamatinės cheminės medžiagos ir III) apibrėžtos tikslumo ir patikimumo vertės (2). Šie naudojimo charakteristikų standartai buvo apibrėžti baigus ECVAM (Europos alternatyvių metodų patvirtinimo centro) odos dirginimo bandymų tinkamumo patvirtinimo tyrimą (3).

I) Esminiai bandymo metodo komponentai*Bendrosios modelio sąlygos*

Epiteliui gauti turėtų būti naudojami normalūs žmogaus odos keratinocitai. Po funkcinio *stratum corneum* turi būti keli gyvybingų epitelio ląstelių sluoksniai (pamatinis sluoksnis, dygliuotasis (*stratum spinosum*), grūdėtasis (*stratum granulosum*)). *Stratum corneum* turėtų 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. Barjero funkcija gali būti įvertinta nustatant koncentraciją, kuriai esant cheminis žymeklis sumažina audinių gyvybingumą 50 % (IC₅₀), praėjus nustatytai veikimo trukmei, arba nustatant tam tikros pastovios koncentracijos cheminio žymeklio veikimo trukmę, per kurią ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % (ET₅₀). Modelis turėtų turėti sulaikymo savybes, kurios apsaugotų nuo medžiagos patekimo į gyvąjį audinį apeinant *stratum corneum*, dėl ko būtų blogai modeliuojamas odos veikimas medžiaga. Ant odos modelio neturėtų būti bakterijų, virusų, mikoplazmų arba grybelių užkrato.

*Funkcinės modelio sąlygos***G y v y b i n g u m a s**

Gyvybingumo dydžiui nustatyti dažniausiai taikomas MTT bandymas (20). Dažiklio, ekstrahuoto (ištirpinto) iš neigiama kontroline medžiaga apdoroto audinio, optinis tankis turėtų būti bent 20 kartų didesnis už ekstrahavimui naudoto tirpiklio optinį tankį. Reikėtų patvirtinti dokumentais, kad neigiama kontroline medžiaga apdorotas audinys yra stabilus kultūroje (gaunami panašūs gyvybingumo matavimai) visą veikimo laikotarpio trukmę. Gyvybingumo dydžiui nustatyti dažniausiai taikomas MTT bandymas (20). Dažiklio, ekstrahuoto (ištirpinto) iš neigiama kontroline medžiaga apdoroto audinio, optinis tankis turėtų būti bent 20 kartų didesnis už ekstrahavimui naudoto tirpiklio optinį tankį. Reikėtų patvirtinti dokumentais, kad neigiama kontroline medžiaga apdorotas audinys yra stabilus kultūroje (gaunami panašūs gyvybingumo matavimai) visą veikimo medžiaga laikotarpio trukmę.

▼ **M1**

Barjero funkcija

Stratum corneum ir jo lipidų sudėtis turėtų būti pakankama, kad jie būtų atsparūs greitam cheminių citotoksinių žymeklių, pvz., SDS arba Triton X-100, prasiskverbimui, įvertintam matuojant IC₅₀ arba ET₅₀.

Morfolo g i j a

Rekonstruotos odos (epidermio) histologinį tyrimą, siekiant įrodyti, kad ji turi į žmogaus odą (epidermį) panašią struktūrą (įskaitant daugiasluoksnį *stratum corneum*), turėtų atlikti tinkamą kvalifikaciją turintys darbuotojai.

A t k u r i a m u m a s

Reikėtų įrodyti metodo rezultatų, gautų taikant tam tikrą modelį, atkuriamumą bėgant laikui; tam pageidautina naudoti partijos kontrolinę (palyginamąją) medžiagą (žr. 1.2 skirsnio apibrėžtis).

K o n t r o l i n ė s m e d ž i a g o s m o d e l i o k o k y b e i n u s t a t y t i

Kiekviena naudojamo epidermio modelio partija turėtų atitikti apibrėžtus produkcijos išleidimo kriterijus, iš kurių svarbiausi būtų *gyvybingumo* ir *barjero funkcijos* kriterijai. IC₅₀ arba ET₅₀ priimtino intervalo (viršutinę ir apatinę ribą) turėtų nustatyti odos modelio tiekėjas (arba tyrėjas, kai naudojamas vidinis modelis). Gavusi audinius, laboratorija turėtų patikrinti jų apsaugines savybes. Tik su kokybiškais audiniais gauti rezultatai gali būti laikomi patikimais prognozuojant dirginimo reiškinius. Kaip pavyzdys, toliau pateikti patvirtinto tinkamumo metodų priimtino intervalo.

1 lentelė

Partijos gamybos kokybės kontrolės kriterijų pavyzdžiai

	Apatinė priimtino riba	Priimtino intervalo vidurkis	Viršutinė priimtino riba
Patvirtinto tinkamumo 1-asis pamatinis metodas (18 h apdorojimas SDS)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 2,32 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
Patvirtinto tinkamumo 2-asis pamatinis metodas (1 % Triton X100)	ET ₅₀ = 4,8 h	ET ₅₀ = 6,7 h	ET ₅₀ = 8,7 h

II) **Pamatinės cheminės medžiagos**

Pamatinės cheminės medžiagos naudojamos norint nustatyti, ar pasiūlyto naujo *in vitro* rekonstruoto žmogaus epidermio bandymo metodo, kuris, kaip įrodyta, struktūriniu ir funkciniu požiūriu gana panašus į patvirtinto tinkamumo pamatinius metodus arba turi tik nedidelių patvirtinto tinkamumo pamatinio metodo pakeitimų, ir patvirtinto tinkamumo 1-ojo pamatinio metodo naudojimo charakteristikos yra panašios (1). 2 lentelėje išvardyta 20 pamatinių cheminių medžiagų, kurios reprezentuoja skirtingas tiriamas cheminių medžiagų klases ir JT GHS 2-osios kategorijos chemines medžiagas. Šio sąrašo medžiagas sudaro 10 JT GHS 2-osios kategorijos cheminių medžiagų, 3 JT GHS papildomos 3-iosios kategorijos cheminės medžiagos ir 7 kategorijos neturinčios medžiagos. Pagal šį bandymo metodą JT GHS papildomos 3-iosios kategorijos medžiagos priskiriamos prie kategorijos neturinčių medžiagų. Šis pamatinių cheminių medžiagų skaičius atitinka mažiausią cheminių medžiagų skaičių, kurį reikėtų naudoti įvertinant odos dirginimui nustatyti pasiūlyto rekonstruoto žmogaus epidermio bandymo metodo tikslumą ir patikimumą. Jei negalima gauti sąraše nurodytos cheminės medžiagos, galima naudoti kitas chemines medžiagas, apie kurias turima reikiamų *in vivo* informacinių duomenų. Norint nuodugniau įvertinti pasiūlyto bandymo metodo tikslumą, į trumpiausią pamatinių cheminių medžiagų sąrašą galima įtraukti papildomas chemines medžiagas, kurios reprezentuotų kitas cheminių medžiagų klases ir apie kurias būtų turima reikiamų *in vivo* informacinių duomenų.

▼ **M1**

2 lentelė

Pamatinės cheminės medžiagos rekonstruoto žmogaus epidermio modelių tikslumui ir patikimumui nustatyti tiriant odos dirginimą

Cheminė medžiaga (*)	CAS Nr.	EINECS Nr.	Fizikinė būseną	<i>In vivo</i> balas	GHS <i>in vitro</i> kat.	GHS <i>in vivo</i> kat.
1-brom-4-chlorbutanas	6940–78–9	230–089–3	S	0	2-oji kat.	nėra kat.
dietilftalatas	84–66–2	201–550–6	S	0	nėra kat.	nėra kat.
naftalenacto rūgštis	86–87–3	201–705–8	K	0	nėra kat.	nėra kat.
alilfenoksiacetatas	7493–74–5	231–335–2	S	0,3	nėra kat.	nėra kat.
Izopropanolis	67–63–0	200–661–7	S	0,3	nėra kat.	nėra kat.
4-metiltiobenz aldehidas	3446–89–7	222–365–7	S	1	2-oji kat.	nėra kat.
metilstearatas	112–61–8	203–990–4	K	1	nėra kat.	nėra kat.
heptilbutiratas	5870–93–9	227–526–5	S	1,7	nėra kat.	Papildoma 3 kat.
heksilsalicilatas	6259–76–3	228–408–6	S	2	nėra kat.	Papildoma 3-ioji kat.
triizobutilfosfatas	126–71–6	204–798–3	S	2	2-oji kat.	Papildoma 3-ioji kat.
1-dekanolis	112–30–1	203–956–9	S	2,3	2-oji kat.	2-oji kat.
ciklamenaldehidas	103–95–7	203–161–7	S	2,3	2-oji kat.	2-oji kat.
1-bromheksanas	111–25–1	203–850–2	S	2,7	2-oji kat.	2-oji kat.
2-chlormetil-3,5-dimetil-4-metoksipiridino hidrochloridas	86604–75–3	434–680–9	K	2,7	2-oji kat.	2-oji kat.
α-terpineolis	98–55–5	202–680–6	S	2,7	2-oji kat.	2-oji kat.
di- <i>n</i> -propil disulfidas	629–19–6	211–079–8	S	3	nėra kat.	2-oji kat.
butilmetakrilatas	97–88–1	202–615–1	S	3	2-oji kat.	2-oji kat.
5–(1,1-dimetiletil)-2-metil benzentiolis	7340–90–1	438–520–9	S	3,3	2-oji kat.	2-oji kat.
1-metil-3-fenil-1-pipera-zinas	5271–27–2	431–180–2	K	3,3	2-oji kat.	2-oji kat.
Heptanalis	111–71–7	203–898–4	S	4	2-oji kat.	2-oji kat.

(*) 20 pamatinių cheminių medžiagų yra 58 cheminių medžiagų, kurios iš pradžių buvo naudotos 1-ojo pamatinio metodo (*EpiSkin*TM) tinkamumui patvirtinti, reprezentatyvioji imtis. Visas bandomųjų cheminių medžiagų sąrašas ir jų atrankos kriterijai yra pateikti (5).

2 lentelėje išvardytos cheminės medžiagos yra 58 cheminių medžiagų, naudotų atliekant ECVAM tarptautinį odos dirginimo bandymų tinkamumo patvirtinimo tyrimą (1), reprezentatyvusis skirstinys. Jų atranka pagrįsta šiais kriterijais:

- chemines medžiagas galima nusipirkti,
- jos atitinka visą Draize dirginimo balų intervalą (nuo nedirginančios iki stipriai dirginančios),

▼ **M1**

- jos turi gerai apibrėžtą cheminę struktūrą,
- jos atitinka patvirtinto tinkamumo metodo atkuriamumą ir prognozavimo gebą, kaip nustatyta atliekant ECVAM tinkamumo patvirtinimo tyrimą,
- jos atitinka tinkamumo patvirtinimo procese naudotą cheminį funkcionalumą,
- jos nesusijusios su ypač didelio toksiškumo parametrais (pvz., kancerogeniškumu arba toksiškumu reprodukcijos sistemai) ir su labai didelėmis šalinimo išlaidomis.

III) **Apibrėžtos tikslumo ir patikimumo vertės**

Pasiūlyto bandymo metodo naudojimo charakteristikos (jautrumas, specifiškumas, klaidingai neigiamų bei klaidingai teigiamų rezultatų dalys ir tikslumas) turėtų būti panašios į patvirtinto tinkamumo 1-ojo pamatinio metodo naudojimo charakteristikas (3 lentelė), t. y. jautrumas turėtų būti lygus arba didesnis ($\geq$) kaip 80 %, specifiškumas – lygus arba didesnis ($\geq$) kaip 70 %, tikslumas – lygus arba didesnis ($\geq$) kaip 75 %. Naudojimo charakteristikos turėtų būti nustatomos naudojant visas skirtingose laboratorijose nustatytas 20 cheminių medžiagų klases. Kiekvienos cheminės medžiagos klasė kiekvienoje laboratorijoje turėtų būti nustatyta naudojant vidutinę gyvybingumo vertę, gautą atliekant skirtingus bandymus (ne mažiau kaip tris patvirtintus bandymus).

3 lentelė

Patvirtinto tinkamumo 1 pamatinio metodo naudojimo charakteristikos ⁽¹⁾

Bandymo metodas	Cheminių medžiagų skaičius	Jautrumas	Specifiškumas	Klaidingai neigiamų rezultatų dalis	Klaidingai teigiamų rezultatų dalis	Tikslumas
Patvirtinto tinkamumo 1 pamatinis metodas ⁽¹⁾	58	87,2 % ⁽²⁾	71,1 % ⁽³⁾	12,8 %	29,9 %	74,7 %
Patvirtinto tinkamumo 1 pamatinis metodas ⁽¹⁾	20	90 %	73,3 %	10 %	26,7 %	81,7 %

⁽¹⁾ EpiSkin™
⁽²⁾ Išbandyta 13 GHS 2-osios kategorijos dirginančių cheminių medžiagų.
⁽³⁾ Išbandytos 45 GHS 3-osios kategorijos dirginančios cheminės medžiagos arba kategorijos neturinčios cheminės medžiagos.

Pasiūlyto bandymo metodo patikimumas turėtų būti panašus į patvirtinto tinkamumo pamatinių metodų patikimumą.

Atkuriamumas laboratorijoje

Vertinant kintamumą laboratorijoje, klasifikavimo (2-oji kategorija arba nėra kategorijos) sutapimas, nustatytas vienoje atskiroje laboratorijoje atliekant skirtingus ir nepriklausomus 20 pamatinių cheminių medžiagų bandymus, turėtų būti lygus arba didesnis ($\geq$) kaip 90 %.

Tarplaboratorinis atkuriamumas

Vertinti tarplaboratorinį atkuriamumą nebūtina, jei pasiūlytas bandymo metodas taikomas tik vienoje laboratorijoje. Jei metodai būtų perduodami tarp laboratorijų, klasifikavimo (2-oji kategorija arba nėra kategorijos) sutapimas, nustatytas ne mažiau kaip trijose laboratorijose atliekant skirtingus ir nepriklausomus 20 pamatinių cheminių medžiagų bandymus, turėtų būti lygus arba didesnis ($\geq$) kaip 80 %.

⁽¹⁾ 3 lentelėje pateiktas patvirtinto tinkamumo 1-ojo pamatinio metodo naudojimo charakteristikos atsižvelgiant į gebą tinkamai identifikuoti dirginančias chemines medžiagas (JT GHS 2-osios kategorijos) ir neklasifikuojamas chemines medžiagas (neturinčias kategorijos, įskaitant 3 papildomą kategoriją), naudojant atitinkamai 58 ir 20 pamatinių cheminių medžiagų (2 lentelė).

▼ M1

NUORODOS

1. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovió, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. ATLA 35, 559–601.
2. OECD (2005) Guidance Document No. 34 on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. OECD, Paris.
3. ECVAM (2007) Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation. Galima rasti adresu <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>, spustelėjus *Download Study Documents*. Prieinama nuo 2008 m. spalio 27 d.
4. Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55–63.
5. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang, V (2007) ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. ATLA 35, 603–619.

▼ **M2****B.47. GALVIJŲ RAGENOS PADRUMSTĖJIMO IR PRALAUDUMO BANDYMO METODAS AKIS ĖSDINANČIOMS IR STIPRIAİ 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 poveikimo 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 didesnę 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 preliminarų 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. tiksliai 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. *opacimeter*) 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 kelių 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 esdinančių 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 vienetais 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, išpjauamos 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 sancaupų, 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 vašakai 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 mokslškai 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 veikiamą 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 būtų 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 uždara 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 nelieta 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 plau-namos 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 esdinančias 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 – 360 µL]).

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 esdinimą 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 esdinančia arba stipriai dirginančia medžiaga. Kaip nurodyta 1 skirsnyje, jeigu nenustatoma, kad cheminė medžiaga yra akis esdinanti arba stipriai dirginanti medžiaga, klasifikavimo ir ženklavimo 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., alkoholių, ketonų) 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 esdinančių 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 priimtino 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 priimtina 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 santarpių 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 priimtimumo 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 OD₄₉₀ 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 panaikinantį 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 Labeling 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 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; 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 priedelis***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 rageną. 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 atsaką 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 įvairių 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	<i>In vivo</i> kategorija ⁽²⁾	<i>In vitro</i> 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-dibenzoilchloridas	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	<i>In vivo</i> kategorija ⁽²⁾	<i>In vitro</i> 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.

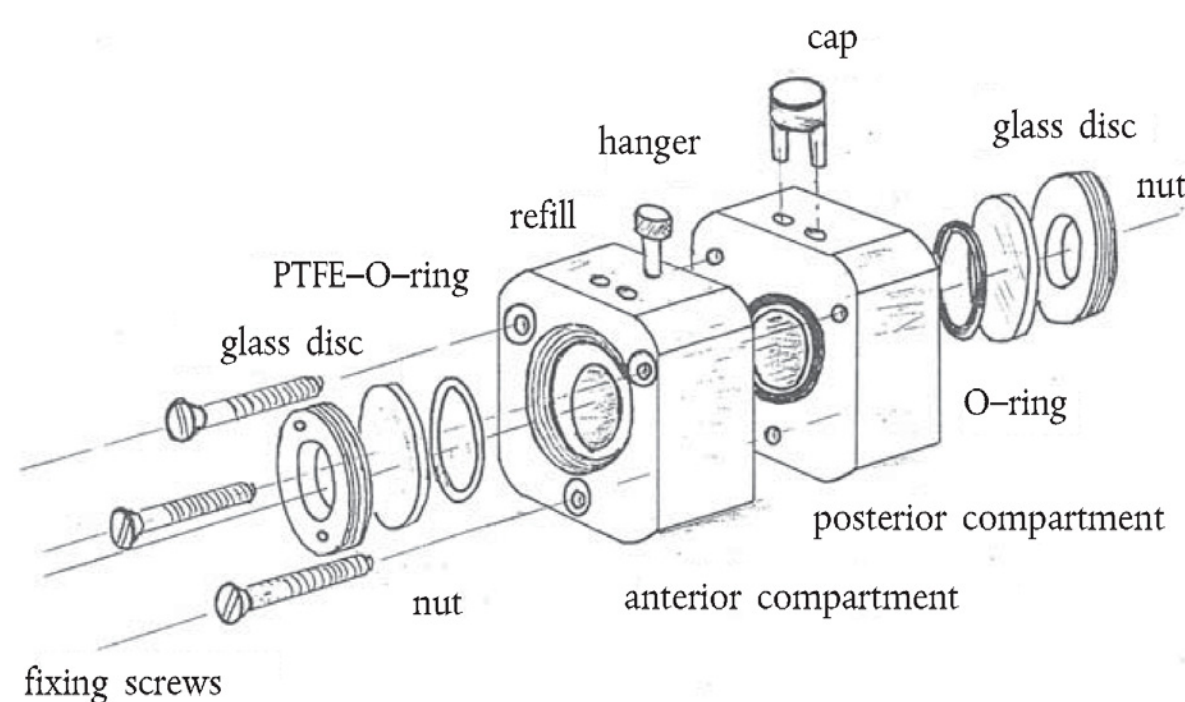
⁽¹⁾ Cheminės medžiagos klasės kiekvienai bandomajai medžiagai priskirtos taikant standartinę klasifikavimo sistemą, remiantis Nacionalinės medicinos bibliotekos medicinos objektų pavadinimų (MeSH) klasifikavimo sistema (paskelbta <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽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 BANDYMOUI 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 guminiiais 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 laikiklio, 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 skysčių) į fotoelementą ir lyginama su šviesa, į fotoelementą perduota per bandymo skyrių, kuriame yra kamera su rageną. 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 tikslus 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, koku 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****IVADAS**

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 poveikimo 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. tiksliai nustatyti akis ėsdinančias ir (arba) stipriai dirginančias medžiagas), klaidingi neigiami rezultatai neturi lemiamos reikšmės, nes šios cheminės medžiagos vėliau bus išbandytos su traušiais arba taikant kitus deramai patvirtintus *in vitro* bandymus, atsižvelgiant į reguliavimo reikalavimus ir taikant nuoseklią 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 sulaišymą. 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 savaitių 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 žirkklėmis 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 rageną būtų pasukta vertikaliai. Tada dėklas perkeliama į superfuzijos aparato kamerą (16). Dėklai superfuzijos aparate padedami taip, kad lašantis izotoninio druskos tirpalas patektų ant visos ragenos. Superfuzijos aparato kameroje turėtų būti palaikoma $32 \pm 1,5$ °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 kitokių 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 atvestos pagal kurį nors iš šių kriterijų, grupės turi būti atvestos 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 uždėdama 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 grynai 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 esdinančias 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 priimtina 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 ($\pm$ 5 minutės) nuo nuplovimo apdorojus. Taikant šiuos laiko momentus, užtikrinamas tinkamas matavimų kiekis per keturių valandų veikimo laikotarpį, o tarp matavimų paliekama pakankamai laiko reikiams 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 stomačiu, įrengtu mikroskope su plyšine lempa. Jis išreiškiamas procentais ir apskaičiuojamas remiantis ragenos storio matavimais pagal šią formulę:

$$\left(\frac{\text{ragenos storis laiko momentu } t - \text{ragenos storis laiko momentu } = 0}{\text{ragenos storis laiko momentu } = 0} \right) \times 100$$

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 ragenu 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., alkoholių ir aktyviausias 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 priimtino 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 sant-rumpų tarnybos (angl. *Chemical Abstracts Service*, CAS) naudojamas struk-tūrinis 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, laikotarpis 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 chemi-nėmis medžiagomis, istorinių duomenų apie neigiamas ir teigiamas kontro-lines medžiagas naudojimas).

Bandymo priimtino 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);

▼ **M2**

naudoto mikroskopo su plyšine lempa instrumentinės nuostatos;

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

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 panaikinantį 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 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; 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_tmter.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 priedelis***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 įvairių 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	<i>In vivo</i> kategorija ⁽²⁾	<i>In vitro</i> 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-dichlorbenzoilchloridas	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	<i>In vivo</i> kategorija ⁽²⁾	<i>In vitro</i> kategorija ⁽³⁾
Glicerinas	56-81-5	Alkoholis	Skysta	Neženklinama	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti
n-heksanas	110-54-3	Angliavandėnis (aciklinis)	Skysta	Neženklinama	Neėsdinanti ir (arba) stipriai nedirginanti

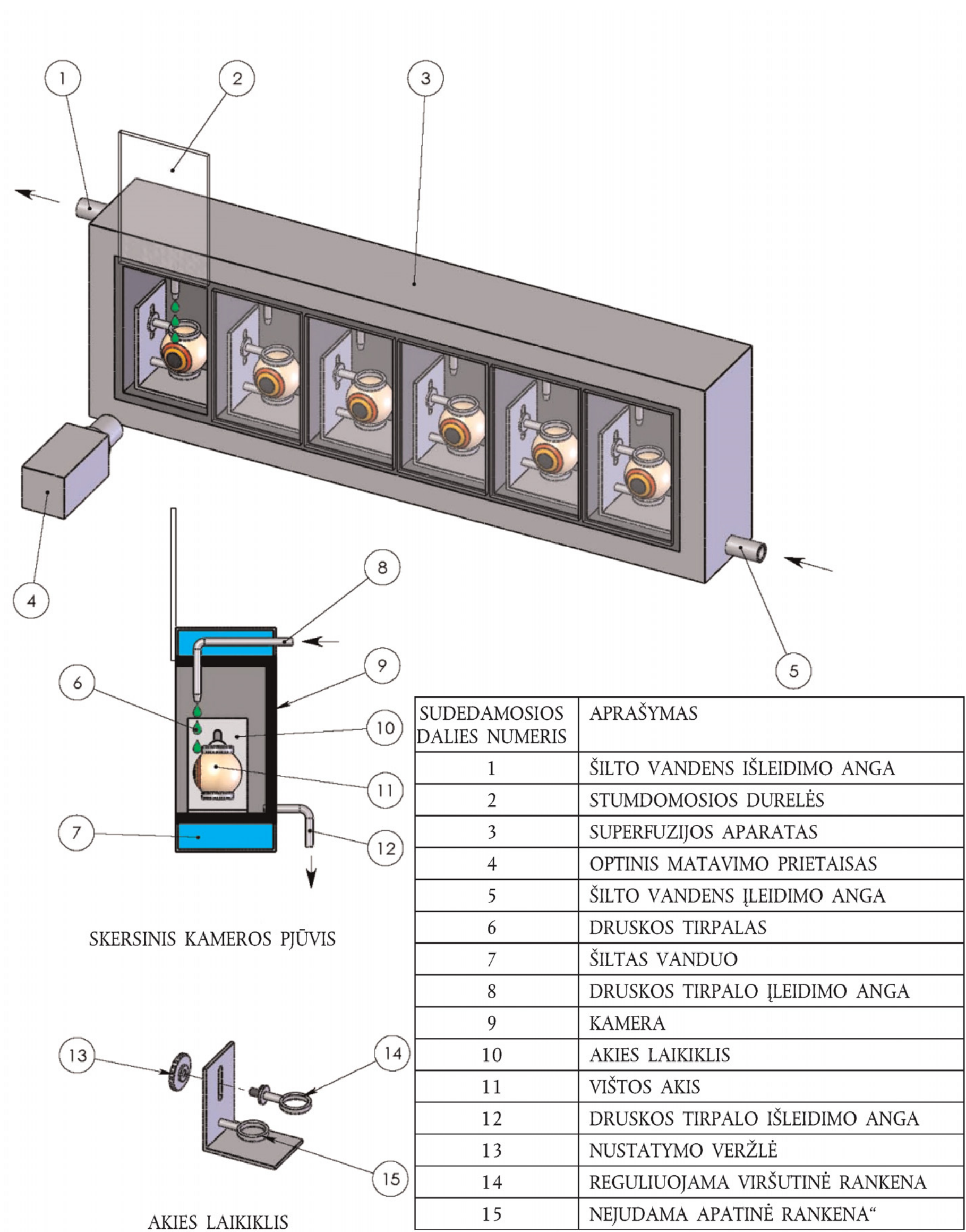
Santrumpos: CASRN – Cheminių medžiagų pavadinimų santrumpų tarnybos registracijos numeris.
⁽¹⁾ Cheminės klasės kiekvienai bandomajai medžiagai priskirtos taikant standartinę klasifikavimo sistemą, remiantis Nacionalinės medicinos bibliotekos medicinos objektų pavadinimų (MeSH) klasifikavimo sistema (paskelbta <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 priedelis

ICE superfuzijos aparato ir akių dėklų schemos

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



▼B**C DALIS. EKOTOKSIŠKUMO NUSTATYMO METODAI****TURINYS**

- C.1. ŪMUS TOKSIŠKUMO POVEIKIS ŽUVIMS
- C.2. *DAPHNIA SP.* ŪMAUS JUDRUMO SLOPINIMO (IMOBILIZAVIMO) BANDYMAS
- C.3. GĖLO VANDENS DUMBLIAI IR CIANOBAKTERIJOS. AUGIMO INHIBAVIMO BANDYMAS
- C.4. „LENGVO“ BIOLOGINIO SKAIDOMUMO MATAVIMAS
- 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. CO₂ 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 POREIKIS
- C.6. SKAIDYMAS – CHEMINIS DEGUONIES POREIKIS
- C.7. SKAIDYMAS. ABIOTINIS SKAIDYMAS. HIDROLIZĖ KAIP pH FUNKCIJOS NUSTATYMAS
- C.8. TOKSIŠKUMO SLIEKAMS MATAVIMAS
- C.9. BIOLOGINIS SKAIDYMAS – ZAHN-WELLENS BANDYMAS
- C.10. BIOLOGINIS SKAIDYMAS – AKTYVIOJO DUMBLO MODELIAVIMO BANDYMAS
- C.11. BIOLOGINIS SKAIDYMAS – AKTYVIOJO DUMBLO KVĖPAVIMO INHIBAVIMO BANDYMAS
- C.12. BIOLOGINIS SKAIDYMAS – MODIFIKUOTAS SCAS BANDYMAS
- C.13 BIOLOGINIS KONCENTRAVIMAS: BANDYMAS SU ŽUVIMIS PRATEKĖJIMO SĄLYGOMIS
- C.14. ŽUVŲ MAILIAUS AUGIMO BANDYMAS
- C.15. ŽUVYS, TRUMPALAIKIS TOKSIŠKUMO EMBRIONUI IR MAILIUI SU TRYNIO MAIŠELIU BANDYMAS
- C.16. NAMINĖS BITĖS – ŪMAUS ORALINIO TOKSIŠKUMO BANDYMAS
- C.17. NAMINĖS BITĖS – ŪMAUS TOKSIŠKUMO DĖL SĄLYČIO BANDYMAS
- C.18. ADSORBCIJA/DESORBCIJA TAIKANT ĮKROVOS PUSIAUSVYROS METODĄ

▼B

- C.19. DIRVOŽEMIO IR NUOTEKŲ DUMBLO ADSORBCIJOS KOEFICIENTO (K_{oc}) VERTINIMAS TAIKANT DIDELIO EFEKTYVUMO SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJĄ (HPLC)
- C.20. *DAPHNIA MAGNA* REPRODUKCIJOS BANDYMAS
- C.21. DIRVOŽEMIO MIKROORGANIZMAI. AZOTO VIRSMO BANDYMAS
- C.22. DIRVOŽEMIO MIKROORGANIZMAI. ANGLIES VIRSMO BANDYMAS
- C.23. AEROBINIS IR ANAEROBINIS VIRSMAS DIRVOŽEMYJE
- C.24. AEROBINIS IR ANAEROBINIS VIRSMAS VANDENS TELKINIŲ DUGNO NUOSĖDŲ SISTEMOSE
- C.25. AEROBINĖ MINERALIZACIJA PAVIRŠINIAME VANDENYJE. BIOLOGINIO SKAIDYMO BANDYMO MODELIAVIMAS
- C.26. *LEMNA* SPP. AUGIMO INHIBAVIMO BANDYMAS

▼B**C.1. ŪMUS TOKSIŠKUMO POVEIKIS ŽUVIMS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Šio metodo tikslas yra nustatyti medžiagos ūmų mirtiną toksiškumą žuvims gėlame vandenyje. Norint padėti pasirinkti tinkamiausią bandymo metodą (stacionarų, pusiau stacionarų arba pratekėjimo sąlygomis), kad 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 skaidomumą.

Planuojant bandymą ir interpretuojant jo rezultatus, turi būti atsižvelgta į papildomą informaciją (pvz., struktūrinė formulė, grynumo laipsnis, reikšmingesnių priemaišų prigimtis ir procentinis kiekis, priedų buvimas ir jų kiekis, pasiskirstymo tarp oktanolio ir vandens koeficientas).

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Ūmus toksiškumas yra stebimas neigiamas poveikis, sukeltas organizme per trumpą medžiagos veikimo laiką (paros). Šiame bandyme ūmus toksiškumas išreiškiamas medianine mirtina koncentracija (LC_{50}), – tai medžiagos koncentracija vandenyje, kai per nepertraukiamo veikimo laikotarpį, kuris turi būti nurodytas, žūsta 50 % bandyme naudotos partijos žuvų.

Kiekviena bandomosios medžiagos koncentracija yra skaičiuojama mase tūrio vienetui (mg/litre). Ją dar galima išreikšti mase masės vienetui (mg/kg).

1.3. ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Kaip priemonė parodyti, kad laboratorinėmis bandymo sąlygomis bandyme naudotų rūšių atsakas žymiai nepakito, gali būti daromas bandymas su etalonine medžiaga.

Šiam bandymui etaloninės medžiagos nėra apibrėžtos.

1.4. BANDYMŲ METODO ESMĖ

Galima atlikti ribinį bandymą su 100 mg/litre koncentracija, norint parodyti, kad LC_{50} yra didesnė nei ši koncentracija.

Žuvys 96 valandas veikiamos bandomąja medžiaga, įdėta į vandenį esant tam tikram koncentracijos verčių intervalui. Mirtingumo duomenys užrašomi bent kas 24 valandas, ir, jei įmanoma, kiekvienai stebėjimo laiko atkarpai skaičiuojama koncentracija, kuriai esant žūsta 50 % žuvų (LC_{50}).

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Kokybės kriterijai turi būti taikomi ir ribinio bandymo metodui, ir viso bandymo metodui.

Mirtingumas 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 % soties ore vertės.

▼B

Bandomosios medžiagos koncentracija visą bandymo laiką turi būti 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 bandymo terpėje, arba
- ii) gali sudaryti patvarias emulsijas arba suspensijas, arba
- iii) yra nepatvarios vandeniniuose tirpaluose,

pradine koncentracija turi būti laikoma koncentracija, nustatyta tirpale (ar, jei techniškai tai neįmanoma, išmatuota vandens tūryje) bandymo pradžioje. Koncentracija turi būti nustatyta po to, kai nusistovi pusiausvyra, tačiau prieš bandymų žuvų dėjimą.

Visais atvejais, norint patvirtinti tikrąsias veikimo koncentracijas arba kokybės kriterijų vykdymą, bandymo metu turi būti daromi tolimesni matavimai.

pH vertė neturi keistis daugiau kaip 1 pH vienetu.

1.6. BANDYMŲ METODO APRAŠYMAS

Galima naudoti trijų tipų metodiką:

Bandymas stacionariomis sąlygomis:

Toksiškumo bandymas, kai bandomasis tirpalas neteka. (Tirpalai visą bandymą yra tie patys).

Bandymas pusiau stacionariomis sąlygomis:

Bandymas, kai bandomasis tirpalas neteka, tačiau per ilgesnį laiko tarpą (pvz., kas 24 valandas) daromas reguliarus dozuojamasis bandomojo tirpalo atnaujinimas.

Bandymas pratekėjimo sąlygomis:

Toksiškumo bandymas, kai vanduo bandymo kameroje atnaujinamas visą laiką, bandomąją medžiagą tiekiant su vandeniu, naudojamu bandymo 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 ištirpinta praskiedimo vandenyje tiesiogiai.

▼ B

Paprastai medžiagos turi būti bandomos tik iki tirpumo ribos. Norint kai kurioms medžiagoms (pvz., vandenyje mažai tirpioms medžiagoms, arba kurių didelis P_{ow} , arba toms, kurios sudaro patvarią dispersiją, o ne tikrąjį tirpalą vandenyje) užtikrinti galimybę pasiekti soties/pastovią koncentraciją, priimtina daryti bandymą virš medžiagos tirpumo ribos. Tačiau yra svarbu, kad tokia koncentracija netrikdytų bandymo sistemos kitais atžvilgiais (pvz., vandens paviršiuje nesusidarytų bandomosios medžiagos plėvelė, kuri neleistų į vandenį patekti deguoniui, ir t. t.).

Ruošiant vandenyje mažai tirpių medžiagų pradinį tirpalą arba norint pagerinti šių medžiagų dispergavimą bandomojoje terpėje, į pagalbą galima pasitelkti dispergavimą ultragarsu, organinius tirpiklius, emulsiklius arba dispergatorius. Kai naudojamos tokios pagalbinės medžiagos, visuose bandomųjų koncentracijų tirpaluose turi būti toks pat pagalbinės medžiagos kiekis, ir papildoma kontrolinė žuvis turi būti veikiamą pagalbine medžiaga, kurios koncentracija būtų tokia pat, kaip ir bandymų serijoje. Tokių pagalbinių medžiagų koncentracija turi būti kuo mažesnė ir jokių būdu neturi būti didesnė kaip 100 mg/litre bandomosios terpės.

Bandymas turi būti daromas 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 HCl ir NaOH. Šis pH reguliavimas turi būti daromas taip, kad bandomosios medžiagos koncentracija pradiniam tirpale žymiai nepasikeistų. Jei reguliuojant pH vyksta 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 geriamojo vandens vandentiekio vandenį (neužterštą potencialiai kenksmingos koncentracijos chloru, sunkiaisiais metalais arba kitomis medžiagomis), geros kokybės gamtinį vandenį arba atkurtąjį vandenį (žr. 1 papildymą). 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.

— automatinio skiedimo sistema (bandymui pratekėjimo sąlygomis),

— deguonies matuoklis,

— įranga vandens kietumui nustatyti,

— atitinkama termostataavimo aparatūra,

— pH-metras.

1.6.3. **Bandymų žuvis**

Žuvis turi būti sveikos ir neturėti jokių matomų nenormalumo požymių.

▼B

Žuvų rūšį reikia rinktis remiantis praktiniais kriterijais, pvz., lengvumas žuvis gauti ištikus metus ir lengvumas jas prižiūrėti, patogumas bandyti, santykinis jautrumas cheminėms medžiagoms, bei kiek nors susijusiais ekonominiais, biologiniais arba ekologiniais faktoriais. Be to, renkant žuvų rūšis, reikia nepamiršti apie gautų duomenų palyginamumo būtinybę ir esamą tarptautinį derinimą (1 nuoroda).

Žuvų, kurios rekomenduojamos naudoti šiame bandyme, sąrašas pateiktas 2 papildyme; tinkamiausios rūšys yra dryžuotasis danio ir margasis upėtakis.

1.6.3.1. *Laikymas*

Geriausia, jei bandymų žuvys būtų vienos veislės 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 % soties ore vertės,

maitinimas:

tris kartus per savaitę arba kas dieną, nutraukiant maitinimą prieš 24 valandas iki bandymo pradžios.

1.6.3.2. *Mirtingumas*

Po 48 valandų stabilizavimo laikotarpio, užrašomi mirtingumo duomenys ir taikomi tokie kriterijai:

— populiacijos mirtingumas per septynias paras didesnis kaip 10 %:

visa partija atmetama,

— populiacijos mirtingumas 5–10 %:

laikoma dar septynias paras.

Jei mirtingumas nedidėja, partija priimama, priešingu atveju turi būti atmesta,

— populiacijos mirtingumas mažesnis kaip 5 %:

partija priimama.

1.6.4. **Adaptavimas**

Prieš tai kaip naudoti, visas žuvis bent septynias paras būtina laikyti vandenyje, kurio kokybė ir temperatūra atitinka bandymo sąlygas.

▼ B**1.6.5. Bandymo eiga**

Norint gauti informacijos apie koncentracijų, kurias reikia naudoti pagrindiniame bandyme intervalą, prieš galutinį bandymą gali būti daromas intervalo nustatymo bandymas.

Daromas 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 arba pratekėjimo sąlygomis, kad būtų įvykdyti kokybės kriterijai.

Žuvys veikiamos medžiaga, kaip tai aprašyta toliau:

- trukmė: 96 valandos,
- gyvūnų skaičius: bent 7 vienai koncentracijai,
- rezervuarai: tinkamo tūrio, atsižvelgiant į rekomenduotą įkrovą,
- įkrova: didžiausia rekomenduota bandymo stacionariomis ir pusiau stacionariomis sąlygomis įkrova – 1 g/litre; sistemoms su pratekėjimu priimtina didesnė įkrova,
- bandomoji koncentracija: bent penkios koncentracijos, kurios skiriasi pastoviu faktoriumi, ne didesniu kaip 2,2, bei kiek įmanoma apima mirtingumo 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 % soties ore vertės pasirinktos temperatūros sąlygomis,
- maitinimas: jokio.

Žuvys tikrinamos iš pradžių po 2–4 valandų, po to – bent kas 24 valandas. Žuvis laikoma negyva, jei liečiant uodeginį stiebelį (*caudal peduncle*) nėra jokios reakcijos ir jei nesimato jokių kvėpavimo judesių. Po apžiūros negyvos žuvys pašalinamos ir užrašomas negyvų 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 kasdieną.

Ribinis bandymas

Taikant šiame bandymo metode aprašytas metodikas, galima daryti ribinį bandymą su koncentracija 100 mg/litre, kai norima įrodyti, kad LC₅₀ yra didesnė nei ši koncentracija.

Jei medžiagos prigimtis yra tokia, kad 100 mg/litre koncentracijos bandymų vandenyje pasiekti negalima, ribinis bandymas turi būti daromas su koncentracija, lygia medžiagos tirpumui (arba su didžiausia koncentracija, kurioje susidaro patvari suspensija) naudojamoje terpėje (dar žr. 1.6.1.1 punktą).

▼B

Ribinis bandymas turi būti daromas naudojant 7–10 žuvų, toks pat žuvų skaičius turi būti naudojamas kontroliniame (-iuose) bandyme (-uose). (Binominio skirstinio teorija sako, kad, jei bandyme su 10 žuvų mirtingumas yra nulinis, pasiklovimo tikimybė, kad LC_{50} yra didesnė nei ribiniame bandyme naudota koncentracija, yra 99,9 %. Mirtingumo nebuvimas, naudojant 7, 8 arba 9 žuvis, užtikrina bent 99 % pasiklovimo tikimybę, kad LC_{50} yra didesnė nei naudota koncentracija).

Jei mirtingumo atvejai pasitaiko, turi būti daromas visas bandymas. Jei stebimi subletalūs padariniai, tai turi būti užrašyta ataskaitoje.

2. DUOMENYS IR VERTINIMAS

Kiekvienam laikotarpiui, kuriam rezultatai buvo užrašyti (24, 48, 72 ir 96 valandos), logaritminiame tikimybiname popieriuje braižykite mirtingumo, nustatyto kiekvienam rekomenduotam veikimo laikotarpiui, procentinės vertės priklausomybės nuo koncentracijos kreivę.

Kai tai įmanoma, ir kiekvienam matavimo laikotarpiui reikia įvertinti LC_{50} ir pasiklovimo rėžius ($p = 0,05$), tam taikant standartines metodikas; šios vertės turi būti apvalinamos iki vieno ar, daugiausia, iki dviejų reikšmingų 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 % mirtingumo vertės, šių dviejų verčių pakanka pažymėti intervalui, į kurį patenka LC_{50} .

Jei pastebėta, kad bandomosios medžiagos patvarumo arba homogeniškumo užtikrinti neįmanoma, tai turi būti pateikta ataskaitoje, o interpretuoti rezultatus reikia atsargiai.

3. ATASKAITA

Bandymų ataskaitoje turi būti pateikta, jei įmanoma, tokia informacija:

- informacija apie bandymų 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;
- visų pagalbinių medžiagų koncentracija,
- naudotų koncentracijų sąrašas ir visa turima informacija apie bandomosios medžiagos patvarumą naudotos koncentracijos bandomajame tirpale,
- jei daroma cheminė analizė, taikyti metodai ir gauti rezultatai,
- ribinio bandymo, jei jis buvo daromas, 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.),

▼B

- bandymų įrangos aprašymas,
- apšvietimo režimas,
- ištirpusio deguonies koncentracija bandomuosiuose tirpaluose, jų pH vertė ir temperatūra kas 24 valandas,
- įrodymas, kad kokybės kriterijai įvykdyti,
- lentelė, kurioje kiekvienam rekomenduotam matavimo laikotarpiui pateiktas bendras mirtingumas kiekvienai koncentracijai ir kontroliniame bandyme (ir kontroliniame bandyme su pagalbine medžiaga, jei reikia),
- atsako procentinės vertės priklausomybės nuo koncentracijos kreivės grafikas bandymo pabaigoje,
- jei įmanoma, LC₅₀ vertės kiekvienam rekomenduotam matavimo laikotarpiui (su 95 % pasiklovimo režiais),
- statistinės metodikos, taikytos LC₅₀ vertėms nustatyti,
- gauti rezultatai, jei naudota etaloninė medžiaga,
- didžiausia bandomoji koncentracija, kurią naudojant mirtingumas bandymo laikotarpiu yra nulinis,
- mažiausia bandomoji koncentracija, bandymo laikotarpiu sukelianti 100 % mirtingumą.

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 für 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.

▼B

- 11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.
- 12) Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWW A-WPCF, 1975.
- 13) Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.
- 14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen für die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.
- 15) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, tExp. Therap., 1949, vol. 96, 99.
- 16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.
- 17) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.
- 18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.
- 19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50} . In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.
- 20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50} . US EPA.

▼B*1 Priedėlis***Atkurtasis vanduo***Skiedimui tinkamo vandens pavyzdys*

Visos cheminės medžiagos turi būti analiziškai gynos.

Vanduo turi būti geros kokybės distiliuotas vanduo arba dejonizuotas vanduo, kurio savitasis laidumas būtų mažesnis kaip $5\mu\text{Scm}^{-1}$.

Vandens distiliavimo aparate neturi būti jokių varinių detalių.

Pradiniai tirpalai

$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (kalcio chloridas, dihidratas): 11,76 g

Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro.

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (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 soties ore lygį.

pH turi būti $7,8 \pm 0,2$.

Prireikus reguliuokite pH NaOH (natrio hidroksidu) arba HCl (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.



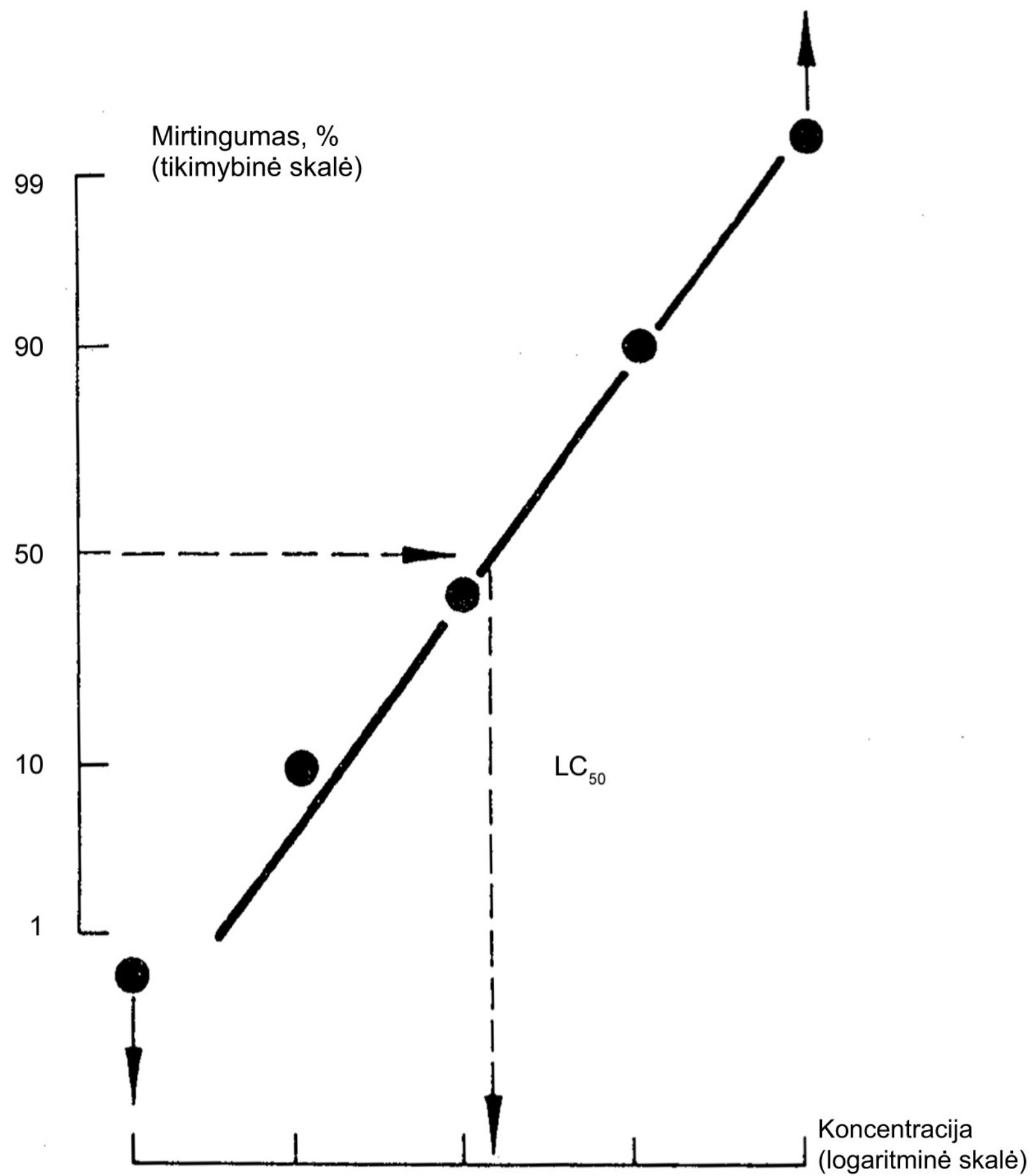
2 priedėlis

Žuvų rūšys, rekomenduotos naudoti bandymuose

Rekomenduojamos rūšys	Rekomenduojamas bandymų temperatūros intervalas (° C)	Rekomenduojamas bandymų gyvūno bendras ilgis (cm)
<i>Brachydanio rerio</i> (Teleostei, Cyprinidae) Hamilton-Buchanan) Dryžuotasis danio	nuo 20 iki 24	3,0 ± 0,5
<i>Pimephalespromelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Rainė	nuo 20 iki 24	5,0 ± 2,5
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Paprastasis karpis	nuo 20 iki 24	6,0 ± 2,0
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlege 1850) Red killifish	nuo 20 iki 24	3,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859)Guppy	nuo 20 iki 24	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758) Bluegill	nuo 20 iki 24	5,0 ± 2,0
<i>Onchorhynchus mykiss</i> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Margasis upėtakis	nuo 12 iki 17	6,0 ± 2,0
<i>Leuciscus idus</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus	nuo 20 iki 24	6,0 ± 2,0 1758) Golden Orfe

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 bandymų gyvūnai būtų sveiki ir būtų žinoma jų kilmė. Šių žuvų yra daugelyje pasaulio kraštų.

▼B*3 priedelis***Koncentracijos pavyzdys: mirtingumo dalis procentais**LC₅₀ nustatymo pavyzdys, naudojant logaritminį-tikimybinį popierių

▼B**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:

EC₅₀ – 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 bandymų indo purtymo (net jei jie vis dar gali judinti čiuptukus).

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 EC₅₀ (apibrėžtys pateiktos 1.2 skirsnyje). Papildomai galima nustatyti EC₅₀ 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 nustatymo riba 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 fizikocheminės savybės apsunkina jų tyrimą, pateikti (4).

1.5 ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Siekiant įsitikinti, kad bandymo sąlygos yra patikimos, galima atlikti bandymus etaloninės medžiagos EC₅₀ nustatyti. Šiam tikslui rekomenduojama naudoti tarplaboratoriniuose tyrimuose 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 (K₂Cr₂O₇) EC₅₀ vertė po 24 h yra nuo 0,6 mg/l iki 1,7 mg/l.

▼B**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 inertinės medžiagos. Bandymui paprastai naudojami stikliniai mėgintuvėliai arba 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 matuoti; įranga suminei organinės anglies koncentracijai (TOC) nustatyti; įranga cheminiam deguonies poreikiui (COD) nustatyti; įranga vandens kietumui nustatyti ir t. t.

1.7.2 Bandymo organizmas

Daphnia magna Straus yra labiausiai bandymui tinkama rūšis, nors leidžiama naudoti ir kitas rūšis (pvz., *Daphniapulex*). 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 žūstimumo, vyriškos lyties atstovų ir *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 auginimo terpė skiriasi nuo įprastos dafnijų kultūros terpės, būtų gerai numatyti dafnijų aklimatizavimo laikotarpį. Todėl veislei naudojamos dafnijos bent 48 h laikomos skiedimo vandenyje esant bandymo temperatūrai.

▼B**1.7.3 Laikymo ir skiedimo vanduo**

Dafnijoms laikyti ir skiesti tinka 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 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, 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 tikt 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 reikšmingai 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 šalinamas chloras, pageidautina kasdien atlikti chloro analizę. Jei skiedimo vandens šaltinis yra paviršinis arba gruntinis vanduo, reikėtų matuoti laidį ir suminį organinės anglies kiekį (TOC) arba cheminį deguonies poreikį (COD).

1.7.4 Bandomieji tirpalai

Pasirinktos koncentracijos bandomieji tirpalai paprastai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Pradinius tirpalus geriau ruošti tirpinant 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 reikšmingai nesikeistų ir nepradėtų vykti kokia nors cheminė reakcija arba susidarytų cheminės medžiagos nuosėdos. Labiausiai tinka HCl ir NaOH.

▼ B

1.8 PROCEDŪRA

1.8.1 **Veikimo sąlygos**1.8.1.1 *Bandymo ir kontrolinės grupės*

Į bandymo indus įpilami reikalingi skiedimo vandens ir bandomosios medžiagos tūriai. Oro/vandens tūrio santykis inde turi būti vienodas bandymo 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 tirpinimui naudojama medžiaga bandymas.

1.8.1.2 *Bandomosios koncentracijos vertės*

Jei nėra informacijos apie bandomosios medžiagos toksiškumą, galima atlikti intervalo nustatymo bandymą galutinio bandymo koncentracijos 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 trumpesnę laiką.

Turėtų būti naudojamos bent penkios koncentracijos vertės. Jos turi sudaryti geometrinės progresijos eilutę, kurios vardiklis geriausiai atveju neturėtų būti didesnis kaip 2,2. Jei naudojama mažiau koncentracijos verčių, tai būtina pagrįsti. Pageidautina, kad didžiausia koncentracija slopintų judrumą 100 %, o mažiausia bandomoji koncentracija turėtų nedaryti 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 ataskaitoje turi būti pateikti duomenys apie bet kokią neįprastą elgesį arba išvaizdą.

▼B**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 matuojama temperatūra 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 turi 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 $\pm 20\%$ nuo vardinės arba išmatuotos pradinės koncentracijos vertės, rezultatai gali būti išreikšti naudojant vardines arba išmatuotas pradines vertes.

1.9 RIBINIS BANDYMAS

Taikant šiame bandymo metode aprašytas procedūras, galima atlikti ribinį bandymą su bandomosios medžiagos koncentracija 100 mg/l arba koncentracija, atitinkančia ribinio tirpumo vertę (iš šių dviejų pasirenkant mažesnę), jei norima įrodyti, kad EC_{50} yra didesnė už šią koncentraciją. Ribinis bandymas turi būti atliekamas su 20 dafnijų (padalintų į keturias grupes po penkias dafnijas), tas pat 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 9 % pasiklivimo režiams ($p = 0,95$) (7) (8).

Jei gautiems duomenims etaloniniai 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 laikoma šių dviejų koncentracijos verčių geometrinis vidurkis).

3. ATASKAITOS PATEIKIMAS**3.1 BANDYMO ATASKAITA**

Bandymo ataskaitoje turi būti ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

— fizikinė būseną ir atitinkamos fizikocheminės savybės,

▼B

- cheminės medžiagos identifikavimo duomenys, įskaitant grynumą.

Bandymo gyvūnai:

- *Daphnia* šaltinis ir rūšis, tiekimo šaltinis (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, 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 arba kitus neigiamus poveikius (įskaitant neįprastą elgesį) rodančių dafnijų skaičius ir procentinė dalis kontroliniuose ėminiuose ir kiekvienoje apdoro-toje grupėje, stebimų poveikių tipo aprašymas,
- bandymų su etalonine medžiaga rezultatai ir duomenys, 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 fizikocheminiai temperatūros, pH ir ištirpusio deguonies matavimai,
- judrumo slopinimo EC₅₀ po 48 h, nurodant pasiklivimo intervalus ir jų apskaičiavimui naudotus regresijos modelių grafikus, dozės ir atsako kreivių krypties koeficientai ir jų standartinis nuokrypis; statistinės procedūros, taikytos EC₅₀ 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.

▼B

- 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 LC₅₀. 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.

*I PRIEDAS***KAI KURIOS TINKAMO SKIEDIMO VANDENS CHEMINĖS
CHARAKTERISTIKOS**

Medžiaga	Koncentracija
Kietosios dalelės	< 20 mg/l
Suminė organinė anglis	< 2 mg/l
Nejonizuotas amoniakas	< 1 µg/l
Liekamasis chloras	< 10 µg/l
Suminis organinių fosforo pesticidų kiekis	< 50 ng/l
Suminis organinių fosforo pesticidų ir polichlorintų bifenilų kiekis	< 50 ng/l
Suminis organinio chloro kiekis	< 25 ng/l

▼ B

2 Priedas

TINKAMO ATKURTOJO BANDYMŲ VANDENS PAVYZDŽIAI

ISO bandymų vanduo (1)

Pradiniai tirpalai (atskiros medžiagos)		Atkurtojam vandeniui paruošti į 1 l vandens įpilamas šis pradinių tirpalų tūris (*)
Medžiaga	Kiekis, įdedamas į 1 l vandens (*)	
Kalcio chloridas CaCl ₂ , 2H ₂ O	11,76 g	25 ml
Magnio sulfatas MgSO ₄ , 7H ₂ O	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 laidis būtų ne didesnis kaip 10 μS.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. Tačiau labiau pasisekė jas aklimatizuojant laipsniškai, t. y. perkeliant dafnijas iš jų terpės į 30 % *Elendt*, paskui į 60 % *Elendt* ir pagaliau į 100 % *Elendt*. Aklimatizavimas gali trukti visą mėnesį.

Ruošimas

Mikroelementai

Atskirų mikroelementų pradiniai tirpalai (I) iš pradžių ruošiami naudojant tinkamo grynumo vandenį, pvz., dejonizuotą, distiliuotą arba grįžtamojo osmoso būdu gautą vandenį. Iš šių skirtingų 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 ₂ O	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25

▼B

I pradinis (-iai) tirpalas (-ai) (atskira medžiaga)	I 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 ₂ O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1 230	20 000	1,0	0,25
CuCl ₂ ·2H ₂ O	335	20 000	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000	1,0	1,0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	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 ₂ O	5 000	2 000	—	—
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1 991	2 000	—	—

Na₂EDTA ir FeSO₄ 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:

	I 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 (mikro- elementų mišinys)		20	50	50
Pradiniai mitybinių makroelementų tirpalai (atskira medžiaga)				
CaCl ₂ · 2H ₂ O	293 800	1 000	1,0	1,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	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 · 9H ₂ O	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 ₂ HPO ₄	1 840	10 000	0,1	0,1

▼ B

	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 tokių 3 vitaminų kieki:

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.

- NB.: 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.
- NB.: 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 vienetuose 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 vienetuose 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 kasdienes (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 vidutiniams 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 išėigą, vienareikšmiškai žymėti vartojami simboliai „E_tC“ 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 (šiuo 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 uždara 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 dėsni 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 masė 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 $E_r C_x$ (pvz., $E_r C_{50}$).

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 $E_y C_x$ (pvz., $E_y C_{50}$).

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 $0,92 \text{ para}^{-1}$. 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 aparatūra, 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 $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ tikslumu.
- Apšvietimo matavimo prietaisai: svarbu pažymėti, kad išmatuotą vertę veiks šviesos intensyvumo matavimo metodas ir ypač jutiklio (kolektoriaus) tipas. Pageidautina matavimus atlikti naudojant sferinį (4π) jutiklį (kuris reaguoja į tiesioginę ir atspindėtą šviesą, krintančią visais kampais virš ir žemiau matavimo plokštumos) arba 2π jutiklį (kuris reaguoja į šviesą, krintančią 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 išsekvojimo rizikos. Pradinė biomasė neturėtų viršyti 0,5 mg/l sausos medžiagos masės. Rekomenduojamos šios pradinės ląstelių koncentracijos vertės:

<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> :	$5 \times 10^3 - 10^4$	ląstelių/ml
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	$2-5 \times 10^3$	ląstelių/ml
<i>Navicula pelliculosa</i>	10^4	ląstelių/ml
<i>Anabaena flos-aquae</i>	10^4	ląstelių/ml
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	$5 \times 10^4 - 10^5$	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 didesnę 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 ketvirtąjį ir šeštąjį 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 ruošama 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 CO₂ 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 $60\text{--}120 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ intervalą, kai jis matuojamas esant fotosintzei optimaliam bangų ilgių intervalui $400\text{--}700 \text{ nm}$ ir naudojant atitinkamą jutiklį. Kai kurios rūšys, ypač *Anabaena flos-aquae*, gerai auga esant mažesniai šviesos intensyvumui ir gali būti pažeistos esant dideliui intensyvumui. Tokioms rūšims turėtų būti pasirinktas vidutinis šviesos intensyvumas $40\text{--}60 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. (Jei apšvietos matavimo prietaisai kalibruoti liuksais, šaltai baltos šviesos $4\,440\text{--}8\,880$ liuksų apšvieta maždaug atitinka $60\text{--}120 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ šviesos intensyvumą). Šviesos intensyvumas virš inkubavimo vietos neturi kisti daugiau kaip $\pm 15 \%$ 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 biomasę 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 analizę 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 rezultatus, 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 kaip $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ arba tirpumą bandymo terpėje atitinkančiai koncentracijai (kuri būtų mažesnė), galima atlikti ribinį bandymą, kuriame būtų lyginami kontrolinės grupės ir vienos apdorotų ėminių grupės ($100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 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: $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ arba didesnis.

Šviesos kelias turėtų būti sutrumpinamas sumažinant bandymo tirpalų tūrį (5–25 ml).

Dumbliai 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 vaizdą 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 problemoms taikomos ribotai ir negali pakeisti ekspertų įvertinimo. Riktus (pažymėtus, kad jie yra tokie) geriau būtų palikti tarp duomenų taškų, kurie vėliau koku nors būdu pateikiami kaip grafikai 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 ($E_r C_x$), paprastai bus didesnės nei išeiga pagrįsti rezultatai ($E_y C_x$), 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. $E_y C_x$ 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:

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

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 laikotarpiais 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 kiekybinę 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 nulį 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., mirtinumas 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 taškiniais 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 tikėtą 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 reiškimo 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 kokią 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 būseną 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 pasikliautiniai 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 waste 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 phytoplankton 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***I 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

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
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 × 10 ^{–8}	3–4 × 10 ^{–8}	3–4 × 10 ^{–8}	1–2 × 10 ^{–8}	2–3 × 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 μE·m^{–2}·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 atskiros 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 sukurinis 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 priedelis

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 ₄ Cl			15,0	0,280
MgCl ₂ ·6(H ₂ O)	12,16	0,0598	12,0	0,0590
CaCl ₂ ·2(H ₂ O)	4,41	0,0300	18,0	0,122
MgSO ₄ ·7(H ₂ O)	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K ₂ HPO ₄	1,044	0,00599		
KH ₂ PO ₄			1,60	0,00919
FeCl ₃ ·6(H ₂ O)	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
Na ₂ EDTA·2(H ₂ O)	0,300	0,000806	0,100	0,000269 (*)
H ₃ BO ₃	0,186	0,00300	0,185	0,00299
MnCl ₂ ·4(H ₂ O)	0,415	0,00201	0,415	0,00210
ZnCl ₂	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
CoCl ₂ ·6(H ₂ O)	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
Na ₂ MoO ₄ ·2(H ₂ O)	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
CuCl ₂ ·2(H ₂ O)	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 Na₂SiO₃·9H₂O 1,4 mg Si/l koncentracijai gauti.

Terpės pH vertė gaunama, nusistovėjus pusiausvyrai tarp karbonatinės sistemos ir atmosferos oro CO₂ 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 NaHCO₃/l, pH_{eq} = 7,5 (JAV AAA terpė) ir esant 50 mg NaHCO₃/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 ₄ Cl	1,5 g·l ⁻¹
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,2 g·l ⁻¹
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,8 g·l ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 g·l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,16 g·l ⁻¹
2 pradinis tirpalas: geležies	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	64 mg·l ⁻¹
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100 mg·l ⁻¹
3 pradinis tirpalas: mikroelementai	
H ₃ BO ₃	185 mg·l ⁻¹
MnCl ₂ ·4H ₂ O	415 mg·l ⁻¹
ZnCl ₂	3 mg·l ⁻¹
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,5 mg·l ⁻¹
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 mg·l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7 mg·l ⁻¹
4 pradinis tirpalas: hidrokarbonatas	
NaHCO ₃	50 g·l ⁻¹
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	

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 ruošama 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 CO₂ 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 tirpalą 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 tirpalą.

A1.2.1. NaNO_3 –12,750 g.

A1.2.2. $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ –6,082 g.

A1.2.3. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ –2,205 g.

A1.2.4. *Mitybinių makroelementų pradiniai tirpalai* – (žr. A1.3).

A1.2.5. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ –7,350 g.

A1.2.6. K_2HPO_4 –0,522 g.

A1.2.7. NaHCO_3 –7,500 g.

A1.2.8. $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ – 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. $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ –207,690 mg.

A1.3.3. ZnCl_2 –1,635 mg.

A1.3.4. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ –79,880 mg.

A1.3.5. $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ –0,714 mg.

A1.3.6. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ –3,630 mg.

A1.3.7. $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ –0,006 mg.

A1.3.8. $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ –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 $7,5 \pm 0,1$ 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 vienląsčių 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 šaltais. Šie tirpalai sterilizuojami filtravimu arba apdorojant autoklave.

Terpė ruošama į sterilų distiliuotą vandenį įpilant tikslų pradinio tirpalo kiekį, imantis priemonių apsaugoti ją nuo užkrėtimo. Ruošiant kietąją terpę įdedama 0,8 procento agarų.

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 agarų 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 kolbą 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 mikrobus 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 parametą, 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 $C \rightarrow 0$, ir prie nulio, kai $C \rightarrow$ 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 EC_{0+} , 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 vidutinės 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 tvirtesnę matematinę įvertinimą, mažiau paveiktą duomenų sistemingųjų 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 $EC_{low \times}$ skaičius. Pagal pritaikytą lygtį apskaičiuojami (taikant „atvirkštinį įvertinimą“ $C = f^{-1}(Y)$) būdingųjų taškų įverčiai EC_x , ir ataskaitoje pateikiamas bent EC_{50} įvertis ir vienas iš dviejų $EC_{low \times}$ 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:

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

Daug regresijos programų leidžia pasirinkti svertinės regresijos analizę, svertinius koeficientus pateikiant lentelėje. Būtų patogu svertinius koeficientus normalizuoti, dauginant juos iš $n/\sum w_i$ (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 dispersija. 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 pasikliautiniųjų 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 sukaupus 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 parametą, 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 pasikliautiniai intervalai

Netiesinės regresijos pasikliautinių 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), kuri sudaro matematinės lygties perrašymas pagal reikiamus taškų įverčius, pvz., EC_{10} ir EC_{50} kaip parametrus, kuriuos reikia įvertinti. (Tegul bus funkciją $I = f(\alpha, \beta, \text{koncentracija})$ ir naudojami apibrėžiamieji santykiai $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0,1$ bei $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0,5$ funkcijai $f(\alpha, \beta, \text{koncentracija})$ pakeisti lygiaverte funkcija $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{koncentracija})$).

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.

▼B**C.4. „LENGVO“ BIOLOGINIO SKAIDOMUMO MATAVIMAS****I DALIS. BENDRIEJI KLAUSIMAI****I.1. ĮVADAS**

Aprašyti šeši metodai, kurie leidžia chemines medžiagas rūšiuoti pagal jų biologinio skaidomumo aerobinėje vandeninėje terpėje lengvumą:

- a) Ištirpusios organinės anglies (DOC) išnykimo (Die-Away) (C.4-A metodas)
- b) Modifikuotas OECD (Organization for Economic Cooperation and Development -Ekonominio bendradarbiavimo ir vystymosi 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)
- e) Uždarnosios 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 pateikiami apibrėžimai, formulės ir rekomendacijos.

OECD tarplaboratorinio lyginimo bandymai, daryti 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 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 III priede. Vidutiniškai lakios cheminės medžiagos gali būti bandomos DOC išnykimo metodu, jei bandymų 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.

▼**B**

1 lentelė

Bandymų 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	+	+/-	+
Uždarnosios kolbos	Respirometrija: ištirpęs deguonis	+/-	+	+
MIT1	Respirometrija: deguonies suvartojimas	+	+/-	+

Norint interpretuoti gautus rezultatus, ypač kai rezultatai yra maži arba nežymūs, 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 suskaidymo 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 padaryta prielaida, kad reikėtų rasti etaloninę medžiagą, kuri būtų lengvai biologiškai skaidoma, tačiau tik kai yra įdėta sėjimo kultūros. Buvo pasiūlytas kalio hidroftalatas, tačiau prieš tai kaip priimti jį kaip etaloninę medžiagą, reikia apie ją surinkti daugiau duomenų.

Respirometriniuose bandymuose junginiai su azotu gali turėti įtakos deguonies vartojimui dėl nitrifikavimo (žr. 2 ir 5 priedėlius).

I.4. BANDYMŲ METODO ESMĖ

Į bandomosios medžiagos tirpalą arba suspensiją mineralinėje terpėje dedama sėjimo kultūra ir tirpalas inkubuojamas aerobinėmis sąlygomis tamsoje arba išsklaidytoje šviesoje. DOC kiekis bandomosios medžiagos tirpale, kuris atitinka sėjimo kultūrą, turi būti kiek įmanoma mažesnis lyginant su bandomosios medžiagos DOC kiekiu. Atsižvelgiama į sėjimo kultūros endogeninį aktyvumą, lygiagrečiai darant 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 daromas bandymas su etalonine medžiaga.

▼B

Bendruoju atveju, skaidymo eiga sekama nustatant parametrus, pvz., DOC, CO₂ 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 suskaidymą 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 daromi ilgiau nei 28 paros, 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 sėjimo kultūros bakterijų populiacijos mišrios sudėties matavimai turi būti daromi bent du kartus.

Yra bendras patyrimas, 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 būti didelė sklaida tarp rezultatų, gautų skirtingose laboratorijose, tačiau lengvai biologiškai skaidomų junginių atveju paprastai gaunamas geras sutapimas.

I.5.2. Bandymų tinkamumas

Bandymas yra validus, jei skirtumas tarp bandomosios medžiagos šalinimo pakartotinai gautų kraštinių verčių gulsčioje kreivės dalyje, bandymo pabaigoje arba 10 parų lango pabaigoje, kas tinka, yra mažesnis kaip 20 %, ir jei etaloninės medžiagos skaidymo procentinė vertė iki 14 paros pasiekė lengvojo biologinio skaidymo lygį. Jei bet kuri iš šių sąlygų neįvykdyta, bandymas turi būti pakartotas. Dėl metodų tikslumo mažos vertės nebūtinai reiškia, kad bandomoji medžiaga aplinkos sąlygomis biologiškai neskaidoma, tačiau jos rodo, kad biologiniam skaidomumui nustatyti būtina dirbti toliau.

Jei toksiškumo bandyme, kuriame yra ir bandomoji medžiaga, ir etaloninė cheminė medžiaga, skaidymas po 14 parų yra mažesnis kaip 35 % (pagal DOC) arba mažesnis kaip 25 % (pagal ThOD arba ThCO₂), bandomosios cheminės medžiagos gali būti laikomos inhibuojančiomis (dar žr. 4 priedėlį). Bandymų serijos turi būti pakartotos, jei tai 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 vėliau to bandymo aprašyme.

▼B

2 lentelė

Bandymų sąlygos

Bandymas	DOC išnykimas	CO ₂ išsiskyrimas	Manometrinė respirometrija	OECD antranos bandymas	Uždarnosios kolbos bandymas	MITI (T)
Bandomosios medžiagos koncentracija mg/l mg DOC/l mg ThOD/l	10-40	10-20	100 50-100	10-40	2-10 5-10	100
Sėjimo kultūros koncentracija (ląstelių/l). apytikriai)	≤ 30 mg/l SS arba ≤ 100 ml ištakio/l (10 ⁷ -10 ⁸)			0,5 ml antrinio ištakio/l (10 ⁵)	≤ 5 ml antrinio ištakio/l (10 ⁴ -10 ⁶)	30 mg/l SS (10 ⁷ -10 ⁸)
Elementų koncentracija mineralinėje terpėje P N Na K Mg Ca Fe					11,6 0,13 8,6 12,2 2,2 9,9 0,05-0,1	29 1,3 17,2 36,5 6,6 29,7 0,15
pH	7,4±0,2					geriau 7,0
Temperatūra	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = ištirpusi organinė anglis	ThOD = teorinis deguonies poreikis	SS = Suspenduotos kietosios dalelės

I.6.1. Skiedimo vanduo

Naudojamas dejonizuotas arba distiliuotas vanduo, kuriame nebūtų inhibuojančios koncentracijos nuodingųjų medžiagų (pvz., Cu²⁺ 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 dar 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 uždarnosios kolbos bandyme, tačiau deguonies suvartojimas vandeniui turi būti mažas.

▼B**I.6.2. Pradiniai mineralinių komponentų tirpalai**

Norint ruošti bandomuosius tirpalus, ruošiami atitinkamų koncentracijų mineralinių komponentų pradiniai tirpalai. DOC išnykimo, modifikuotos OECD atrankos, CO₂ išsiskyrimo, manometrinės respirometrijos, uždarnosios 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 ₂ PO ₄	8,50 g
	kalio hidrofosfatas, K ₂ HPO ₄	21,75 g
	natrlio hidrofosfatas, dihidratas, Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	33,40 g
	natrlio hidrofosfatas, dihidratas, Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	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 ₂ O	36,40 g

Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro

c)	magnio sulfatas, heptahidratas, MgSO ₄ · 7 H ₂ O	22,50 g

Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro

d)	geležies (III) chloridas, heksahidratas, FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,25 g

Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 litro

Pastaba: jei nenorite ruošti šį tirpalą prieš patį bandymą, vienam tirpalo litrai 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 ruošiate mineralinėje terpėje arba cheminę medžiagą dedate 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.

▼B**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, CO₂ 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 dumblių*

Iš daugiausia buitines nuotekas valančio valymo įrenginio arba laboratorinio valymo įrenginio aeravimo tanko surinkite šviežią aktyviojo dumblo bandinį. Prireikus stambias daleles šalinkite filtruodami per tankų tinklinį filtrą ir toliau dumblą laikykite aerobinėmis sąlygomis.

Kitaip, pašalinę visas stambias daleles, leiskite dumbliui nusistoti arba centrifuguokite (pvz., 10 min veikiant 1100 g). Skysti nuo dumblo pilkite lauk. Dumblą galite plauti mineraline terpe. Suspenduokite koncentruotą dumblą mineralinėje terpėje, kad suspenduotų kietų 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 nusistoti arba centrifuguokite, nupilkite nuo jo skystį ir išplautą dumblą dar kartą suspenduokite kitame mineralinės terpės tūryje. Šiuos veiksmus kartojate 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 homogenizuokite 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 dekantaukite 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 nusistoti 1 h arba filtruokite per stambų filtrinį popierių, ir dekantuoatą ištakį arba filtratą laikykite aerobinėmis sąlygomis, kol naudosite. Vienam litrui mineralinės terpės galima naudoti iki 100 ml šios rūšies sėjimo kultūros.

▼B

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 tuščių bandinių vertes. Laikoma, kad MITI bandymo sėjimo kultūrai pradinis kondicionavimas yra būtinas.

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 pasėtos kultūros. Sterilizuokite filtravimu per membraną (0,2–0,45 µm) arba pridėkite reikiamos koncentracijos tinkamos nuodingos medžiagos. Jei naudojamas filtravimas per membraną, sterilumui užtikrinti bandinius imkite steriliai. Jei bandomosios medžiagos adsorbcija nebuvo iš anksto pašalinta, bandymai, kuriuose 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 tipiškame 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 kultūrą ir sterilizavimo agentą,

— 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 įmanoma. Užtikrinkite, kad būtų paimtas pakankamas skaičius bandinių arba padaryta matavimų, norint įvertinti pašalinimo procentinę vertę po 10 parų lango.

▼B**I.7. DUOMENYS IR VERTINIMAS**

Skaičiuojant skaidymo procentinę vertę, D_t , naudojamos vidutinės vertės dviejų parametro matavimų bandymų kolboje ir tuščiajame bandinyje su sėjimo kultūra. Formulės pateiktos kituose konkrečius bandymus aprašančiuose skyriuose. Skaidymo eiga vaizduojama grafiškai ir pažymimas 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 veikti deguonies suvartojimą dėl nitrifikavimo (žr. 2 ir 5 priedėlius).

I.7.1. Skaidymas, nustatytas pagal DOC kiekio matavimą

Skaidymo procentinė vertė D_t kiekvieną kartą, kai buvo paimtas 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:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}} \right) \times 100$$

čia:

D_t = skaidymo % laiku t ,

C_o = vidutinė pradinė DOC koncentracija terpėje su bandomąja medžiaga ir pasėta kultūra (*DOC mg/l*),

C_t = vidutinė DOC koncentracija terpėje su bandomąja medžiaga ir pasėta kultūra laiku t (*DOC mg/l*),

C_{b0} = vidutinė pradinė DOC koncentracija tuščiojo bandinio terpėje su pasėta kultūra (*DOC mg/l*),

C_{bt} = vidutinė DOC koncentracija tuščiojo bandinio terpėje su pasėta kultūra (*DOC mg/l*).

Visos koncentracijos nustatomos eksperimentiškai.

I.7.2. Skaidymas, nustatytas darant specifinę analizę

Kai yra specifinės analizės duomenys, pradinis biologinis skaidymas skaičiuojamas pagal formulę:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

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).

▼ B**1.7.3. Abiotinis skaidymas**

Naudojant sterilų kontrolinį bandinį abiotiniam skaidymui nustatyti, abiotinio skaidymo procentinė vertė skaičiuojama pagal formulę:

$$\% \text{ abiotic degradation} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

čia:

$C_{s(o)}$ = DOC koncentracija steriliame kontroliniame bandinyje 0 parą

$C_{s(t)}$ = DOC koncentracija steriliame kontroliniame bandinyje t parą

I.8. ATASKAITA

Bandymų ataskaitoje turi būti pateikta, jei įmanoma, tokia informacija:

- bandomoji ir etaloninė cheminė medžiaga, jų grynumas,
- bandymų sąlygos,
- sėjimo kultūra: prigimtis ir ėmimo vieta (-os), koncentracija ir bet koks pradinis kondicionavimas,
- nuotekose esančių pramoninių nuotekų dalis ir kiekis, jei tai žinoma,
- bandymo trukmė ir temperatūra,
- apdorojimo būdas mažai tirpių cheminių medžiagų atveju,
- taikytas bandymų metodas; būtina moksliškai pagrįsti ir paaiškinti bet koki 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. METODO ESME**

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.

▼B

Skaidymas sekamas, 28 paras trumpais intervalais darant 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, daromą inkubavimo pradžioje ir pabaigoje.

II.2. METODO APRAŠYMAS

II.2.1. Aparatūra

- a) Kūginės kolbos, pvz., nuo 250 ml iki 2 litrų, tūris priklauso nuo DOC analizei reikalingo tūrio;
- b) Pustyklė, 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 ekvivalentinė DOC koncentracija būtų 10–40 mg/l. Patikrinkite pH vertę 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 bandomąja medžiaga be sėjimo kultūros, kad galėtumėte nustatyti, arba vyksta bandomosios medžiagos abiotinis skaidymas (žr. I.6.6.).

▼B

Papildomai, jei kyla įtarimas, kad bandomąją medžiagą žymiai adsorbuoja stiklas, dumblas ir t. t., padarykite parengiamąjį įvertinimą galimam adsorbcijos laipsniui nustatyti ir, tuo pačiu, bandymo tinkamumui šiai bandomajai medžiagai (žr. 1 lentelę). Paruoškite kolbą su bandomąja medžiaga, sėjimo kultūra ir sterilizavimo agentu.

Visus tirpalus kolbose skieskite mineraline terpe iki 1 l ir, tirpalus sumaišę, iš kiekvienos kolbos paimkite bandinį DOC pradinei koncentracijai nustatyti (žr. II.4 priedą). Uždenkite kolbų angas pvz., aliuminio folija taip, kad tarp kolbos ir ją supančios aplinkos būtų laisvi oro mainai. Tuomet bandymui pradėti įstatykite kolbas į purtyklę.

II.2.5. **Kolbų skaičius tipiškame 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. **Bandymų eiga**

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. II.4 priedą). 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.

▼ B

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. **BANDYMŲ 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 $C_{b(t)}$					

▼B

	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 vertė C _{c(t)}					
	4	d ₁					
		d ₂					
		d, vidutinė vertė C _{d(t)}					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. NEAPDOROTŲ DUOMENŲ VERTINIMAS

Kolba Nr.		% skaidymo po n parų				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Vidutinė vertė (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D₁ ir D₂ vidutinė vertė neturi būti skaičiuojamas, jei tarp jų yra didelis skirtumas.

Pastaba. Panašūs formatai gali būti taikomi etaloninei medžiagai ir toksiškumo kontroliniams handiniams.

7. ABIOTINIO SKAIDYMO KONTROLINIS BANDINYS
(neprivalomas)

	Laikas (paros)	
	0	t
DOC koncentracija (mg/l) steriliame kontro- liniame bandinyje	C _{s(o)}	C _{s(t)}

abiotinio skaidymo % = $\frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$

8. SPECIFINĖ CHEMINĖ ANALIZĖ (neprivaloma)

	Bandomosios medžiagos likutinis kiekis bandymo pabaigoje (mg/l)	% pirminio skaidymo
Sterilus kontrolinis bandinys	S _b	

▼B

	Bandomosios medžiagos likutinis kiekis bandymo pabaigoje (mg/l)	% pirminio skaidymo
Bandymo terpė su sėjimo kultūra	s_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

III DALIS. MODIFIKUOTAS OECD ATRANKOS BANDYMAS (C.4-B metodas)

III.1. METODO ESME

I 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 1 l terpės. Mišinys yra aeruojamas tamsoje arba išsklaidytoje šviesoje 22 ± 2 °C temperatūroje.

Skaidymas sekamas, 28 paras trumpais intervalais darant 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, daromą inkubavimo pradžioje ir pabaigoje.

III.2. 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 automatinio termostataavimu 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.

▼B

Mikroelementų tirpalas:

Mangano sulfatas, tetrahidratas, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	39,9 mg
Boro rūgštis, H_3BO_3	57,2 mg
Zinko sulfatas, heptahidratas, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	42,8 mg
Amonio heptamolibdatos, $(\text{NH}_4)_6 \text{MO}_7\text{O}_{24}$	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 kultūrą ruošama 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 litrai 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 ekvivalentinė DOC koncentracija būtų 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), 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 veikimui, į panašios koncentracijos bandomosios ir etaloninės medžiagų tirpalą mineralinėje terpėje įdėję sėjimo kultūros. Be to, jei reikia, paruoškite dar vieną sterilią kolbą su bandomąja medžiaga be sėjimo kultūros, kad galėtumėte nustatyti, arba vyksta bandomosios medžiagos abiotinis skaidymas (žr. I.6.6.).

Papildomai, jei kyla įtarimas, kad bandomąją medžiagą žymiai adsorbuoja stiklas, dumblas ir t.t., padarykite parengiamąjį įvertinimą galimam adsorbcijos laipsniui nustatyti ir, tuo pačiu, bandymo tinkamumui šiai bandomajai medžiagai (žr. 1 lentelę). Paruoškite kolbą su bandomąja medžiaga, sėjimo kultūra ir sterilizavimo agentu.

Visus tirpalus kolbose skieskite mineraline terpe iki 1 l ir, tirpalus sumaišę, iš kiekvienos kolbos paimkite bandinį DOC pradinei koncentracijai nustatyti (žr. II.4 priedą). Uždenkite kolbų angas

pvz., aliuminio folija taip, kad tarp kolbos ir ją supančios aplinkos būtų laisvi oro mainai. Tuomet bandymui pradėti įstatykite kolbas į purtyklę.

▼B**III.2.5. Kolbų skaičius tipiškame 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. Bandymų eiga

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 membranineį filtrą arba centrifuguokite (žr. II.4 priedą). 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**

▼ B

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 verte C _{c(t)}					
	4	d ₁					
		d ₂					
		d, vidutinė vertė C _{d(t)}					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. NEAPDOROTŲ DUOMENŲ VERTINIMAS

Kolba nr		skaidymo % po n parų				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼**B**

Kolba nr		skaidymo % po n parų				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}} \right) \times 100$	0				
Vidutinė vertė (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D₁ ir D₂ vidutinė vertė neturi būti skaičiuojamas, jei tarp jų yra didelis skirtumas.

Pastaba. Panašūs formatai gali būti taikomi etaloninei medžiagai ir toksiškumo kontroliniams handiniams.

7. **ABIOTINIO SKAIDYMO KONTROLINIS BANDINYS**
(neprivalomas)

	Laikas (dienos)	
	0	t
DOC koncentracija (mg/l) steriliame kontroliniame bandyme	C _{s(o)}	C _{s(t)}

abiotinio skaidymo % = $\frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$

8. **SPECIFINĖ CHEMINĖ ANALIZĖ** (neprivaloma)

	Bandomosios medžiagos likutis bandymo pabaigoje (mg/l)	Pirminis suirimas, %
Sterilus kontrolinis bandinys	S _b	
Bandymu terpė su sėjimu kultūra	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

IV DALIS. **CO₂ IŠSISKYRIMO BANDYMAS** (C.4-C metodus)

IV.1. **METODO ESME**

Žinomas mineralinės terpės su sėjimo kultūra turis, 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 atimant anglies dioksido, susidarančio tuščiajame bandinyje su sėjimo kultūra, kiekį) yra skaičiuojamas kaip procentinė ThCO₂ vertė. Kitaip biologinio skaidymo laipsnį galima skaičiuoti, nustatant papildomą DOC kiekį inkubavimo laikotarpio pradžioje ir pabaigoje.

▼B**IV.2. METODO APRAŠYMAS****IV.2.1. Aparatūra**

- a) 2-5 litrų talpos kolbos, kiekviena su aeravimo vamzdžiu, siekiančiu beveik indo dugną, ir išleidimo angą;
- 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 tiekiamą CO₂ neturinčio deguonies ir CO₂ neturinčio azoto mišinį, dujas maišant teisingu santykiu (20 % O₂: 80 % N₂);
- 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 2400 ml mineralinės terpės. Įpilkite atitinkam tūrį paruošto aktyviojo dumblo (žr. I.6.4.1. ir I.6.5.), kad suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija mišinio su sėjimo kultūra galutiname 3 l tūryje būtų ne didesnė kaip 30 mg/l. Kitas būdas, kai paruoštas dumblas iš pradžių skiedžiamas mineralinėje terpėje ruošiant 500 – 1000 mg/l suspensiją, po to alikvotinis šios suspensijos tūris pilamas į 5 litrų kolbos turinį, kad koncentracija būtų 30 mg/l; tai užtikrina didesnę preciziškumą. Galima naudoti kitus sėjimo kultūros šaltinius (žr. I.6.4.2).

Per naktį šiuos mišinius su sėjimo kultūra aeruokite CO₂ neturinčiu oru, kad iš sistemos būtų išvalytas anglies dioksidas.

▼B

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 III priede.

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 l, įpildami mineralinės terpės, prieš tai aeruojamos CO₂ neturinčiu oru. Neprivaloma, bet galima siurbti bandinius DOC analizei (žr. II.4 priedą) ir specifinei analizei. Prie kolbų oro išleidimo angų prijunkite dujų sugėrimo kolbas.

Jei naudojamas bario hidroksidas, prie kiekvienos 5 l 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, antroji būtų kontrolinė, siekiant parodyti, 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 suskaldant bandomąją medžiagą. Natrio hidroksido tirpalas, net šviežiai paruoštas, turi karbonatų pėdsakus; pataisa padaroma, atimant tuščiajame bandinyje susidariusio karbonato kiekį.

IV.2.5. **Kolbų skaičius tipiškame 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

8 kolba: toksiškumo kontrolinis bandinys

Žr. dar I.6.7.

IV.2.6. **Bandymų eiga**

Pradėkite bandymą, per suspensiją barbotuodami 30-100 ml/min oro be CO₂srautą. CO₂nustatyti periodiškai imkite anglies dioksido absorbento bandinius. Norint identifikuoti 10 parų lango periodą, rekomenduojama pirmąsias dešimt dienų analizę daryti kas antrą arba trečią dieną, o po to iki 28 paros – kas penktą dieną.

▼B

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 darykite paskutinę išsiskyrusio anglies dioksido analizę.

CO₂ matavimo dieną atjunkite arčiausiai kolbos prijungtą absorberį su bario hidroksidu, ir titruokite bario hidroksido tirpalą 0,05 M HCl 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. Iš kitos pusės, 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

Absorberijoje sugerto CO₂ kiekis nustatomas pagal tokią titravimo 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 HC 1 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 CO₂ masė nustatoma pagal lygtį:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml HCl sunaudoto titravimui} = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

Taigi šiuo atveju, titravimui sunaudoto HCl tūrio perskaičiavimo į susidariusio CO₂ mg faktorius yra 1,1.

Naudodami atitinkamas titravimo vertes, apskaičiuokite vien iš sėjimo kultūros bei iš sėjimo kultūros ir bandomosios cheminės medžiagos gauto CO₂ mases, ir šių masių skirtumas yra masė CO₂, 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,

$$\text{CO}_2 \text{ iš sėjimo kultūros} = 1,1 \times (50-48) = 2,2 \text{ mg}$$

▼ B

CO_2 iš sėjimo kultūros ir bandomosios cheminės medžiagos = $1,1 \times (50-45) = 5,5 \text{ mg}$

taigi, iš bandomosios cheminės medžiagos susidariusio CO_2 masė lygi 3,3 mg.

Procentine biologinio skaidymo vertė skaičiuojama pagal formulę:

$$\text{skaidymo \%} = \frac{\text{mg CO}_2 \text{ išsiskyrusio} \times 100}{\text{ThCO}_2 \times \text{mg pridėtos bandomosios cheminės medžiagos}}$$

arba,

$$\text{skaidymo \%} = \frac{\text{mg CO}_2 \text{ išsiskyrusio} \times 100}{\text{pridėtos bandyme TOC kiekis (mg)} \times 3,67}$$

3,67 yra anglies masės perskaičiavimo į anglies dvideginio 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:

$$\% \text{ ThCO}_2 = \frac{\text{IC kolboje su bandomą medžiaga (mg)} - \text{IC kolboje su tuščiuoju bandiniu (mg)}}{\text{TOC, pridėtos kaip bandomoji medžiaga, masė (mg)}} \times 100$$

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

▼ B

Pradinė koncentracija terpėje: mg/l, kaip cheminės medžiagos

Bendrasis į kolbą įdėtos C kiekis: mg C

Th CO₂: mg CO₂

4. SĖJIMO KULTŪRA

Šaltinis:

Kaip apdorota:

Pradinis kondicionavimas, jei toks buvo:

Suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija reakcijos mišinyje:
mg/l

5. ANGLIES DIOKSIKO SUSIKARYMAS IR SKAIDOMUMAS

Metodas: Ba(OH)₂/NaOH/kitas

Laikas (paros)	CO ₂ susidarę bandinyje (mg)		CO ₂ susidaręs tuščia- jame bandinyje (mg)		CO ₂ susidaręs bendras (mg) (bandinio vidutinė vertė minus tuščiojo bandinio vidutinė vertė)		ThCO ₂ bendras $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	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 handiniams.

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

▼B

$$\text{pašalintos DOC \%} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}} \right) \times 100$$

7. **ABIOTINIS SKAIDYMAS** (neprivalomas)

$$\text{abiotinio skaidymo \%} = \frac{\text{CO}_2 \text{ susidaro CO sterilioje kolboje po 28 parų (mg)}}{\text{ThCO}_2(\text{mg})} \times 100$$

V DALIS. **MANOMETRINIS RESPIROMETRINIS BANDYMAS** (C.4-D metodas)

V.1. METODO ESME

Išmatuotas mineralinės terpės su sėjimo kultūra tūris, turintis žinomos koncentracijos bandomąją cheminę medžiagą (100 mg/litre bandomosios medžiagos, duodančios bent 50-100 mg ThOD/litre), kuri nominaliai yra vienintelis organinės anglies šaltinis, pastovioje temperatūroje (± 1 °C arba tiksliau) maišomas graduotoje 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. Bandomąją cheminę medžiagą suvartoto deguonies kiekis (darant pataisą kiekiui deguonies, suvartotam lygiagrečiai daromame tuščiajame bandyme su sėjimo kultūra) yra reiškiamas procentine ThOD arba COD verte. Neprivalomai, iš papildomos specifinės analizės, daromos bandymo pradžioje ir pabaigoje, duomenų galima apskaičiuoti pirminį biologinį skaidymą, o darant DOC analizę – biologinį suskaidymą.

V.2. METODO APRAŠYMAS

V.2.1. **Aparatūra**

- a) tinkamas respirometras,
- b) termostatas, palaikantis temperatūra ± 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/litre).

▼B

ThOD skaičiuokite pagal amonio druskų susidarymą, jei nesitikite nitrifikavimo, kai skaičiuoti reikia pagal nitratų susidarymą (žr. II.2 priedą).

Nustatykite pH vertes ir prireikus nustatykite $7,4 \pm 0,2$.

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 III priede. Į CO₂-absorberio sekcijas įpilkite kalio hidroksido, natrio kalkių granulių arba kito absorbento.

V.2.5. **Kolbų skaičius tipiškame bandyme**

1 ir 2 kolba: bandomoji suspensija

3 ir 4 kolba: sėjimo kultūros tuščiasis bandinys

5 kolba: metodikos tikrinimo bandinys pageidautina bei kai būtina:

6 kolba: sterilus kontrolinis bandinys

7 kolba: toksiškumo kontrolinis bandinys

8 kolba: toksiškumo kontrolinis bandinys

Žr. dar I.6.7.

V.2.6. **Bandymų eiga**

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 užrašote būtinus rodmenis ir darote kasdienius tikrinimus, norėdami įsitikinti, arba teisinga temperatūra ir atitinkamas maišymas.

Pagal dažnai ir reguliariais tarpais 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 ThODNH₄ (azoto turintiems junginiams).

▼ B

Jei reikia, bandymo pradžioje ir pabaigoje iš respirometrinių kolbų paimkite bandinius DOC analizei arba specifinei cheminei analizei (žr. II.4 priedą). 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 (V priedas).

V.3. DUOMENYS IR ATASKAITA

V.3.1. Rezultatų apdorojimas

Padalinkite kiekį (mg) deguonies, suvartoto bandomąja chemine medžiaga per tam tikrą laiką (pataisytą kiekiu deguonies, suvartoto per tą patį laiką tuščiajame sėjimo kultūros bandinyje) iš paimtos bandomosios cheminės medžiagos masės. Taip gausite BOD, skaičiuojamą mg deguonies/mg bandomosios cheminės medžiagos, taigi:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg O}_2 \text{ suvartojimas bandomąja chemine medžiaga} - (\text{mg O}_2 \text{ suvartojimas tuščiajame bandinyje (mg))}{(\text{bandomosios medžiagos kolboje (mg)})}$$

= mg O₂ vienam mg bandomosios cheminės medžiagos

biologinio skaidymo procentinę vertę skaičiuokite pagal:

$$\text{biologinio skaidymo \%} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg cheminės medžiagos)}}{\text{ThOD (mg O}_2\text{ cheminei medžiagai)}} \times 100$$

arba pagal:

$$\% \text{ COD} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg cheminės medžiagos)}}{\text{COD (mg O}_2\text{ cheminės medžiagos)}} \times 100$$

Reikia pažymėti, kad šie du metodai nebūtinai duoda tą pačią vertę; geriau naudoti pirmesnį metodą.

Azoto turinčioms medžiagoms naudokite atitinkamas ThOD vertes (NH₄ arba NO₃) pagal tai, kas yra žinoma apie nitrifikavimo galimybę arba ko iš jo laukiama (II.2 priedas). Jei nitrifikavimas vyksta, tačiau ne iki galo, pataisas nitrifikuoti suvartotam deguoniui skaičiuokite pagal nitrito ir nitrato koncentracijų pokyčius (V priedas).

Kai neprivalomai daroma 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 O₂/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.

▼ B

V.3.3.

Žr. I.8.

V.4.

Toliau pateiktas specifikacijos pavyzdys.

MANOMETRINĖS RESPIROMETRIJOS BANDYMAS

1. LABORATORIJA

2. BANDYMO PRADŽIOS DATA

3. BANDOMOJI MEDŽIAGA

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija: mg/litre

Pradinė koncentracija terpėje, C_0 : mg/litre

Tūris bandymų kolboje (V): ml

ThOD arba COD: mg O₂/mg bandomosios medžiagos (NH₄ or NO₃)

4. SĒJIMO KULTŪRA

Šaltinis:

Kaip apdorota:

Pradinis kondicionavimas, jei toks buvo:

Suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija reakcijos mišinyje:
mg/l

5. DEGUONIES SUVARTOJIMAS: BIOLOGINIS SKAIDOMUMAS

[illegible]

▼B

		Czas (dni)											
		0		7		14			21			28	
$\frac{\text{BOD}}{\text{ThOD}} \times 100$	D ₁ (a ₁)												
	D ₂ (a ₂)												
	vidutinė vertė (*)												

V = terpės tūris bandymų kolboje
(*) D₁ ir D₂ vidutinė vertė neturi būti skaičiuojamas, jei tarp verčių yra didelis skirtumas.

Pastaba. Panašūs formatai gali būti taikomi etaloninei medžiagai ir toksiškumo kontroliniams handiniams.

6. PATAISA DĖL NITRIFIKAVIMO (žr. 5 priedėlį)

Para		0	28	Skirtumas
i)	Nitrato koncentracija (mg N/litre)			(N)
ii)	Degunies ekvivalentas (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
iii)	Nitrito koncentracija (mg N/litre)			(N)
iv)	Degunies ekvivalentas (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
ii + iv)	Bendrasis degunies ekvivalentas	—	—	

7. ANGLIES ANALIZĖ (neprivaloma)

Anglies analizatorius:

Laikas (paros)	Tuščiasis bandinys, mg/litre	Bandomoji cheminė medžiaga, mg/litre
0	C _{b(o)}	C ₀
28 (*)	C _{b(t)}	C _t

(*) arba inkubavimo pabaigoje

$$\text{DOC pašalinimas \%} = \left(1 - \frac{C_t - C_{\text{blt}}}{C_o - C_{\text{blo}}} \right) \times 100$$

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.

$$\text{biologinio skaidymo \%} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. ABIOTINIS SKAIDYMAS (neprivalomas)

a = degunies suvartojimas steriliose kolbose po 28 parų (mg)

$$\text{degunies suvartojimas mg bandomosios cheminės medžiagos} = \frac{a \times 100}{C_o V}$$

▼B

(žr. 1 ir 3 skyrius)

$$\text{abiotinio skaidymo \%} = \frac{a \times 100}{C_o V}$$

VI DALIS. UŽDAROSIOS KOLBOS BANDYMAS (C.4-E metodas)

VI.1 BANDYMŲ METODO ESMĖ

Į bandomosios cheminės medžiagos tirpalą mineralinėje terpėje, paprastai 2-5 mg/litre, dedama sėjimo kultūra, turinti palyginti mažai mikroorganizmų iš mišrios populiacijos, ir laikomas tamsoje visiškai pilnose ir uždarytose kolbose pastovios temperatūros sąlygomis. Skaidymas sekamas 28 paras analizuojant ištirpusį deguonį. Bandomąja medžiaga suvartotas deguonies kiekis, padarius pataisą deguoniui, suvartotam lygiagrečiai daromame tuščiajame bandyme su sėjimo kultūra, 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 litrai terpės naudokite nuo vieno lašo (0,05 ml) iki 5 ml filtrato; gali tekti daryti 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. Darykite kiekvieną bandymų grupę su mineraline terpe, pagaminta vienoje partijoje. 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/litre. Visus oru prisotintos terpės pernešimo ir užpildymo veiksmus darykite, neleidami susidaryti oro burbuliukams, pvz., naudodami sifonus.

▼B

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 sėjama kultūra, kad galėtumėte daryti bent po du deguonies suvartojimo matavimus tinkamais 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 terpę cheminių medžiagų nedėkite.

Norint užtikrinti, kad sėjimo kultūros aktyvumas nebūtų ribojamas, deguonies koncentracija BOD kolbose neturi sumažėti daugiau kaip iki 0,5 mg/litre. Tai nustato maždaug 2 mg/litre ribą bandomosios cheminės medžiagos koncentracijai. Tačiau sunkiai skaidomų junginių ir tų junginių, kurių ThOD mažas, koncentracija gali būti 5–10 mg/litre. Kai kuriais atvejais būtų patartina daryti lygiagrečias bandymų serijas su dviem bandomosios cheminės medžiagos koncentracijomis, pvz., 2 ir 5 mg/litre. Paprastai ThOD skaičiuokite pagal amonio druskų susidarymą, tačiau, jei manoma arba žinoma, kad gali vykti nitrifikavimas, skaičiuokite remdamiesi nitrato susidarymu (ThOD_{NO3}: žr. 2 priedėlį). Jei nitrifikavimas vyksta, tačiau ne iki galo, pataisas nitrifikuoti suvartotam deguoniui skaičiuokite pagal nitrito ir nitrato koncentracijų pokyčius (5 priedėlis)

Jei turi būti ištirtas bandomosios medžiagos toksiškumas (pvz., jei anksčiau buvo nustatytos mažos biologinio skaidomumo vertės), reiki 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/litre) 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 tipišrame bandyme**

Tipišrame 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),

▼ **B**

— ir, kai būtina, 6 kolbos su bandomąja chemine medžiaga, etalotine 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. Bandymų eiga

Naudodami žarną, nuleistą į apatinę 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 deguonies koncentraciją kolbose, taikydami Winkler'io arba elektrodo metodą. Kolbų turinį galite išsaugoti analizei Winkler'io metodu vėliau, pridėdami mangano (II) sulfato ir natrio hidroksido (pirmasis Winkler'io 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 darydami likusius veiksmus pagal Winkler'io 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 medžiagoms turi būti daroma pataisa dėl deguonies suvartojimo bet kokiame nitrifikavimo procese. Tai padaryti taikykite O₂-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 O₂/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 skaidomumo procentinę vertę skaičiuokite dalindami savitąjį BOD iš savitojo ThOD (apskaičiuoto pagal II.2 priedą) arba COD (nustatyto analizės būdu, žr. II.3 priedą), taigi:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{O}_2 \text{ suvartojimas bandomąja chemine medžiaga (mg)} - \text{mg O}_2 \text{ suvartojimas tuščiajame bandinyje (mg)})}{(\text{bandomosios medžiagos kiekis kolboje (mg)})}$$

▼ B

= kiekis O₂ (mg) vienam mg bandomosios cheminės medžiagos

$$\text{skaidymo \%} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg bandomosios cheminės medžiagos)}}{\text{ThOD (mg O}_2\text{/mg bandomosios cheminės medžiagos)}} \times 100$$

Arba

$$\text{skaidymo \%} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg bandomosios cheminės medžiagos)}}{\text{COD (mg O}_2\text{/mg bandomosios cheminės medžiagos)}} \times 100$$

Reikia pažymėti, kad šie du metodai nebūtinai duoda tą pačią vertę; geriau naudoti pirmesnį metodą.

Azoto turinčioms medžiagoms naudokite atitinkamas ThOD vertes (NH₄ arba NO₃) pagal tai, kas yra žinoma apie nitrifikavimo galimybę arba ko iš jo laukiama (II.2 priedas). Jei nitrifikavimas vyksta, tačiau ne iki galo, pataisas nitrifikuoti suvartotam deguoniui skaičiuokite pagal nitrito ir nitrato koncentracijų pokyčius (V priedas).

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 O₂/mg bandomosios medžiagos

4. **SĖJIMO KULTŪRA**

Šaltinis:

Kaip apdorota:

▼ B

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)	Nitrato 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})				

▼ B

	Suvartota per n parų (mg/litre)			
	n ₁	n ₂	n ₃	
KOLBA 1: $\% D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{bandymo koncentracija} \times \text{cheminės medžiagos} \times \text{ThOD}}$				
KOLBA 2: $\% D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{bandymo koncentracija} \times \text{cheminės medžiagos} \times \text{ThOD}}$				
$D \% \text{ vidutinė vertė (*)} = \frac{D_1 - D_2}{2}$				
(*) Jei tarp lygiagrečių nustatymų yra didelis skirtumas, vidutinės vertės neskaiciuokite.				

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 TUŠČIAJE 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. METODO ESMĖ

Deguonies suvartojimas maišomu bandomosios medžiagos tirpalu arba suspensija mineralinėje terpėje, į kurią dedama specialiai auginta neadaptuotų mikroorganizmų kultūra, 28 paras automatiškai matuojamas tamsoje ir 25 ± 1 °C temperatūroje laikomame uždareme respirometre. Išsiskyręs anglies dioksidas absorbuojamas natrio kalkėmis. Biologinis skaidomumas reiškiamas deguonies suvartojimo (pataisyto dėl suvartojimo tuščiajame bandinyje) procentine teorinio suvartojimo (ThOD) dalimi. Be to, pirminio biologinio skaidomumo procentinė vertė skaičiuojama pagal papildomos specifinės cheminės analizės, daromos inkubavimo pradžioje ir pabaigoje, duomenis ir, neprivalomai, pagal DOC analizės duomenis.

VII.2. 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 CO₂ absorbentui laikyti;

▼B

b) Patalpa su pastovia temperatūra ir (arba) vandens vonia $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	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, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	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, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	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 naudojamos ir šalinamos įvairios cheminės medžiagos. Iš įvairiausių vietų, 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 nusistoti, 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 $23\frac{1}{2}$ h. Trisdešimt minučių po aeravimo pabaigos maždaug trečdalį viso skysčio virš nuosėdų išpilkite lauk 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 $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūra, pH turi būti 7 ± 1 , dumblas turi gerai nusistoti, turi būti pakankamas aeravimas, kad mišinys visą laiką būtų aerobinis, turi būti paprasčiausių vienaląsčių ir dumblo aktyvumas turi būti tikrinamas pagal etaloninę medžiagą bent kas tris mėnesius. Dumblo kaip sėjamos 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.

▼B

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 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 CO₂ absorbento. Kolbose nr. 2, 3 ir 4 nustatykite pH vertę 7,0.

VII.2.5. Bandymų eiga

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. Kasdieną tikrinkite temperatūrą, purtyklę ir kulonometrinį deguonies suvartojimo registravimo įrenginį bei stebėkite bet kokius kolbų turinio spalvos kitimus. Deguonies suvartojimo rodmenis šešioms kolboms registruokite tiesiogiai tinkamu metodu, pvz., šešių taškų savirašiu, rašančiu BOD kreivę. Inkubavimo pabaigoje, kuris paprastai tęsiamas 28 paras, išmatuokite kolbų turinio pH ir nustatykite likusios bandomosios medžiagos ir kiekvieno tarpinio produkto koncentraciją, o vandenyje tirpios medžiagos – DOC koncentraciją (II.4 priedas). Imkitės ypatingų priemonių lakiųjų cheminių medžiagų atveju. Jei laukiate, 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, suvartoto bandomąja chemine medžiaga per tam tikrą laiką ir pataisytą kiekiu deguonies, suvartoto per tą patį laiką tuščiajame sėjimo kultūros bandinyje, iš paimtos bandomosios cheminės medžiagos masės. Tai duoda BOD, skaičiuojamą mg deguonies/mg bandomosios medžiagos, taigi:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{O}_2 \text{ suvartojimas bandomąja chemine medžiaga (mg)} - \text{mg O}_2 \text{ suvartojimas tuščiajame bandinyje (mg)})}{(\text{bandomosios medžiagos kiekis kolboje (mg)})}$$

= kiekis O₂ (mg) vienam mg bandomosios cheminės medžiagos

▼B

Tuomet biologinio skaidymo procentinė vertė gaunama pagal lygtį:

$$\text{skaidymo \%} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg cheminės medžiagos)}}{\text{ThOD (mg O}_2\text{/mg cheminės medžiagos)}} \times 100$$

Mišiniams ThOD skaičiuokite pagal elementinę analizę, kaip paprastam junginiui. Naudokite atitinkamas ThOD (ThOD_{NH4}, arba ThOD_{NO3}) vertes pagal tai, ar nitrifikavimas nevyksta, ar jis yra visiškas (II.2 priedas). Jei nitrifikavimas vyksta, tačiau ne iki galo, pataisas nitrifikuoti suvartotam deguoniui skaičiuokite pagal nitrito ir nitrato koncentracijų pokyčius (V priedas).

Pirminio biologinio skaidymo procentinę vertę skaičiuokite pagal specifinės (pradinės) cheminės medžiagos kiekio mažėjimą (žr. I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100 \%$$

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 procentinę vertę.

Kai daromi DOC nustatymai (neprivalomi), apskaičiuokite biologinio suskaidymo procentinę vertę pagal:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100 \%$$

DOC kiekis sumažėjo, DOC koncentraciją šioje kolboje naudokite apskaičiuoti biologinio skaidymo procentinę vertę.

Visus rezultatus užrašykite pateiktose specifikacijose.

VII.3.2. **Rezultatų tinkamumas**

Paprastai deguonies suvartojimas sėjimo kultūros tuščiajame bandinyje per 28 paras yra 20-30 mg O₂/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 nevalidus..

VII.3.3. **Ataskaita**

Žr. I.8.

VII.4. SPECIFIKACIJA

Toliau pateiktas specifikacijos pavyzdys.

MITI (I) BANDYMAS

1. LABORATORIJA

2. BANDYMO PRADŽIOS DATA

▼ B

3. BANDOMOJI MEDŽIAGA

Pavadinimas:

Pradinio tirpalo koncentracija: mg/l kaip cheminės medžiagos

Pradinė koncentracija terpėje, C₀: mg/l kaip cheminės medžiagos

Reakcijos mišinio tūris, V: ml

ThOD: mg O₂/l

4. SĖJIMO KULTŪRA

Dumblo bandinių ėmimo vietos:

(1) ...

(2) ...

(3) ...

(4) ...

(5) ...

(6) ...

(7) ...

(8) ...

(9) ...

(10)...

Suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija aktyviajame dumble po aklimatizavimo sintetinėmis nuotekomis =... mg/l

Aktyviojo dumblo tūris vienam litrai galutinai paruoštos terpės =... ml.

Dumblo koncentracija galutinai paruoštoje terpėje =... mg/l

5. DEGUONIES SUVARTOJIMAS. BIOLOGINIS SKAIDO-MUMAS

Naudoto respirometro tipas:

			Laikas (paros)				
			0	7	14	21	28
O ₂ suvartojimas (mg) bandomąja medžiaga	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	$\frac{(a - b)}{C_0 V}$	1 Kolba					
		2 Kolba					
		3 Kolba					
skaidymo % $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		vidutinė vertė (*)					

(*) Vidutinių verčių neskaičiuokite, jei tarp lygiagrečių nustatymų yra didelis skirtumai.

▼B

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 bandinys	c		—		—	—

pašalintos DOC % : $\frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$

7. SPECIFINĖS CHEMINĖS ANALIZĖS DUOMENYS

	Likutinis bandomosios medžiagos kiekis bandymo pabaigoje	% degradacija
Tuščiasis bandinys su vandeniu	S _b	
Terpė su sėjimo kultūra	S _{a1}	
	S _{a2}	
	S _{a3}	

skaidymo % = $\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

Apskaičiuokite skaidymo %, atitinkamai kolbose a1, a2 ir a3. .

8. PASTABA

Turi būti pridedama BOD kitimo laike kreivė, jei yra.

▼B*1 Priedėlis***SANTRUMPOS IR APIBRĖŽIMAI**

- DO: Ištirpęs deguonis (mg/l) yra vandeniniame bandinyje ištirpusio deguonies koncentracija.
- BOD: Biocheminis deguonies poreikis (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 poreikis (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 poreikis (mg) yra bendras deguonies kiekis, kurio reikia visiškai oksiduoti cheminę medžiagą jis skaičiuojamas pagal molekulinę formulę (žr. II.2 priedą), dar kitaip skaičiuojamas mg deguonies, suvartojamo oksiduoti 1 mg bandomosios medžiagos.
- ThCO₂: 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 kiekių suma.
- IC: Neorganinės anglies kiekis.
- TC: Bendrasis anglies kiekis yra bandinio organinės ir neorganinės anglies bendras kiekis.

Pirminis biologinis

skaidymas yra biologiškai veikiamos medžiagos cheminės sandaros pokytis, kai ji netenka tai medžiagai būdingų savybių.

Biologinis skaidymas (aerobinis):

tai pasiektas skaidymo lygis, kai mikroorganizmai bandomąją medžiagą visiškai suvartoja, susidarant anglies dioksidui, vandeniui, mineralinėms druskoms ir naujoms mikrobiologinėms ląstelinėms sudedamosioms dalims (biomasei).

Lengvai biologiškai skaidomas:

cheminių medžiagų, kurioms buvo daromi kai kurie apibrėžti atrankos pagal biologinį skaidymą bandymai, sutartinis klasifikavimas; šie bandymai yra tokie tikslūs, kad laikoma, kad vandens terpėse aerobinėmis sąlygomis tokie junginiai greitai ir visiškai biologiškai suyra.

▼B*Natūraliai biologiškai skaidomas:*

cheminių medžiagų, apie kurių biologinį suskaidymą (pirminį arba visišką) bet kokiame pripažintame biologinio skaidomumo bandyme yra neabejotinų duomenų, klasifikavimas.

Apdorojamumas:

yra galimybė medžiagas paversti šalinamais junginiais biologinio nuotekų valymo metu, neigiamai neveikiant normalios valymo procesų eigos. Dažniausiai lengvai biologiškai skaidomos medžiagos yra tinkamos apdoroti, bet ne visi junginiai iš prigimties yra biologiškai skaidomi. Gali vykti ir abiotiniai procesai.

Vėlavimo trukmė

yra laikas nuo sėjimo kultūros įdėjimo DOC išnykimo bandyme iki skaidymo procentinė vertė pasiekia bent 10 %. Vėlavimo trukmė dažnai yra labai kintamas dydis ir jo atkuriamumas blogas.

Skaidymo trukmė

yra laikas nuo vėlavimo laikotarpio pabaigos iki to laiko, kai skaidymas pasiekia 90 % didžiausios vertės lygį.

10 parų langas

10 parų iš karto po to, kai skaidymo vertė pasiekė 10 %.

▼B*2 Priedėlis***ATITINKAMŲ BENDRŲJŲ PARAMETRŲ SKAIČIAVIMAS IR NUSTATYMAS**

Nuo pasirinkto metodo priklauso, kokie bus reikalingi bendrieji parametrai. Siame 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 poreikis (ThOD)

Teorinis deguonies poreikis (ThOD) gali būti apskaičiuotas, jei žinoma elementinė sudėtis, arba jis gali būti nustatytas, darant elementinę analizę. Junginio:



jei nitrifikavimas nevyksta,

$$ThOD_{NH_4} = \frac{16 [2 c + 1/2 (h - cl - 3 n) + 3 s + 5/2 p + 1/2 na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

Kai nitrifikavimas vyksta

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16 [2 c + 1/2 (h - cl) + 5/2 n + 3 s + 5/2 p + 1/2 na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

3. Cheminis deguonies poreikis (COD)

Cheminis deguonies poreikis (COD) nustatomas pagal C.6 metodą.

4. Ištirpusi organinė anglis (DOC)

Ištirpusi organinė anglis (DOC) pagal apibrėžimą yra bet kurios cheminės medžiagos arba medžiagų mišiniovandenyje organinė anglis, praeinanti per 0,45 µm filtrą

Bandiniai iš bandymo indų siurbiami ir iš karto filtruojami filtravimo įtaisu, naudojant atitinkamą membraninį filtrą. Pirmuosius 20 ml (kiekis gali būti mažesnis, kai naudojami maži filtrai) filtrato pilama lauk. 10-20 ml tūrio arba mažesnius bandinius, jei jie įpurškiami (tūris priklauso nuo anglies analizatoriui reikalingo tūrio) paliekama anglies kiekiui analizuoti. DOC koncentracija nustatoma organinės anglies analizatoriumi, kuriuo būtų galima tiksliai nustatyti anglies koncentraciją atitinkančią 10 % bandyme naudotos pradinės DOC koncentracijos arba mažesnę.

Filtruotus bandinius, kurių negalima analizuoti tą pačią darbo dieną 48 h galima laikyti šaldytuve 2-4 °C temperatūroje, arba žemiau - 18 °C, jei laikoma ilgiau.

Pastabos

Membraniniai filtrai, kad būtų hidrofilieški, dažnai impregnuojami paviršinio aktyvumo medžiagomis. Todėl filtre gali būti iki kelių mg ištirpusios organinės anglies, kuri trukdytų biologinio skaidomumo nustatymams. Paviršinio aktyvumo medžiagos ir kitos tirpios organinės medžiagos iš filtrų šalinamos juos virinant tris kartus po vieną valandą dejonizuotame vandenyje. Filtrai toliau gali būti savaite laikomi vandenyje. Jei naudojamos vienkartinės filtravimo tūtos, kiekviena partija turi būti patikrinta, norint įsitikinti, kad nesusidaro ištirpusi organinė anglis.

▼B

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 $40\,000\text{ mx sec}^{-2}$ (4 000g) pagreičiu. Metodus nepatikimas, jei DOC pradinė koncentracija yra $< 10\text{ mg/l}$, 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 Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e. V.
- Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13 1), p. 169.



3 Priedėlis

MAŽAI TIRPIŲ MEDŽIAGŲ BIOLOGINIO SKAIDOMUMO VERTINIMAS

Mažai tirpių medžiagų biologinio skaidomumo bandymuose ypatingas dėmesys turi būti kreipiamas į šiuos 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 dispersiją. 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 pagalbinių medžiagų.

Bet kuris iš trijų respirometrinių bandymų, CO₂, BOD, MITI, gali būti taikomas tirti mažai tirpių junginių biologinį skaidomumą

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.



4 Priedėlis

CHEMINIŲ MEDŽIAGŲ, KURIOS GALI BŪTI NUODINGOS SĖJIMO KULTŪRAI, BIOLOGINIO SKAIDOMUMO VERTINIMAS

Kai tiriant cheminę medžiagą lengvo biologinio skaidomumo 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 skaidomumo bandymuose turi būti naudojama panaši arba identiška sėjimo kultūra.

Norint įvertinti toksiškumą cheminių medžiagų, tiriamų lengvo biologinio skaidomumo bandymuose, tiktu, kaip manoma, atskirai arba kartu taikyti dumblo kvėpavimo intensyvumo inhibavimo (aktyviojo dumblo kvėpavimo inhibavimo bandymas – direktyva 88/302/EEC), BOD ir (arba) augimo inhibavimo metodus.

Manoma, kad, jei reikia išvengti inhibavimo dėl medžiagos toksiškumo, bandymų medžiagų, naudojamų lengvo biologinio skaidomumo 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 skaidomumo bandymuose.

Mažesnės kaip 20 mg/l EC_{50} vertės greičiausiai turėtų kelti problemų toliau atliekamiems bandymams. Turi būti naudojamos mažos bandymo koncentracijos, dėl ko reikia taikyti tikslų ir jautrų uždarnosios kolbos metodą arba naudoti ^{14}C žymėtas medžiagas. Kitaip dar būtų galima naudoti aklimatizuotą sėjimo kultūrą, kuri, galbūt, leistų naudoti bandomąją medžiagą didesnės koncentracijos. Tačiau šiuo atveju prarandamas specifiskas lengvo biologinio skaidomumo bandymo kriterijus.

NUORODOS

Reynolds, L. et al.. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, p. 225.

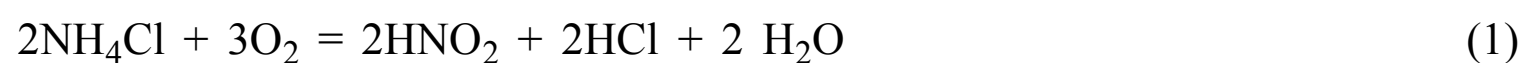


5 Priedėlis

DEGUONIES SUVARTOJIMO PATAISA DĖL NITRIFIKAVIMO KELIAMŲ TRUKDŽIŲ

Jei nekreipti dėmesio į nitrifikavimą kai biologinis skaidomumas vertinamas pagal deguonies suvartojimą bandomosiomis medžiagomis, 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 nevisiškas, stebimas deguonies suvartojimas reakcijos mišiniu gali būti pataisytas deguonies kiekiu, suvartotu amonio jonui oksiduoti į nitritą ir nitratai jei nitrito ir nitrato koncentracijų pokytis inkubavimo metu nustatomas atsižvelgiant į tokias reakcijų lygtis:



Suminė reakcija:



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 nitratai, 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 kaip didėti, taip ir mažėti; pastaruoju atveju susidarytų ekvivalentiškas kiekis nitrato. Taigi, deguonies, suvartoto nitratai 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.:

$$\text{O}_2 \text{ suvartotas nitratai susidaryti} = 4,57 \times \text{nitrato koncentracijos padidėjimo} \quad (4)$$

Ir

$$\text{O}_2 \text{ suvartota nitritui susidaryti} = 3,43 \times \text{nitrito koncentracijos padidėjimo} \quad (5)$$

Ir

$$\text{O}_2 \text{ netenkama dėl nitrito išnykimo} = -3,43 \times \text{nitrito koncentracijos padidėjimo} \quad (6)$$

Taigi

$$\text{O}_2 \text{ suvartojimas dėl nitrifikavimo} = \pm 3,43 \times \text{nitrito konc. pokyčio} + 4,57 \times \text{nitrato konc. Padidėjimo} \quad (7)$$

Ir todėl

$$\text{O}_2, \text{ suvartotas C oksiduoti} = \text{bendrasis stebėtas suvartotas kiekis} - \text{nitrifikavimui suvartotas kiekis} \quad (8)$$

Kitaip, jei nustatytas tik bendrasis oksiduoto azoto kiekis, tai kaip pirminė aproksimacija galima laikyti, kad deguonies suvartojimas dėl nitrifikavimo lygus $4,57 \times$ oksiduoto N koncentracijos padidėjimo.

Toliau angliai oksiduoti suvartoto deguonies kiekio pataisyta vertė lyginama su ThOD NH_3 verte, kuri skaičiuojama 2 priedėlyje.

▼B**C.5 SKAIDYMAS. BIOCHEMINIS DEGUONIES POREIKIS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Šio metodo tikslas yra išmatuoti kietųjų arba skystųjų organinių medžiagų biocheminį deguonies poreikį (BOD).

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 mažus rezultatus ir parinkti tinkamas bandomąsias koncentracijas, gali būti naudinga informacija apie cheminės medžiagos toksiškumą.

1.2. APIBRĖŽIMAS 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 atitinkamą etaloninę medžiagą, skirtą tikrinti sėjimo kultūros aktyvumą.

1.4. BANDYMŲ METODO ESMĖ

Gerai aeruojamoje tinkamoje terpėje ištirpinta arba disperguota medžiaga, kurios kiekis žinomas, veikiama mikroorganizmų kultūra ir tamsoje inkubuojama apibrėžtos pastovios temperatūros sąlygomis.

BOD yra nustatomas pagal ištirpusio deguonies kiekio skirtumą bandymo pradžioje ir pabaigoje. Bandymo trukmė turi būti ne mažesnė kaip penkios paros ir ne didesnė kaip 28 paros.

Lygiagrečiai turi būti daromas nustatymas tuščiajame bandinyje, kuriame nebūtų bandomosios medžiagos.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Negalima laikyti, kad BOD nustatymas yra validus medžiagos biologinio skaidomumo nustatymas. Į šį bandymą galima žiūrėti tik kaip į atrankos bandymą.

1.6. BANDYMŲ METODO APRAŠYMAS

Ruošiamas pradinis medžiagos tirpalas arba dispersija gauti BOD koncentracijai, atitinkančiai taikomą metodą. Tuomet pagal bet kurią atitinkamą nacionalinį arba tarptautinį standartizuotą metodą nustatomas BOD.

▼B**2. DUOMENYS IR ĮVERTINIMAS**

BOD pradiniam tirpale skaičiuojamas pagal parinktą standartinį metodą, ir verčiamas į BOD gramus vienam gramui bandomosios medžiagos.

3. ATASKAITA

Turi būti nurodytas taikytas metodas.

Biocheminis deguonies poreikis turi būti vidurkis bent trijų tinkamų matavimų.

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: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand. Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B**C.6. SKAIDYMAS. CHEMINIS DEGUONIES POREIKIS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Šio metodo tikslas yra standartiniu sutartu būdu išmatuoti kietųjų arba skystųjų organinių medžiagų cheminį deguonies poreikį (COD) nustatytomis laboratorinėmis sąlygomis.

Darant 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. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Cheminis deguonies poreikis yra medžiagos oksiduojamumo matas, reiškiamas oksidavimo agento, kurį suvartoja medžiaga nustatytomis laboratorinėmis sąlygomis, kiekiui ekvivalentiniu 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. BANDYMŲ METODO ESMĖ

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.

Bandyme 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. BANDYMŲ METODO APRAŠYMAS

Ruošiamas pradinis medžiagos tirpalas arba suspensija COD vertei nuo 250 mg iki 600 mg litre gauti.

⁽¹⁾ Norint išvengti gyvsidabrio išsisklaidymo aplinkoje, panaudoti tirpalai su gyvsidabrio druskomis turi būti apdoroti.

▼B*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 poreikį (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 medžiagas, pvz., acto rūgštį, kurias standartiniu metodu nustatyti sunku. Tačiau ir šiuo metodu nepasiseka nustatyti piridino. Jei kalio dichromato koncentraciją, kaip nurodyta 1) nuoroje, padidinti 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).

Šiaip 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 poreikis turi būti vidurkis bent trijų validžių matavimų. 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.

Sąrašas standartizuotų metodų, pvz.:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = Water analysis: Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B**C.7. SKAIDYMAS. ABIOTINIS SKAIDYMAS. HIDROLIZĖ KAIP pH FUNKCIJOS NUSTATYMAS****1. METODAS**

Šis bandymo metodas atitinka OECD TG 111 (2004).

1.1. ĮVADAS

Cheminės medžiagos gali patekti į paviršinius vandenius 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 cheminiam (pvz., hidrolizės, oksidacijos), fotocheminiam ir (arba) mikrobiologiniam 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. METODO 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 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 bandymą 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 priede. Kiekvieną pakopą lemia ankstesnės pakopos rezultatai.

▼B**1.5. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ**

Hidrolizės greičiui matuoti gali būti naudojama nežymėtoji arba žymėtųjų atomų turinti bandomoji medžiaga. Paprastai geriau naudoti žymėtąją medžiagą, kai reikia tirti hidrolizės kelią ir nustatyti masių balansą; tačiau atskirais atvejais žymėjimas nėra būtinas. Rekomenduojama žymėti ^{14}C , tačiau gali būti naudojami ir kiti izotopai, pvz., ^{13}C , ^{15}N , ^3H . 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 žymėtu atomu kitimui įvertinti ir atitinkamai informacijai apie hidrolizės produktų susidarymą gauti. Bandomosios medžiagos grynumas turi būti bent 95 %.

Prieš atliekant hidrolizės bandymą, būtina 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 virsmo vandenyje greitis, jei tinka.

Reikėtų turėti analizės metodus bandomosios medžiagos kiekiui nustatyti ir, jei tinka, hidrolizės produktams ir jų kiekiui vandeniuose tirpaluose nustatyti (žr. 1.7.2 skirsnį).

1.6. ETALONINIS MEDŽIAGOS

Jei įmanoma, turėtų būti naudojamos etaloninės medžiagos hidrolizės produktams ir jų kiekiui nustatyti, taikant spektroskopinius ir chromatografijos metodus arba kitus tinkamo jautrio 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.

▼B**1.7.2. Analizės metodo pakartojamumas ir jautris**

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 % arba mažesnės pradinės koncentracijos. Be to, prareikęs 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 pasiklivimo intervalai

Turėtų būti apskaičiuoti ir pateikti visų regresijos koeficientų, greičio konstantų, pusėjimo trukmės verčių ir visų kitų kinetinių parametrų (pvz., DT50) pasiklivimo 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 stiklu 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;

▼B

- 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 (detalės pateiktos 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**

Bandomoji medžiaga turi būti įpilama kaip vandeninis tirpalas į skirtingus buferinius tirpalus (žr. 3 priedą). 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., labai blogai tirpių bandomųjų medžiagų atveju), tai 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 viena antroji soties koncentracijos (žr. 1 priedėlį).

▼ **B**1.8.3. **Buferiniai tirpalai**

Hidrolizės bandymas turi būti atliekamas, kai pH vertės yra 4, 7 ir 9. Todėl turi būti paruošiami buferiniai tirpalai, naudojant analiziškai grynus reagentus ir vandenį. Kai kurios tinkamos buferinės sistemos pateiktos 3 priede. Reikia pažymėti, kad naudojama buferinė sistema gali daryti įtaką hidrolizės greičiui, ir ten, kur tai stebima, reikia naudoti kitą buferinę sistemą ⁽¹⁾.

Visų buferinių tirpalų 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 $\pm 0,5$ °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 kurią 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. Būtina 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 atliekami tol, kol hidrolizuojasi 90 % bandomosios medžiagos, bet ne ilgiau kaip 30 parų.

1.8.5. **Bandymo eiga**1.8.5.1. *Pradinis bandymas (1 pakopa)*

Pradinis bandymas atliekamas esant $50 \pm 0,5$ °C ir pH 4,0, 7,0 ir 9,0. Jei po 5 parų hidrolizuojasi mažiau kaip 10 % ($t_{0,5, 250c} > 1$ 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 %. Tokią informaciją galima gauti iš kitų šaltinių, pvz., giminingos struktūros junginių hidrolizės duomenys iš literatūros arba iš kitų

⁽¹⁾ *Mabey ir Mill* rekomenduoja vietoj fosfatinio naudoti boratinį arba acetatinį buferinį tirpalą (11).

⁽²⁾ Tokią informaciją galima gauti iš kitų šaltinių, pvz., giminingos struktūros junginių hidrolizės duomenys iš literatūros arba iš kitų pradinių, pusiau kiekybinių bandomosios medžiagos hidrolizės bandymų ankstesnėje parengtinėje stadijoje.

▼B1.8.5.2. *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 buferuotų 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. Imami atskiri kartotiniai bandiniai (bent du bandiniai iš atskirų reakcijos indų) ir jų turinys analizuojamas bent šešis kartus (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 galima užteršti bandomąjį tirpalą. 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, kurie sudaro bent > 10 % naudotos dozės, turėtų būti nustatomi taikant atitinkamus 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 priešasčių gali reikėti atlikti bandymą rūgštesnėje terpėje (pvz., kai pH yra 1,2) ir esant fiziologiškai artimai temperatūrai (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 pradinės koncentracijos % ir, prireikus, mg/l. Be to, naudojant žymėtąją bandomąją medžiagą, pateikiamas masių balansas, išreikštas 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 % pradinės 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.

▼B**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 pasiklivimo ribas) pateikiamos kiekvienai pH ir temperatūros vertei, kartu aprašomas taikytas modelis, kinetikos laipsnis ir determinacijos 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 (k_{H} , k_{neutral} ir k_{OH}) ir Arenijaus lygtimi:

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{H}}[\text{H}^+] + k_{\text{neutral}} + k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] = \sum_{i=\text{H,neutral,OH}} A_i e^{-B_i/T}$$

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 INTERPRETAVIMAS

Didžioji dalis hidrolizės reakcijų vyksta pseudopirmojo laipsnio reakcijos greičiu, taigi pusėjimo trukmės vertės nepriklauso nuo koncentracijos (žr. 2 priedo 4 lygtį). Dėl šios priežasties laboratorinius rezultatus, gautus 10^{-2} – 10^{-3} mol/l, paprastai galima taikyti aplinkos sąlygoms ($\leq 10^{-6}$ mol/l) (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. ATASKAITOS PATEIKIMAS**3.1. BANDYMŲ ATASKAITA**

Bandymų ataskaitoje turi būti ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

— įprastas pavadinimas, cheminis pavadinimas, CAS numeris, struktūrinė formulė (rodanti žymėtojo atomo padėtį, jei naudojama žymėtoji medžiaga) ir atitinkamos fizikocheminės savybės (žr. 1.5 skirsnį);

— bandomosios medžiagos grynumas (priemaišos);

— radiocheminis žymėtosios cheminės medžiagos grynumas ir molinis aktyvumas (jei tinka).

▼B

- Buferiniai tirpalai:
- ruošimo datos ir detalės;
- 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 bandymo laikotarpiu,
- mėginių ėmimo laikas,
- ekstrahavimo metodas (-ai),
- bandomosios medžiagos ir jos hidrolizės buferiniuose tirpaluose kiekybinio nustatymo ir nustatymo metodai,
- kartotinių bandinių skaičius.

Rezultatai:

- taikytų analizės metodų pakartojamumas ir jautris;
- 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 interpretavimas;
- 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 20 °C/25 °C temperatūrai, pH vertes, greičio konstantą [h^{-1} arba para^{-1}], pusėjimo trukmę arba DT_{50} , temperatūros vertes [$^{\circ}\text{C}$], įskaitant pasiklovimo ribas ir determinacijos koeficientus (r^2), arba palyginamąją informaciją;
- siūlomą hidrolizės kelią.

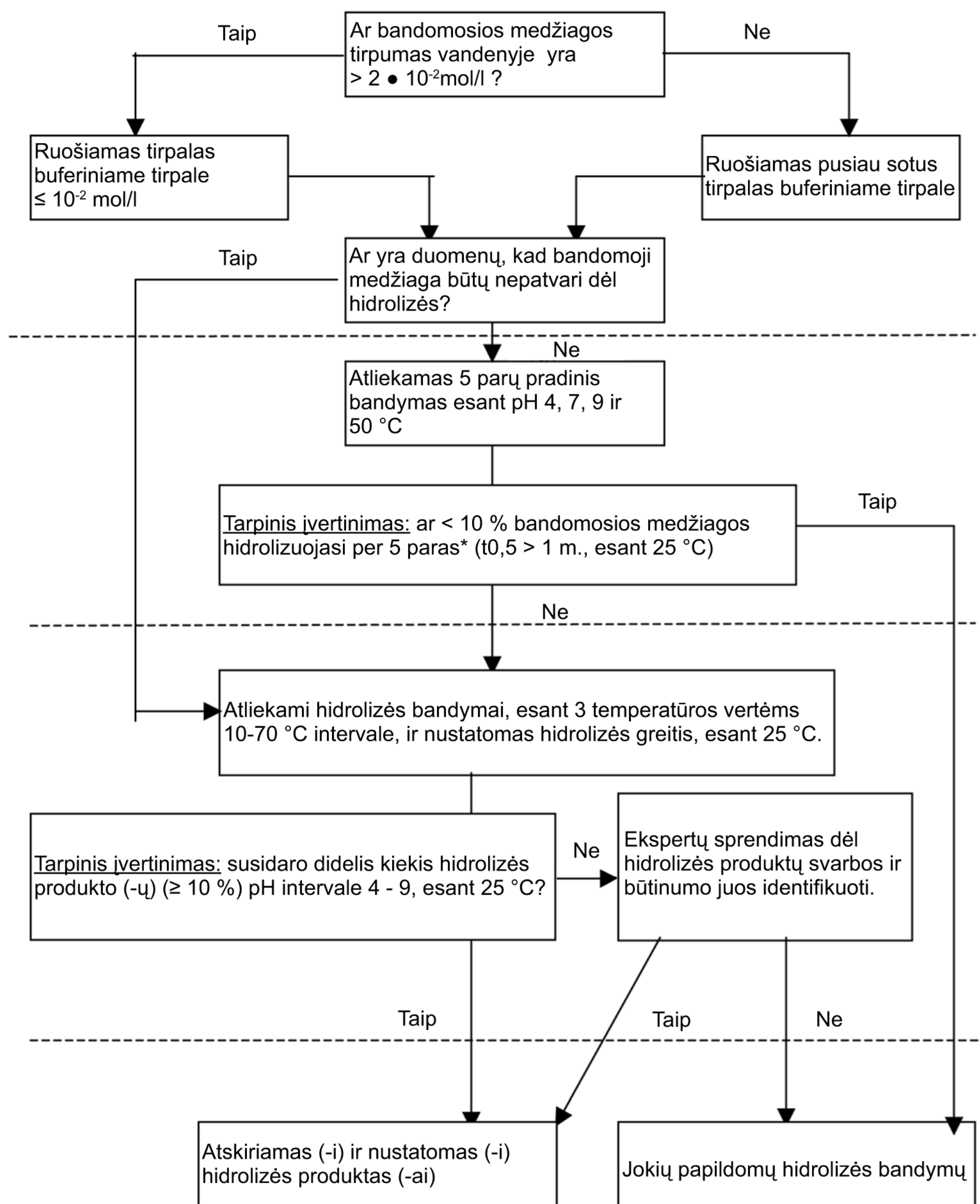
▼B4. **NUORODOS**

- 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 (EU) (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.



I Priedas

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

▼ B*2 Priedas***Apibrėžtys ir vienetai**

Visais atvejais turėtų būti naudojami **Tarptautinės vienetų sistemos (SI)** vienetai.

Bandomoji medžiaga – visos medžiagos, ar jos 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:



Pagal šią supaprastintą proceso lygtį RX koncentracijos mažėjimo greitis aprašomas lygtimi:

$$\text{greitis} = k [\text{H}_2\text{O}] [\text{RX}] \quad \text{antrojo laipsnio reakcija}$$

arba

$$\text{greitis} = k [\text{RX}] \quad \text{pirmojo laipsnio reakcija}$$

atsižvelgiant į greitį ribojančią stadiją. Kadangi palyginti su bandomosios medžiagos koncentracija vandens perteklius yra didelis, šio tipo reakcija paprastai aprašoma pseudopirmojo laipsnio reakcija, kurios matuojama greičio konstanta aprašoma lygtimi:

$$k_{\text{obs}} = k [\text{H}_2\text{O}] \quad [2]$$

ir gali būti nustatyta taikant šią išraišką (*):

$$\frac{k_{\text{obs}}}{t} \ln \frac{C_0}{C_t} \quad [3]$$

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:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{\text{obs}}} \quad [4]$$

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.

▼B

DT₅₀ (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 įvertis esant skirtingoms temperatūros vertėms

Kai reakcijos greičio konstantos žinomos dviem temperatūros vertėms, reakcijos greičio konstantos vertės kitai temperatūrai gali būti apskaičiuotos taikant Arėnijaus lygtį:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ arba } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

$\ln k$ kaip $1/T$ 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:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

čia: $T_2 > T_1$.

▼**B**

3 Priedas

Buferinių tirpalų sistemos

A. CLARK IR LUBS:

CLARK ir LUBS buferiniai mišiniai (*)

Sudetis	pH
0,2 mol/l HCl ir 0,2 mol/l 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 HCl + 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 mol/l kalio hidroftalato +0,1 mol/l HCl esant 20 °C	
46,70 ml 0,1 mol/l HCl + 50 ml hidroftalato iki 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 mol/l HCl + 50 ml hidroftalato iki 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 mol/l HCl + 50 ml hidroftalato iki 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 mol/l HCl + 50 ml hidroftalato iki 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 mol/l HCl + 50 ml hidroftalato iki 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 mol/l HCl + 50 ml hidroftalato iki 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 mol/l HCl + 50 ml hidroftalato iki 100 ml	3,4
97 ml 0,1 mol/l HCl + 50 ml hidroftalato iki 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 mol/l HCl + 50 ml hidroftalato iki 100 ml	3,8
0,1 mol/l kalio hidroftalato +0,1 mol/l NaOH esant 20 °C	
0,40 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml hidroftalato iki 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml hidroftalato iki 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml hidroftalato iki 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml hidroftalato iki 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml hidroftalato 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.

▼**B**

Sudetis	pH
23,85 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml hidroftalato iki 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml hidroftalato iki 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml hidroftalato iki 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml hidroftalato iki 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml hidroftalato iki 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml hidroftalato iki 100 ml	6,0

CLARK ir LUBS buferiniai mišiniai (tęsinys)

0,1 mol/l kalio dihidrofosfato +0,1 mol/l NaOH esant 20 °C	
5,70 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml fosfato iki 100 ml	8,0
0,1 mol/l H₃BO₃ + 0,1 mol/l KCl +0,1 mol/l NaOH esant 20 °C	
2,61 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml boro rūgšties iki 100 ml	10,0

B. KOLTHOFF IR VLEESCHOUWER:

KOLTHOFF ir VLEESCHOUWER citratiniai buferiniai tirpalai

Sudėtis	pH
0,1 mol/l kalio dihidrocitrato ir 0,1 mol/l HCl, esant 18 °C (*)	
49,7 ml 0,1 mol/l HCl + 50 ml citrato iki 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 mol/l HCl + 50 ml citrato iki 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 mol/l HCl + 50 ml citrato iki 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 mol/l HCl + 50 ml citrato iki 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 mol/l HCl + 50 ml citrato iki 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 mol/l HCl + 50 ml citrato iki 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 mol/l HCl + 50 ml citrato iki 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 mol/l HCl + 50 ml citrato iki 100 ml	3,6
0,1 mol/l kalio dihidrocitrato ir 0,1 mol/l NaOH, esant 18 °C (*)	
2,0 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml citrato iki 100 ml	6,0

(*) Apsaugai nuo pelėsiu augimo idedamas nedidelis timolio arba panašios medžiagos kristalas.

▼ B

C. SÖRENSEN:

SÖRENSEN boratiniai mišiniai

Sudetis		Sörensen 18 °C	Walbum, pH, esant		
ml borakso	ml HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 mol/l borakso +0,1 mol/l HCl					
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 mol/l borakso +0,1 mol/l 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 mol/l kalio dihidrofosfato + 0,0667 mol/l natrio hidrofosfato, esant 20 °C	
99,2 ml KH ₂ PO ₄ + 0,8 ml Na ₂ HPO ₄	5,0
98,4 ml KH ₂ PO ₄ + 1,6 ml Na ₂ HPO ₄	5,2
97,3 ml KH ₂ PO ₄ + 2,7 ml Na ₂ HPO ₄	5,4
95,5 ml KH ₂ PO ₄ + 4,5 ml Na ₂ HPO ₄	5,6
92,8 ml KH ₂ PO ₄ + 7,2 ml Na ₂ HPO ₄	5,8
88,9 ml KH ₂ PO ₄ + 11,1 ml Na ₂ HPO ₄	6,0
83,0 ml KH ₂ PO ₄ + 17,0 ml Na ₂ HPO ₄	6,2
75,4 ml KH ₂ PO ₄ + 24,6 ml Na ₂ HPO ₄	6,4
65,3 ml KH ₂ PO ₄ + 34,7 ml Na ₂ HPO ₄	6,6

▼ B

53,4 ml KH ₂ PO ₄ + 46,6 ml Na ₂ HPO ₄	6,8
41,3 ml KH ₂ PO ₄ + 58,7 ml Na ₂ HPO ₄	7,0
29,6 ml KH ₂ PO ₄ + 70,4 ml Na ₂ HPO ₄	7,2
19,7 ml KH ₂ PO ₄ + 80,3 ml Na ₂ HPO ₄	7,4
12,8 ml KH ₂ PO ₄ + 87,2 ml Na ₂ HPO ₄	7,6
7,4 ml KH ₂ PO ₄ + 92,6 ml Na ₂ HPO ₄	7,8
3,7 ml KH ₂ PO ₄ + 96,3 ml Na ₂ HPO ₄	8,0

▼B**C.8. TOKSIŠKUMO SLIEKAMS MATAVIMAS****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), tiriama medžiagos įtaka sliekų mirtingumui. Bandyme pateiktas metodas, kaip daryti palyginus greitą atranką medžiagų, kurios per odą ir virškinimo traktą veikia sliekus.

1.2. APIBRĖŽTIS IR VIENETAS

LC₅₀ – apytikriai apskaičiuota koncentracija medžiagos, kurią naudojant per bandymų laiką žūsta 50 % bandymų gyvūnų.

1.3. ETALONINĖ MEDŽIAGA

Periodiškai naudojama etaloninė medžiaga, kaip priemonė parodyti, kad bandymų sistemos jautrumas žymiai nepakito.

Etalonine medžiaga rekomenduojama naudoti analiziškai gryną chlo-racetamidą.

1.4. BANDYMO ESMĖ

Dirvožemis yra nepastovi terpė, todėl šiame bandyme naudojamas tiksliai apibrėžtas dirbtinis priemolio dirvožemis. Suaugę *Eisenia foetida* rūšies sliekai (žr. papildymo 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 projektuotas taip, kad atkuriamumas bandymo substrato ir organizmo atžvilgiu būtų kiek įmanoma geresnis. Mirtingumas kontroliniuose bandiniuose bandymo pabaigoje turi būti ne didesnis kaip 10 %, kitaip bandymas yra nevalidus.

1.6. BANDYMŲ METODO APRAŠYMAS**1.6.1. Medžiagos****1.6.1.1. B a n d y m o s u b s t r a t a s**

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),

▼B

- 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 bandymų 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 $6,0 \pm 0,5$.

b) Bandymų substratas

Bandymų 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 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje iki pastoviosios masės. Pagrindinis vertinimas, kiek reikia drėkinti dirbtinį dirvožemį, yra nesugerto vandens nebuvimas. 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. Bandymų indai

Maždaug vieno litro talpos stiklinis indas (tinkamai uždengtas plastiko dangčiu, lėkštele ar plastiko plėvele su ventiliacijos angomis), užpildytas tokiu kiekiu drėgno bandymų substrato ar kontrolinio substrato, kuris atitiktų 500 g sauso substrato masę.

1.6.2. *Bandymų sąlygos*

Indai turi būti laikomi nuolat apšviestose klimato kamerose $20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Apšvieta turi būti nuo 400 iki 800 liuksų.

Bandymo trukmė – 14 parų, tačiau mirtingumą dar neprivalomai galima vertinti po septynių parų nuo bandymo pradžios.

1.6.3. *Bandymų eiga*

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 nustatyta koncentracija, dėl kurios mirtingumas kinta nuo 0 iki 100 %.

▼B

Medžiaga turi būti išbandyta tokios koncentracijos: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg medžiagos kilogramui bandymo substrato (sausos masės).

Jei turi būti daromas 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, geometrine progresija sudarančias koncentracijas, kurios apima tik mirtingumo 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 pasiklivimo režius.

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 % mirtingumą, šių dviejų verčių pakanka pažymėti intervalą, į kurį patenka LC_{50} .

Pagrindinio bandymų substrato ir bandomosios medžiagos maišymas

Bandymų 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 medžiaga netirpsta vandenyje, ji gali būti ištirpinta kuo mažesniame tinkamo organinio tirpiklio tūryje (pvz., heksane, acetone ar chloroforme).

Bandomajai medžiagai soliubilizuoti, disperguoti ar emulguoti galima naudoti tik lengvai garuojančias medžiagas. Prieš naudojant bandymų substratas turi būti vėdinamas. Išgaravusio vandens kiekis turi būti papildytas. Kontroliniame bandinyje turi būti toks pat visų naudotų priedų 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 bandymų substrato, atitinkančio 500 g sauso substrato, ir ant bandymų substrato viršaus dedama 10 sliekų, kurie prieš tai 24 valandas buvo kondicionuoti panašiam šlapiame pagrindiniame substrate, po to greitai nuplauti vandeniu, vandens perteklių sugeriant filtriniu popieriumi.

▼B

Indai dengiami perforuotu plastikiniu dangčiu, lėkštele ar plėvele, kad substratas nedžiūtų, ir 14 parų laikomi bandymų sąlygomis.

Vertinimas turi būti daromas po 14 parų (ir neprivalomai po septynių parų) nuo bandymo pradžios. Substratas paskleidžiamas ant stiklinės ar nerūdijančio plieno plokštės. Sliekai apžiūrimi ir nustatomas gyvųjų slielių skaičius. Sliekai laikomi negyvais, jei jie neatsako į švelnų mechaninį priekinio galo dirginimą.

Kai tikrinimas daromas po septynių parų, indas vėl užpildomas substratu, ir likę gyvi sliekai dedami ant to paties bandymų substrato viršaus.

1.6.4. *Bandymų organizmai*

Bandymų organizmai turi būti suaugę *Eisenia foetida* (žr. priedėlio pastabą) (bent dviejų mėnesių amžiaus su *clitellum*), drėgnų slielių 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 žuvusių slielių.

Kai duomenys yra tinkami skaičiuoti, LC_{50} vertė ir pasiklovimo rėžiai ($p = 0,05$) turi būti nustatyti, taikant standartinius metodus (Litchfield and Wilcoxon, 1949, lygiaverčiam metodui). LC_{50} turi būti nurodyta mg bandomosios medžiagos vienam kilogramui (sausio) bandymų substrato.

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 % mirtingumą, šių dviejų verčių pakanka pažymėti intervalą, į kurį patenka LC_{50} .

3. **ATASKAITA**

3.1. BANDYMŲ ATASKAITA

Bandymų ataskaitoje turi būti pateikta, jei įmanoma, tokia informacija:

- tvirtinimas, kad bandymas buvo daromas pagal aukščiau minėtus kokybės kriterijus,
- darytas bandymas (intervalo nustatymo bandymas ir (ar) galutinis bandymas),
- tikslus bandymo sąlygų aprašymas arba tvirtinimas, kad bandymas buvo darytas pagal metodą; turi būti nurodyti visi nukrypimai,
- tikslus aprašymas, kaip bandomoji medžiaga buvo įmaišyta į pagrindinį bandymo substratą,
- informacija apie bandymų organizmus (rūšį, amžių, masės vidutinę vertę ir intervalą, laikymo ir auginimo sąlygos, tiekėjas),

▼B

- metodas, taikytas nustatyti LC₅₀,
- bandymų rezultatai, įskaitant visus naudotus duomenis,
- bandymų organizmų pastebėtų simptomų ar elgesio pokyčių aprašymas,
- mirtingumas kontroliniuose bandiniuose,
- LC₅₀ ar didžiausia bandyta koncentracija, kurioje mirtingumas nulinis, ir mažiausia bandyta koncentracija, kurioje mirtingumas 100 %, 14 parų (ir neprivalomai 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, J. 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. and Wilcoxon, 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 für land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden“, in: Rudolph/Boje, Okotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼B*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 laidumas 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 anderei* -to neturi ir yra margos rausvos spalvos. Jei įmanoma, turi būti naudojama *Eisenia foetida andrei*. Galima naudoti ir kitas rūšis, jei yra reikiamos metodikos.

▼B**C.9. BIOLOGINIS SKAIDYMAS****ZAHN-WELLENS BANDYMAS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS**

Metodo tikslas yra įvertinti vandenyje tirpių, nelakių organinių medžiagų galimą suskaidymą, kai jas statiniame bandyme veikia palyginti didelės koncentracijos mikroorganizmai.

Ant suspenduotų kietųjų dalelių gali vykti fizikocheminė adsorbcija, ir į tai turi būti atsižvelgta interpretuojant rezultatus (žr. 3.2).

Tiriamos medžiagos naudojamos tokios koncentracijos, kad ji 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 poreikis). Šios palyginti didelės koncentracijos turi analizinio patikimumo pranašumą. Junginiai, kurie turi toksiškų savybių, gali lėtinti arba inhibuoti skaidymo procesą.

Bandomosios medžiagos biologiniam suskaidymui įvertinti šiame bandyme taikomas ištirpusios organinės anglies koncentracijos arba cheminio deguonies poreikio matavimas.

Jei lygiagrečiai taikyti specifinį analizės metodą, gali būti įmanoma įvertinti medžiagos pirminį biologinį skaidymą (pirminės cheminės sandaros išnykimas).

Metodas tinka tik toms organinėms bandomosioms medžiagoms, kurios bandyme naudojamos koncentracijos:

- tirpios vandenyje bandymų sąlygomis,
- garų slėgis bandymo sąlygomis yra labai mažas,
- neinhibuoja bakterijų,
- bandymų sistemoje adsorbuojamos tik ribotu laipsniu,
- iš bandomojo tirpalo nepradingsta dėl putojimo.

Norint paaiškinti gautus rezultatus, ypač kai rezultatai yra maži arba nežymūs, naudinga būtų turėti informacijos apie bandomosios medžiagos pagrindinių komponentų santykinę dalį.

Kai reikia paaiškinti mažus rezultatus ir pasirinkti tinkamas bandomąsias koncentracijas, pageidautina turėti informacijos apie medžiagos toksiškumą mikroorganizmams.

▼B

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

Bandymo pabaigoje pasiektas skaidymo lygis ataskaitoje pateikiamas kaip „Biologinis skaidomumas Zahn-Wellens bandyme“:

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

čia:

DT = biologinis skaidymas (%) laiku T,

CA = DOC (ar COD) vertės bandomajame mišinyje po trijų valandų nuo bandymo pradžios (mg/l) (DOC = ištirpusi organinė anglis, COD = cheminis deguonies poreikis),

CT = DOC ar COD vertės bandomajame mišinyje bandinio ėmimo metu (mg/l),

CB = DOC ar COD vertė tuščiajame bandinyje bandinio ėmimo metu (mg/l),

CBA = 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.

Skirtumas tarp skaidymo vertės, išmatuotos po trijų valandų, ir paskaičiuotos, bet geriau išmatuotos, pradinės vertės gali suteikti naudingos informacijos apie medžiagos šalinimą (žr. 3.2. Duomenų interpretavimas).

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. BANDYMŲ METODO ESMĖ

Aktyvusis dumblas, mineralinė mitybinė terpė ir bandomoji medžiaga, kaip vienintelis anglies šaltinis vandeniniame tirpale, dedami kartu į vieno keturių litrų tūrio stiklinį indą turinti maišiklį ir aeratorių. 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 kasdieną ar per kitokį tinkamą vienodą laiko tarpą. Po kiekvieno matavimo nustatytos DOC (ar COD) pašalinimo vertės santykis su verte, gauta po trijų valandų nuo bandymo pradžios, reiškiamas procentine biologinio skaidymo verte ir yra naudojamas kaip tam momentui nustatytas skaidymo laipsnio matas. Rezultatas atidedamas kaip kitimas laike ir gaunama biologinio skaidymo kreivė.

Kai taikomas specifinis analizės metodas, galima nustatyti pradinės medžiagos koncentracijos mažėjimą dėl jos molekulių biologinio skaidymo (pirminis biologinis skaidomumas).

▼B

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Tarplaboratorinio lyginimo bandymas parodė, kad šio metodo atkuriamumas yra patenkinamas.

Metodo jautrumą dideliu laipsniu lemia tuščiojo bandinio kintamumas ir, kiek mažiau, ištirpusios anglies nustatymo preciziškumas ir bandomosios medžiagos kiekis skystyje..

1.6. BANDYMŲ METODIKOS APRAŠYMAS

1.6.1. *Pasirengimas*

1.6.1.1. Reagentai

Bandymų 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, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, A.R.: 33,4 g,

kalio dihidrofosfato, KH_2PO_4 , A.R.: 8,5 g,

kalio hidrofosfato, 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.

▼B

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 poreikiui nustatyti.

1.6.1.3. Sėjimo kultūros ruošimas

Aktyvusis dumblas iš biologinio valymo įrenginio yra plaunamas (kelis kartus), centrifuguojant arba nusodinant iš bandymų vandens (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. „Funkcinė kontrolė“, toliau.

1.6.1.4. Bandymų tirpalų ruošimas

Į bandymo indą įpilkite 500 ml bandymų 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 galutiniame mišinyje būtų nuo 50 iki 400 mg/litre. Atitinkamos COD vertės yra nuo 100 iki 1 000 mg/litre. Praskieskite bandymų vandeniu iki bendrojo tūrio nuo vieno iki keturių litrų. Tai, kokią bendrąją 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 su bandymų vandeniu iki to paties tūrio, kaip ir induose su bandomąja medžiaga.

1.6.2. *Bandymo eiga*

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 nenusistotų, o deguonies koncentracija būtų ne mažesnė kaip 2 mg/litre.

pH vertė turi būti tikrinama vienodais laiko tarpais (pvz., kasdien) ir, jei būtina, pH vertė nustatoma nuo 7 iki 8.

▼B

Garavimo nuostoliai reikiamaais kiekiais kompensuojami dejonizuotu ar distiliuotu vandeniu prieš 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 dumbly, 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 bandymų ir tuščiojo bandymo indų filtruojami per kruopščiai išplautą popieriaus filtrą. Pirmieji bandomojo tirpalo filtrato 5 ml pilami lauk. Sunkiai filtruojamas dumblas gali būti prieš tai pašalintas 10 minučių centrifugavimu. DOC ir COD nustatymas daromas bent po du kartus. Bandymo trukmė ne daugiau kaip 28 paros.

Pastaba. Jei bandiniai lieka drumsti, jie filtruojami per membraninius filtrus. Membraniniai filtrai neturi išskirti ar adsorbuoti jokių organinių medžiagų.

Aktyviojo dumblo veikimo tikrinimas

Norint patikrinti funkcinę aktyviojo dumblo gebą, lygiagrečiai kiekvienai bandymų serijai turi būti atliekamas bandymas su žinoma medžiaga. Buvo nustatyta, kad šiam tikslui tinka dietilenglikolis.

Adaptavimas

Jei analizė daroma 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 elgesį, tas pats aktyvusis dumblas dar kartą naudojamas su ta pačia bandomąja medžiaga pagal tokią metodiką:

Išjunkite maišytuvą ir aeratorių ir leiskite dumbly nusistoti. Skystį virš dumblo nusiurbkite, įpilkite ne daugiau kaip du litrus bandymų vandens, 15 minučių maišykite ir leiskite vėl nusistoti. 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 dumbly, kad sausos medžiagos koncentracija būtų nuo 0,2 iki 1 g/litre.

▼B**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 pilami lauk) 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 apibrėžimais), pateiktą 1.2 aukščiau.

Skaidymo laipsnis apvalinamas iki artimiausio sveikojo procentų skaičiaus. Bandymo pabaigoje pasiekto skaidymo procentinė vertė ataskaitoje pateikiama kaip „Biologinis skaidomumas Zahn-Wellens bandyme“.

Pastaba. Jei medžiaga visiškai suskaidoma dar nesibaigus bandymams skirtam laikui ir rezultatą patvirtina kitą dieną padaryta dar viena analizė, bandymą galima baigti.

3. ATASKAITA**3.1. BANDYMŲ ATASKAITA**

Bandymų ataskaitoje turi būti pateikta, 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, kur buvo imti bandymų organizmai, adaptavimo būseną, naudota koncentracija ir t. t.,
- mokslinis bet kokių bandymų metodikos keitimų pagrindimas.

3.2. DUOMENŲ INTERPRETAVIMAS

Dienas ar savaites vykstantis laipsniškas DOC (COD) šalinimas rodo, kad medžiaga biologiškai skaidoma.

▼B

Tačiau kai kuriais atvejais gali vykti fizikocheminė adsorbcija ir tai matyti, kai nuo bandymo pradžios per pirmąsias tris valandas vyksta dalinis ar visiškas pašalinimas, o skirtumas tarp kontrolinio ir bandomojo skysčių virš dumblo išlieka netikėtai mažas.

Jei reikia atskirti biologinį skaidymą (ar dalinį biologinį skaidymą) ir adsorbciją, būtina daryti 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 (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 praradimas, 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 , $^{14}\text{C}\text{O}_2$ surinkimas patvirtintų, kad biologinis skilimas 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 galiojimo 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 (OJ L 251, 1984 9 19, p. 1).

▼**B**

Priedėlis

VERTINIMO PAVYZDYS

Organinis junginys:	4-Etoksibenzenkarboninė 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 būseną:	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

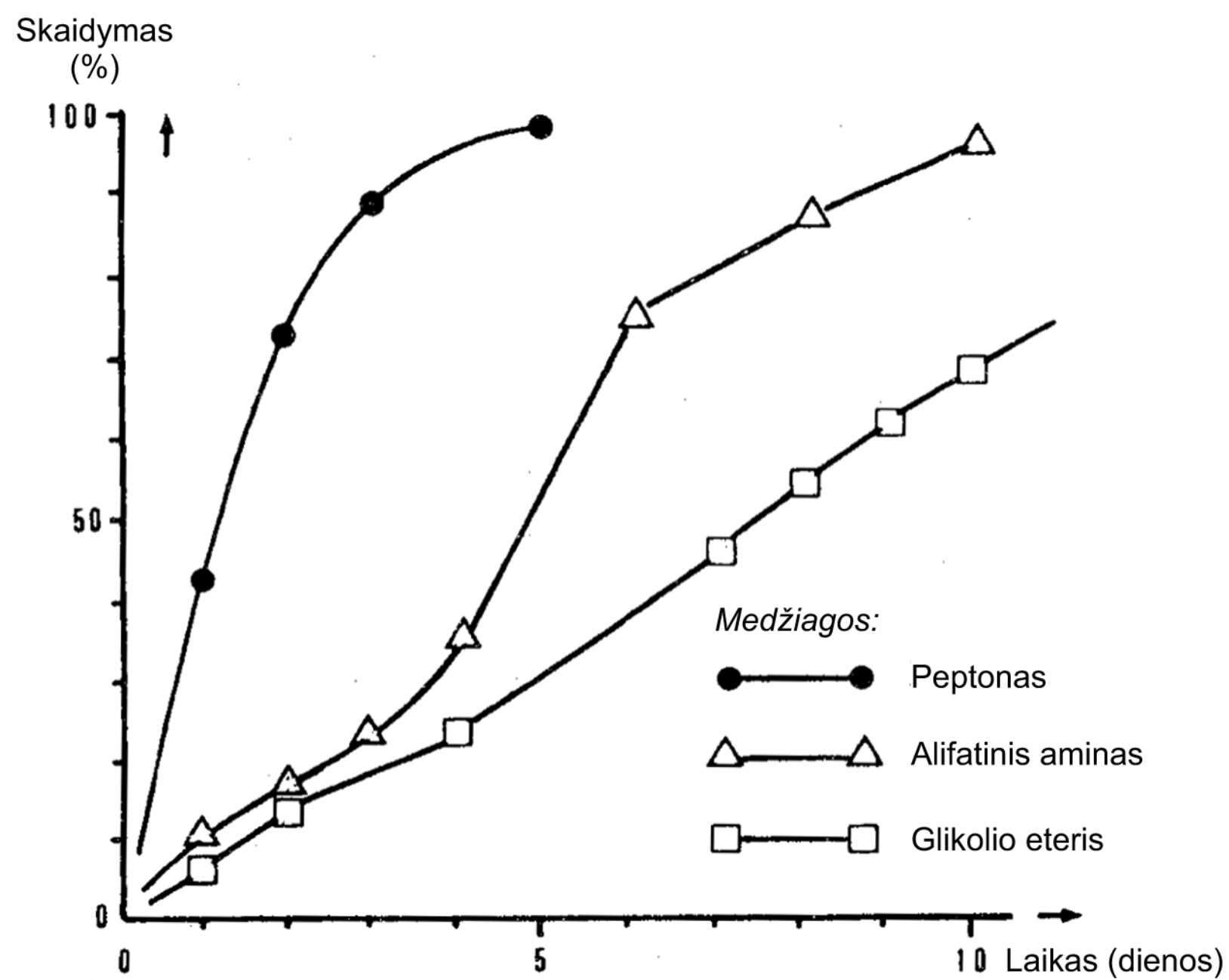
Bandymo trukmė	Kontrolinė medžiaga				Bandomoji medžiaga		
	Tuščiojo bandinio DOC ⁽¹⁾ mg/l	DOC ⁽¹⁾ mg/l	DOC tikrasis kiekis mg/l	Skaidymas %	DOC ⁽¹⁾ mg/l	DOC tikrasis kiekis mg/l	Skaidymas %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 valandos	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 para	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 paras	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 paras	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 paras	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 paras	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 paras	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 paras	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.

▼ B

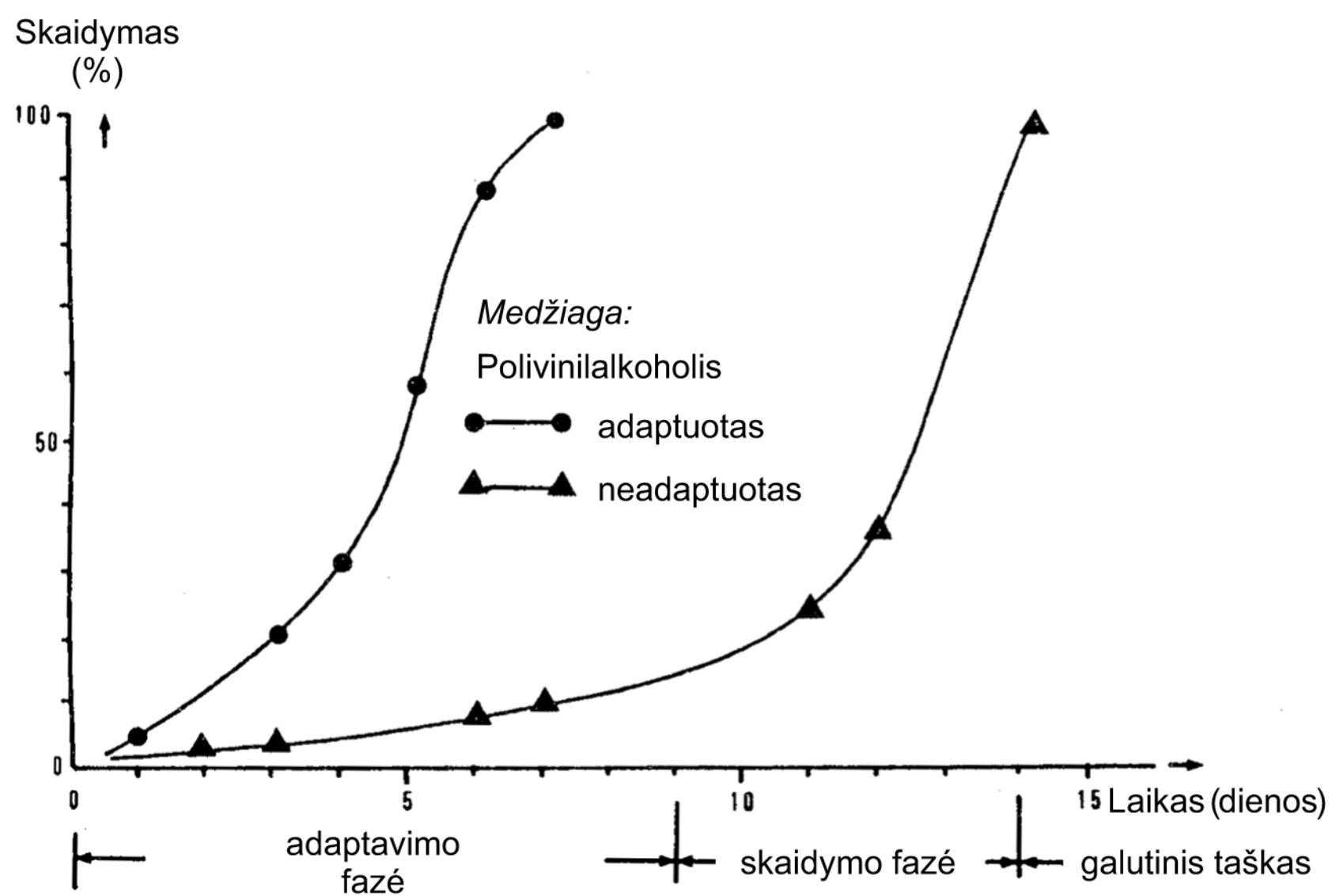
1 paveikslas

Biologinio skaidymo kreivių pavyzdžiai



2 paveikslas

Dumblo adaptavimo pavyzdžiai



▼B**C.10. BIOLOGINIS SKAIDYMAS****AKTYVIOJO DUMBLO MODELIAVIMO BANDYMAS****1. METODAS****1.1. ĮVADAS****1.1.1. Bendrosios pastabos**

Metodas tinka tik toms organinėms medžiagoms, kurios bandyme naudojamos koncentracijos:

— vandenyje yra tirpios tiek, kad pakanka ruošti bandomuosius tirpalus,

— garų slėgis bandymo sąlygomis yra labai mažas,

— neinhibuoja bakterijų.

Norint paaiškinti gautus rezultatus, ypač kai rezultatai yra maži arba nežymūs, naudinga būtų turėti informacijos apie bandomosios medžiagos pagrindinių komponentų santykinę dalį.

Kai reikia paaiškinti mažus rezultatus ir pasirinkti tinkamas bandomąsias koncentracijas, pageidautina turėti informacijos apie medžiagos toksiškumą mikroorganizmams.

1.1.2. Biologinio suskaidomumo nustatymas (DOC/COD analizė)

Metodo tikslas yra nustatyti biologinį suskaidomumą, matuojant medžiagos ir bet kurių jos metabolitų šalinimą aktyviojo dumblo įrenginio modelyje, kai medžiagos koncentracija didesnė kaip > 12 mg DOC/litre (ar maždaug 40 mg COD/litre); manoma, kad 20 mg DOC/litre koncentracija yra optimali (DOC = ištirpusi organinė anglis; COD = cheminis deguonies poreikis).

Turi būti nustatytas organinės anglies kiekis bandomojoje medžiagoje (ar cheminis deguonies poreikis).

1.1.3. Pirminio biologinio skaidomumo nustatymas (specifinė analizė)

Metodo tikslas yra nustatyti pirminį medžiagos biologinį skaidomumą aktyviojo dumblo įrenginio modelyje, taikant specifinę analizės metodą, kai medžiagos koncentracija yra apie 20 mg/litre (galima naudoti didesnę ar mažesnę koncentraciją, jei tai leidžia analizės metodas ir toksiškumo sumetimai). Tai leidžia įvertinti medžiagos pirminį biologinį skaidomumą (pradinės cheminės sandaros junginio išnykimą).

Šio metodo tikslas nėra nustatyti bandomosios medžiagos mineralizavimą.

Būtina turėti atitinkamą analizės metodą bandomajai medžiagai nustatyti.

▼B

1.2. APIBRĖŽTYS IR VIENETAI

1.2.1. *DOC/COD analizė*

Medžiagos šalinimo laipsnis reiškiamas lygtimi:

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

kai:

DR = bandomosios medžiagos šalinimo laipsnis procentais DOC (ar COD) per duotą sulaikymo trukmę,

T = bandomosios medžiagos koncentracija intakyje, mg DOC/-litre (ar mg COD/litre),

E = DOC (ar COD) koncentracija bandymų įrenginio ištakyje, mg DOC/litre (ar mg COD/litre),

E_o = be medžiagos veikiančio bandymo įrenginio ištakio DOC (ar COD) koncentracija, mg DOC/litre (ar mg COD/litre).

Skaidymas pateikiamas, nurodant bandomosios medžiagos DOC (ar COD) šalinimo per duotą sulaikymo trukmę procentinę vertę.

1.2.2. *Specifinė analizė*

Bandomosios medžiagos šalinimo iš vandeninės fazės procentinė vertė (R_w) duotos vidutinės sulaikymo trukmės ribose skaičiuojama pagal lygtį:

$$R_w = \frac{C_1 - C_o}{C_1} \times 100 \% \quad [1(b)]$$

čia:

C₁ = medžiagos koncentracija bandymo įrenginio intake (medžiagos kiekis mg/litre, nustatant specifinės analizės metodu),

C_o = medžiagos koncentracija bandymo įrenginio ištakyje (medžiagos kiekis mg/litre, nustatant specifinės analizės metodu).

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. BANDYMŲ METODO ESMĖ

Biologiniam suskaidomumui nustatyti lygiagrečiai atliekami bandymai dviejuose eksperimentiniuose aktyviojo dumblo įrenginiuose (OECD patvirtinamasis bandymas ar akytojo indo įrenginiai). Bandomoji medžiaga dedama į intaką vieno iš įrenginių (sintetinių ar buitinių nuotekų), tuo tarpu į antrąjį įrenginį tiekiamos tik nuotekos. Pirminiam biologiniam skaidymui nustatyti, darant specifinę medžiagos analizę intake ir ištakyje, naudojamas tik vienas įrenginys.

▼B

DOC (ar COD) koncentracijos matuojamos ištakiuose, arba medžiagos koncentracija nustatoma darant specifinę analizę.

DOC atsiradusi dėl bandomosios medžiagos nematuojama, bet paprasčiausiai konstatuojamas jos kiekis.

Kai daromi DOC (ar COD) matavimai, vidutinių koncentracijų bandomajame ir kontroliniame ištakiuose skirtumas priskiriamas nesuskaldytai bandomajai medžiagai.

Kai daroma specifinė analizė, galima išmatuoti pradinio junginio molekulių koncentracijos pokytį (pirminis biologinis skaidymas).

Įrenginiai gali būti eksploatuojami „sudvejintų įrenginių režimu“, taikant persėjimo (transinokuliacijos) metodiką.

1.5. KOKYBĖS KRITERIJAI

Pradinė medžiagos koncentracija priklauso nuo taikomo analizės metodo ir jo apribojimų.

1.6. BANDYMŲ METODO APRAŠYMAS

1.6.1. *Pasirengimas*

1.6.1.1. Aparatūra

Reikia dviejų to paties tipo įrenginių, išskyrus tą atvejį, kai daroma specifinė analizė. Gali būti naudojami dviejų tipų įrenginiai.

OECD patvirtinamasis bandymas

Įrangą (1 papildymas) sudaro indas sintetinėms nuotekoms laikyti (A), dozavimo siurblys (B), aeravimo indas C, nusodintuvas D, aeroliftnis siurblys E, aktyviajam dumblui recirkuliuoti, ir apdoroto ištakio rinktuvas F.

A ir F indai turi būti iš stiklo ar tinkamo plastiko ir jų talpa turi būti bent 24 litrai. B siurblys turi užtikrinti nuolatinį sintetinių nuotekų srautą į aeravimo indą; galima naudoti bet kurį tinkamą įrenginį, svarbu, kad būtų užtikrintas tiekimo srautas ir koncentracija. Normalaus darbo metu nustatomas toks D nusodintuvo aukštis, kad maišomo skysčio tūris aeravimo inde būtų trys litrai. Sukepinto stiklo aeravimo kubas G yra pakabintas C indo kūginėje viršūnėje. Per aeratorių pučiamo oro kiekį galima kontroliuoti debitmačiu.

Aeroliftnis siurblys E reguliuojamas taip, kad aktyvusis dumblas iš nusodintuvo tolygiai ir nuolat grąžinamas į aeravimo indą C.

„Aktyšasis indas“

Aktyšasis indas yra pagamintas iš akytojo polietileno lakštų (2 mm storio, didžiausias akučių dydis 95 µm), kurie susukami į 14 cm skersmens cilindą su kūginių 45° pagrindu (2 papildymo 1 ir 2 paveikslai). Aktyšas indas dedamas į iš tinkamo plastiko pagamintą 15 cm skersmens nepraleidžiantį indą, cilindrinėje dalyje 17,2 cm aukštyje turinčiame išleidžiamąją angą, kuri nustato skysčio tūrį inde (3 litrai). Vidinio indo viršutinė dalis apjuosta standžių laikančiuoju žiedu iš tinkamo plastiko, taip kad tarp vidinio ir išorinio indų yra 0,5 cm ištakiui skirta erdvė.

▼B

Akytą indą galima įtaisyti ant termostatuojamos vandens vonios dugno. Per vidinio indo dugną, ant kurio uždėti tinkami difuzoriai, tiekiamas oras.

A ir E indai turi būti iš stiklo ar tinkamo plastiko ir jų talpa turi būti bent 24 litrai. B siurblys turi užtikrinti nuolatinį sintetinių nuotekų srautą į aeravimo indą; galima naudoti bet kurį tinkamą įrenginį, svarbu, kad būtų užtikrintas tiekimo srautas ir koncentracija.

Reikia turėti atsarginius vidinius akytuosius indus, kad būtų galima pakeisti bet kurį užkimštą indą; užkimšti indai 24 valandas plaunami hipochlorito tirpale, po to gerai išplaunami vandentiekio vandeniu.

1.6.1.2. Filtravimas

Membraninio filtravimo aparatūra ir membraniniai filtrai, kurių akučių dydis 0,45 µm. Tinka tokie membraniniai filtrai, kurie neišskiria anglies ir filtravimo pakopoje neabsorbuoja medžiagos.

1.6.1.3. Nuotekos

Galima naudoti atitinkamą sintetinę mitybinę terpę ar buitines nuotekas.

Sintetinės mitybinės terpės pavyzdys

Viename litre vandentiekio vandens ištirpinkite:

peptono:	160 mg,
mėsos ekstrakto:	10 mg,
karbamido:	30 mg,
NaCl:	7 mg,
CaCl ₂ x2H ₂ O:	4 mg,
MgSO ₄ × 7H ₂ O:	2 mg,
K ₂ HPO ₄ :	28 mg.

Buitinės nuotekos

Buitinės nuotekos turi būti kasdieną iš naujo imamos iš nuotekų valymo įrenginio, kuris daugiausia valo buitines nuotekas, pirminio nusodintuvo perpildos srauto.

1.6.1.4. Bandomosios medžiagos pradinis tirpalas

Bandymo įrenginiui papildyti bandomąja medžiagą turi būti ruošiamas jos tirpalas, pvz., 1 %. Norint žinoti, kokį bandomosios medžiagos tirpalo tūrį reikia pilti į nuotekas ar tiesiai antruoju siurblių į įrenginį, kad būtų gauta reikiama bandomoji koncentracija, turi būti nustatyta bandomosios medžiagos koncentracija.

1.6.1.5. Sėjimo kultūra

Pastaba. Naudojant buitines nuotekas, nėra prasmės naudoti sėjimo kultūrą su maža bakterijų koncentracija, bet galima naudoti aktyvųjį dumblą.

Galima naudoti įvairias sėjimo kultūras.

Pateikiami trys sėjimo kultūros pavyzdžiai:

a) sėjimo kultūra iš antrinio ištakio

▼B

Sėjimo kultūra turi būti gauta iš geros kokybės antrinio ištakio, renkant ją valymo įrenginyje, į kurį daugiausia patenka buitinės nuotekos. Nuo bandinio ėmimo iki naudojimo ištakis turi būti laikomas aerobinėmis sąlygomis. Ruošiant sėjimo kultūrą, bandinys filtruojamas per stambų filtrą ir pirmieji 200 ml filtrato pilami lauk. Kol bus panaudotas, filtratas laikomas aerobinėmis sąlygomis. Sėjimo kultūra turi būti panaudota ėmimo dieną. Sėjimo kultūros dedama bent 3 ml.

b) sudėtinė sėjimo kultūra

Sėjimo kultūra iš antrinio ištakio

žr. aprašymą aukščiau.

Sėjimo kultūra iš dirvožemio

100 g sodo dirvožemio (derlingo, nesterilaus) suspenduojama 1 000 ml geriamojo chloro neturinčio vandens. (Netinka dirvožemiai, kurių didelė dalis yra molis, smėlis ar juodžemis). Po sumaišymo suspensija 30 minučių paliekama nusistoti. Skystis virš nuosėdų filtruojamas per stambų filtrinį popierių, pirmuosius 200 ml pilant lauk. Filtratas aeruojamas iš karto ir visą laiką, kol bus panaudotas. Sėjimo kultūra turi būti panaudota ėmimo dieną.

Sėjimo kultūra iš paviršinio vandens

Dar viena sėjimo kultūros dalis imama, siurbiant mezosaprobinio paviršinio vandens bandinį. Bandinys filtruojamas per stambų filtrinį popierių, pirmuosius 200 ml pilant lauk. Kol bus panaudotas, filtratas laikomas aerobinėmis sąlygomis. Sėjimo kultūra turi būti panaudota ėmimo dieną.

Vienodi trijų dalinių sėjimo kultūrų bandinių tūriai sujungiami, gerai sumaišomi, ir iš šio mišinio imama galutinė sėjimo kultūra. Sėjimo kultūros dedama bent 3 ml.

c) sėjimo kultūra iš aktyviojo dumblo

Sėjimo kultūrai galima naudoti aktyvųjį dumblą (suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija ne didesnė kaip 2,5 g/litre), kurio tam tikras tūris (ne didesnis kaip 3 litrai) imamas iš valymo įrenginio, kuris valo daugiausia buitines nuotekas, aeravimo tanko.

1.6.2. *Darbo eiga*

Bandymas daromas kambario temperatūroje; pastaroji turi būti nuo 18 iki 25 °C.

Jei tinka, bandymą galima daryti mažesnėje temperatūroje (iki 10 °C); jei medžiaga tokioje temperatūroje suiro, paprastai daugiau nereikia nieko daryti. Tačiau, jei medžiaga nesuiro, bandymas turi būti daromas pastovioje temperatūroje nuo 18 iki 25 °C.

1.6.2.1. Įdirbimo laikotarpis: dumblo formavimas/-įrenginio stabilizavimas

Dumblo augimo/stabilizavimo laikotarpis, per kurį aktyviojo dumblo suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija ir įrenginio veikimas naudojamomis darbo sąlygomis artėja prie pastoviosios būsenos.

▼B

Įdirbimo laikotarpis tęsiasi nuo to momento, kai bandomoji medžiaga buvo įdėta pirmą kartą, iki tol, kol šalinimas pasiekia lygiagrečiąją kreivės dalį (palyginti pastovią vertę). Šis laikotarpio trukmė turi būti ne didesnė kaip šešios savaitės.

Vertinimo laikotarpis trunka tris savaites, trys savaites nuo to laiko, kai bandomosios medžiagos šalinimas pasiekia palyginti pastovią ir, paprastai didelę, vertę. Toms medžiagoms, kurių skaidymas per pirmąsias šešias savaites yra mažas ar visai nevyksta, vertinimo laikotarpiu laikomos dar trys savaitės.

Iš pradžių vienam bandymui skirtą įrenginį (-ius) užpildykite sėjimo kultūra, sumaišyta su intaku.

Tuomet įjungiamas aeratorius (ir aeroliftinis siurblys E OECD patvirtinamojo bandymo įrenginių atveju) bei dozavimo įtaisas (B).

Intako be bandomosios medžiagos srautas per aeravimo indą C turi būti arba litras per valandą ar pusė litro per valandą; taip vidutinė sulaikymo trukmė bus lygi trims arba šešioms valandoms.

Aeravimo intensyvumas turi būti reguliuojamas taip, kad indo C turinys būtų visą laiką suspenduotas, o ištirpusio deguonies kiekis būtų bent 2 mg/litre.

Atitinkamomis priemonėmis būtina išvengti putojimo. Neturi būti naudojami priešpučiai, kurie inhibuotų aktyvųjį dumblą.

Dumblas, kuris kaupiasi aeravimo indo C viršuje, (OECD patvirtinamojo bandymo įrenginių atveju ir nusodintuvo D apačioje bei cirkuliacijos sistemoje), turi būti grąžinamas į maišomą skystį ne mažiau kaip kartą per parą, nuvalant šepetiu arba koku nors kitu tinkamu būdu.

Jei dumblas nenusėda, nusodinimą galima paskatinti pridedant, jei reikia – ir pakartotinai, 2 ml 5 % geležies (III) chlorido tirpalo.

Nuotekos nuo 20 iki 24 valandų leidžiamos į rinktuvą (E ar F), tuomet, mišinį sumaišius, paimamas bandinys. Po to rinktuvas (E ar F) turi būti kruopščiai išplautas.

Proceso veiksmingumui tikrinti, bent du kartus per savaitę sukaupto ištakio filtrate matuojamas cheminis deguonies poreikis (COD) ar ištirpusi organinė anglis (DOC), tai daroma ir intako filtrate (naudojama membrana, kurios akučių dydis 0,45 µm, pirmieji 20 ml (maždaug) filtrato pilami lauk).

COD ar DOC mažėjimas turi išsilyginti, kai gaunamas maždaug tolygios paros skaidymo vertės.

Sausos medžiagos kiekis aeravimo indo aktyviajame dumble turi būti nustatomas du kartus per savaitę (g/litre). Įrenginius galima eksploatuoti vienu iš dviejų būdų: sausos medžiagos kiekis aktyviajame dumble turi būti nustatomas du kartus per savaitę, ir, jei jis didesnis kaip 2,5 g/litre, perteklinis aktyvusis dumblas turi būti pašalintas, arba iš kiekvieno indo kasdieną išpilama lauk 500 ml nuotekų ir aktyviojo dumblo mišinio, kad vidutinė dumblo sulaikymo trukmė būtų šešios paros.

▼B

Kai išmatuoti ir įvertinti dviejų įrenginių parametrai [(proceso veiksmingumas (COD ar DOC šalinimas), dumblo koncentracija, dumblo nusodinamumas, ištakių drumstumas ir t. t.) tampa gana stabilūs, į vieno iš įrenginių intaką galima dėti bandomosios medžiagos pagal 1.6.2.2.

Kitu būdu bandomąją medžiagą galima dėti dumblo augimo laikotarpio pradžioje (1.6.2.1), ypač, kai dumblas yra dedamas kaip sėjimo kultūra.

1.6.2.2. Bandytųjų eiga

Palaikomos įdirbimo laikotarpio darbinės sąlygos ir į bandymo įrenginio intaką dedamas pakankamas kiekis bandomosios medžiagos pradinio tirpalo (maždaug 1 %), kad nuotekose būtų norima bandomosios medžiagos koncentracija (maždaug nuo 10 iki 20 mg/litre DOC ar 40 mg/litre COD). Tai galima padaryti maišant pradinį tirpalą į nuotekas kasdieną ar naudojant atskirą pumpavimo įrenginį. Šią koncentraciją galima pasiekti laipsniškai. Jei bandomosios medžiagos toksiško poveikio aktyviajam dumblui nenustatyta, galima bandyti didesnes koncentracijas.

Į tuščiojo bandymo įrenginį tiekiamas tik intakas, nededant medžiagos. Analizei imami atitinkamo tūrio bandiniai, kurie filtruojami per membraninį filtrą (0,45 µm), pirmuosius 20 ml (maždaug) filtrato pilant lauk.

Filtruoti bandiniai turi būti analizuojami tą pačią dieną, priešingu atveju jie turi būti konservuojami kokiu nors tinkamu būdu, pvz., 10 ml filtrato įpilti 0,05 ml 1 % gyvsidabrio (II) chlorido (HgCl₂) tirpalo ar laikyti bandinius 2–4 °C temperatūroje, jei laikomai ne ilgiau kaip 24 valandas, ar mažesnėje nei - 18 °C temperatūroje, jei ilgesnį laiką.

Įdirbimo laikas, pridodant bandomosios medžiagos, neturi užtrukti ilgiau kaip šešias savaites, o įvertinimo laikotarpis neturi būti trumpesnis kaip trys savaitės, t.y. galutiniam rezultatui skaičiuoti reikia turėti maždaug nuo 14 iki 20 nustatymų.

Sudvejintų įrenginių režimas

Įrenginių sudvejinimas daromas, kartą per dieną 1,5 litro nuotekų ir aktyviojo dumblo mišinio (įskaitant dumblą) iš aktyviojo dumblo aeravimo indų perpilant iš vieno į kitą. Jei bandomosios medžiagos yra labai absorbuojamos, iš nusodintuvų siurbama po 1,5 litro skysčio virš dumblo ir supilama į kito įrenginio aktyviojo dumblo indą.

1.6.2.3. Analizė

Norint sekti medžiagos elgesį, galima daryti dviejų rūšių analizę:

DOC ir COD

▼ B

DOC koncentracijų nustatymas anglies analizatoriumi daromas po du kartus, ir (ar) COD vertės nustatomos pagal (2) nuorodą.

Specifinė analizė

Bandomosios medžiagos koncentracija nustatoma atitinkamu analizės metodu. Tais atvejais, kai tai įmanoma, turi būti daroma ant dumblo adsorbuotos medžiagos specifinė analizė.

2. DUOMENYS IR ĮVERTINIMAS

2.1. SUDVEJINTŲ ĮRENGINIŲ REŽIMAS

Naudojant „sudvejintų įrenginių režimą“, kasdienis šalinimo laipsnis, DR skaičiuojamas pagal 1.2.1.

Šioms kasdienio šalinimo laipsnių DR vertėms daroma pataisa dėl medžiagos pernešimo peršėjimo (transinokuliavimo) procese, į DRc vertes, taikant [2] lygtį trijų valandų ar [3] lygtį šešių valandų vidutinei sulaikymo trukmei.

$$DRc = \frac{4}{3}DR - \frac{100}{3} \quad [2]$$

$$DRc = \frac{8}{7}DR - \frac{100}{7} \quad [3]$$

Skaičiuojama DRc verčių sekos vidutinė vertė ir papildomai pagal [4] lygtį skaičiuojamas standartinis nuokrypis

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

čia:

S_{DRc} = DRc verčių sekos standartinis nuokrypis,

$\overline{DRc}$ = DRc vidutinė vertė,

n = nustatymų skaičius.

DRc sekos išskirtys (outliers) eliminuojamos, naudojant atitinkamą statistinę metodiką, pvz., Nalimov (6), 95 % pasiklivimo lygmeniui, ir DRc rinkinio be išskirčių vidutinė vertė ir standartinis nuokrypis skaičiuojami iš naujo.

Galutinis rezultatas skaičiuojamas pagal lygtį [5] kaip

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

▼B

čia:

$t_{n-1; \alpha}$ = iš lentelės paimta t vertė n skaičiui E ir E_0 verčių porų ir statistinis pasiklivimo lygmuo P ($P = 1 - \alpha$), kai P užduotas 95 % (1).

Rezultatas pateikiamas, nurodant vidutinę vertę su nuokrypio ribomis 95 % pasiklivimo lygmeniui, atitinkamą standartinį nuokrypį, DRc duomenų skaičių rinkinyje, atmetus išskirtis, ir išskirčių skaičių, pvz.

DRc = 98,6±2,3 % DOC šalinimas,

s = 4,65 % DOC šalinimas,

n = 18,

x = išskirčių skaičius.

2.2. NESUPORUOTŲ ĮRENGINIŲ REŽIMAS

Įrenginių veikimas gali būti patikrintas tokiu būdu:

$$\text{COD ar DOC šalinimo procentinė vertė} = \frac{\text{nuotekų COD ar DOC} - \text{ištakio COD ar DOC}}{\text{nuotekų COD ar DOC}} \times 100$$

Šios kasdienio šalinimo vertės gali būti atidėtos grafiškai, kad būtų galima atskleisti bet kokias tendencijas, pvz., aklimatizavimo.

2.2.1. Naudojant COD/DOC nustatymus

Kasdienis šalinimo laipsnis DR yra skaičiuojamas pagal 1.2.1.

Skaičiuojama DR verčių sekos vidutinė vertė; papildomai skaičiuojamas standartinis nuokrypis pagal:

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

čia:

S_{DR} = DR_i verčių sekos standartinis nuokrypis,

$\overline{DR}$ = DR_i vidutinė vertė,

n = nustatymų skaičius.

DR sekos išskirtys eliminuojamos, naudojant atitinkamą statistinę metodiką, pvz., Nalimov (6), 95 % pasiklivimo lygmeniui, ir iš naujo skaičiuojami DR rinkinio be išskirties vidutinė vertė ir standartinis nuokrypis.

Tuomet galutinis rezultatas skaičiuojamas pagal lygtį [7] kaip:

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

čia:

$t_{n-1; \alpha}$ = iš lentelės paimta t vertė n skaičiui E ir E_0 verčių porų ir statistinis pasiklivimo lygmuo P ($P = 1 - \alpha$), kai P užduotas 95 % (1).

▼B

Rezultatas pateikiamas, nurodant vidutinę vertę su nuokrypio ribomis 95 % pasiklivimo lygmeniui, atitinkamą standartinį nuokrypį, DR duomenų skaičių rinkinyje, atmetus išskirtis, ir išskirčių skaičių, pvz.

DR = (98,6±2,3) % DOC šalinimo,

s = 4,65) % DOC šalinimo,

n = 18,

x = išskirčių skaičius.

2.2.2. *Naudojant specifinę analizę*

Bandomosios medžiagos šalinimo iš vandeninės fazės procentinė vertė (R_w) yra skaičiuojama pagal 1.2.2.

3. **ATASKAITA**

3.1. **BANDYMŲ ATASKAITA**

Bandymų ataskaitoje turi būti pateikta, jei įmanoma, tokia informacija:

- 3 papildyme pateiktas blankas, kuriame nurodytos eksploataavimo sąlygos,
- pasirinktas eksploataavimo režimas: sudvejintų įrenginių ar ne,
- nuotekos: sintetinės ar buitinės – buitinių nuotekų atveju nurodyti bandinio vietą ir ėmimo datą,
- sėjimo kultūra, su bandinio ėmimo vieta ir data,
- trumpas išdėstymas su analizės metodo aprašymu, jei buvo daroma specifinė analizė,
- COD ar DOC šalinimo kitimo laike grafikas, įskaitant įdirbimo ir įvertinimo laikotarpius,
- bandomosios medžiagos pradiniam tirpale analizinis išgavimas COD ar DOC pavidalu,
- jei buvo darytos specifinės analizės, bandomosios medžiagos šalinimo iš vandeninės terpės procentinės vertės kitimo laike grafikas (įdirbimo ir įvertinimo laikotarpis),
- bandomosios medžiagos DOC ar COD šalinimo vidutinė vertė ir standartinis nuokrypis, skaičiuoti pagal įvertinimo laikotarpio rezultatus, t. y. kai vyksta pastovus bandomosios medžiagos šalinimas ar stabilaus veikimo laikotarpis,
- aktyviojo dumblo koncentracijos kitimo laike grafikas,
- visos pastabos apie aktyvųjį dumblą (perteklinio dumblo šalinimas, tūrio didėjimas, FeCl_3 , ir t. t.),

▼B

- bandyme naudota bandomosios medžiagos koncentracija,
- visi rezultatai apie dumblo analizę,
- visa informacija ir eksperimentiniai rezultatai, susiję su bandomąja medžiaga ir etalonine medžiaga, jei ji buvo naudota,
- mokslinis bet kokių bandymų metodikos keitimų pagrindimas.

3.2. DUOMENŲ INTERPRETAVIMAS

Mažų bandomosios medžiagos šalinimo iš vandeninės terpės verčių priežastimi gali būti mikroorganizmų inhibavimas bandomąja medžiaga. Tai dar galima nustatyti pagal dumblo irimą ir jo kiekio mažėjimą, dėl ko skystis virš dumblo pasidaro drumstas, ir pagal bandomojo įrenginio COD (ar DOC) šalinimo našumo mažėjimą.

Kartais įtakos gali turėti fizikocheminė adsorbcija. Skirtumai tarp biologinio poveikio molekulei ir fizikocheminės adsorbcijos gali būti nustatyti, darant dumblo analizę po atitinkamos desorbcijos.

Reikia toliau bandyti, jei reikia nubrėžti skirtumą tarp biologinio skaidymo (ar dalinio biologinio skaidymo) ir adsorbcijos.

Tai galima daryti įvairiais būdais, tačiau įtikinamiausias būdas yra pamatiniame bandyme (geriau, kad tai būtų respirometrinis bandymas) sėjimo kultūra naudoti skystį virš dumblo.

Jei stebimos didelės DOC ar COD šalinimo vertės, to priežastis yra biologinis skaidymas, tuo tarpu, jei šalinimo vertės mažos, biologinis skaidymas neatskiriamas nuo eliminavimo. Pvz., jei tirpus junginys turi didelę 98 % adsorbcijos konstantą, o perteklinio dumblo nuostolių laipsnis yra 10 % per parą, eliminavimas gali būti iki 40 %; jei perteklinio dumblo nuostolių laipsnis yra 30 %, eliminavimas dėl adsorbcijos ant perteklinio dumblo ir pašalinimo kartu su juo gali sudaryti iki 65 % (4).

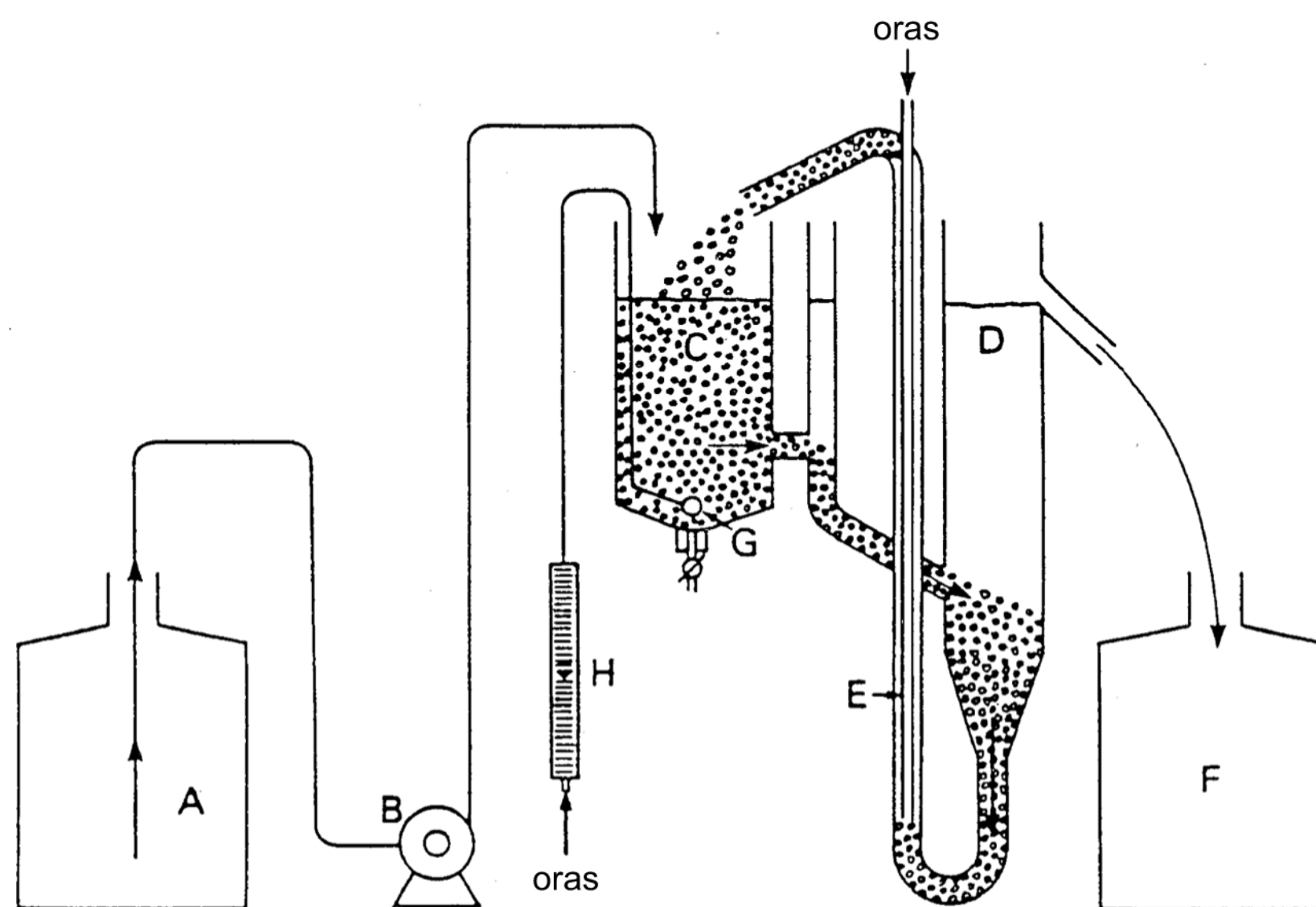
Taikant specifinę analizę, reikia kreipti dėmesį į ryšį tarp medžiagos sandaros ir taikomos specifinės analizės. Šiuo atveju stebimas reiškinys negali būti interpretuojamas kaip junginio mineralizacija.

4. NUORODOS

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 303 A, Decision of the Council C(81) 30 final.
- 2) Annex V C9 Degradation Test -Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC (OJ L 251, 1984 9 19, p. 1).
- 3) Painter, H. A., King, E. F., WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability, Technical Report TR70, June 1978, Water Research Centre, United Kingdom.
- 4) Wierich, P., Gèrike, P., The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in activated sludge plants, Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 5, No 2, June 1981, pp. 161 to 171.

▼B

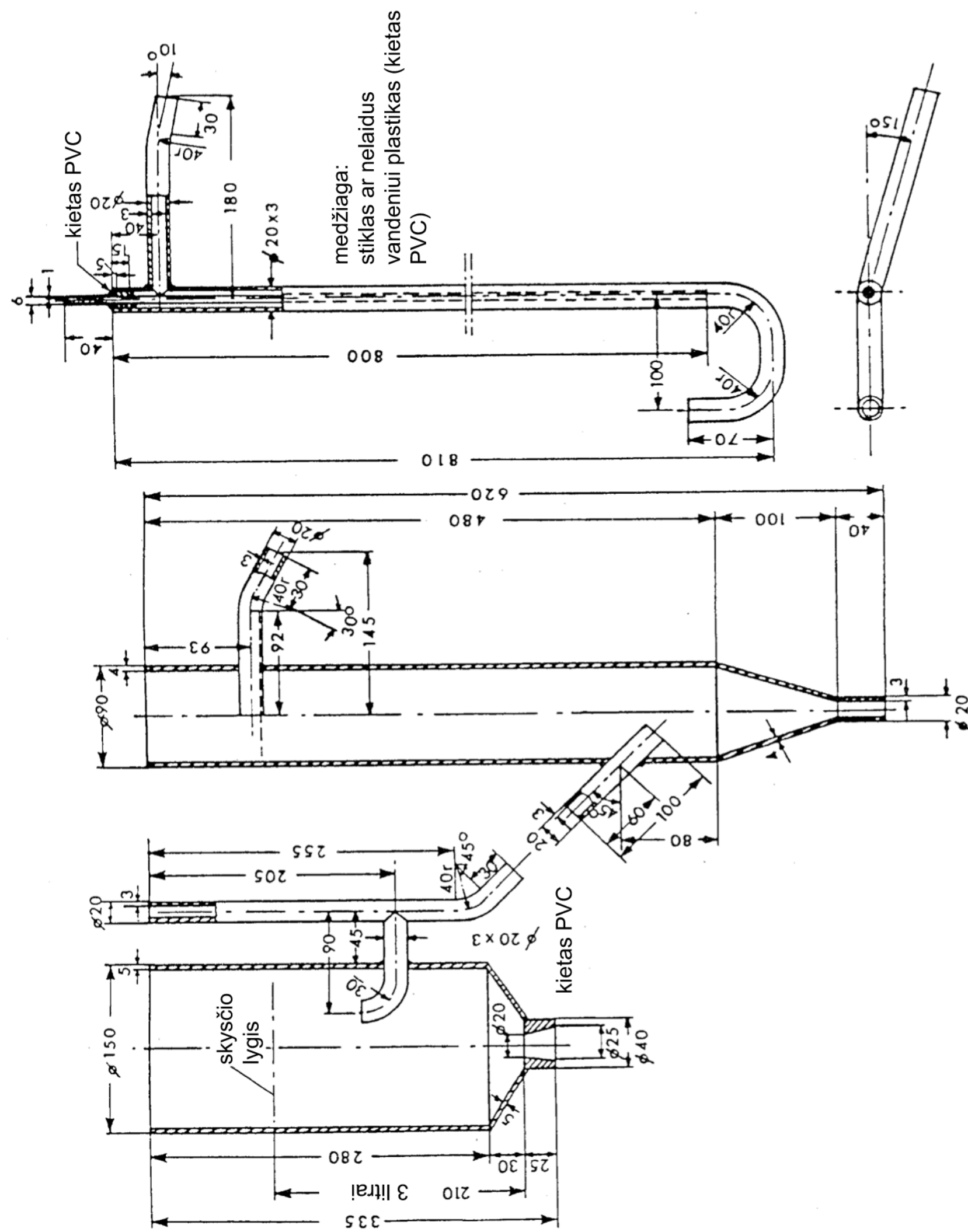
- 5) Council Directives 82/242/EEC and 82/243/EEC, Official Journal of the European Communities, No L 109, 22. 4. 1982, amending Council Directives 7Y404/EEC and 73/405/EEC on biodegradability of detergents, Official Journal of the European Communities, No L 347, 17. 12. 1973.
- 6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreßertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Oberprufung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, Fresenius-Zeitschrift für Analytische Chemie, 303 (1980), p. 406–408.

▼ B*1 priedėlis**1 paveikslas*

Detalizavimas: A = indas nuotekoms laikyti; E = aeroliftinis siurblys;
 B = dozavimo įtaisas; F = rinktuvas;
 C = aeravimo kamera (3 l talpos); G = aeratorius;
 D = nusodintuvas; H = oro debitmatis (neprivalomas).

▼ B

2 paveikslas

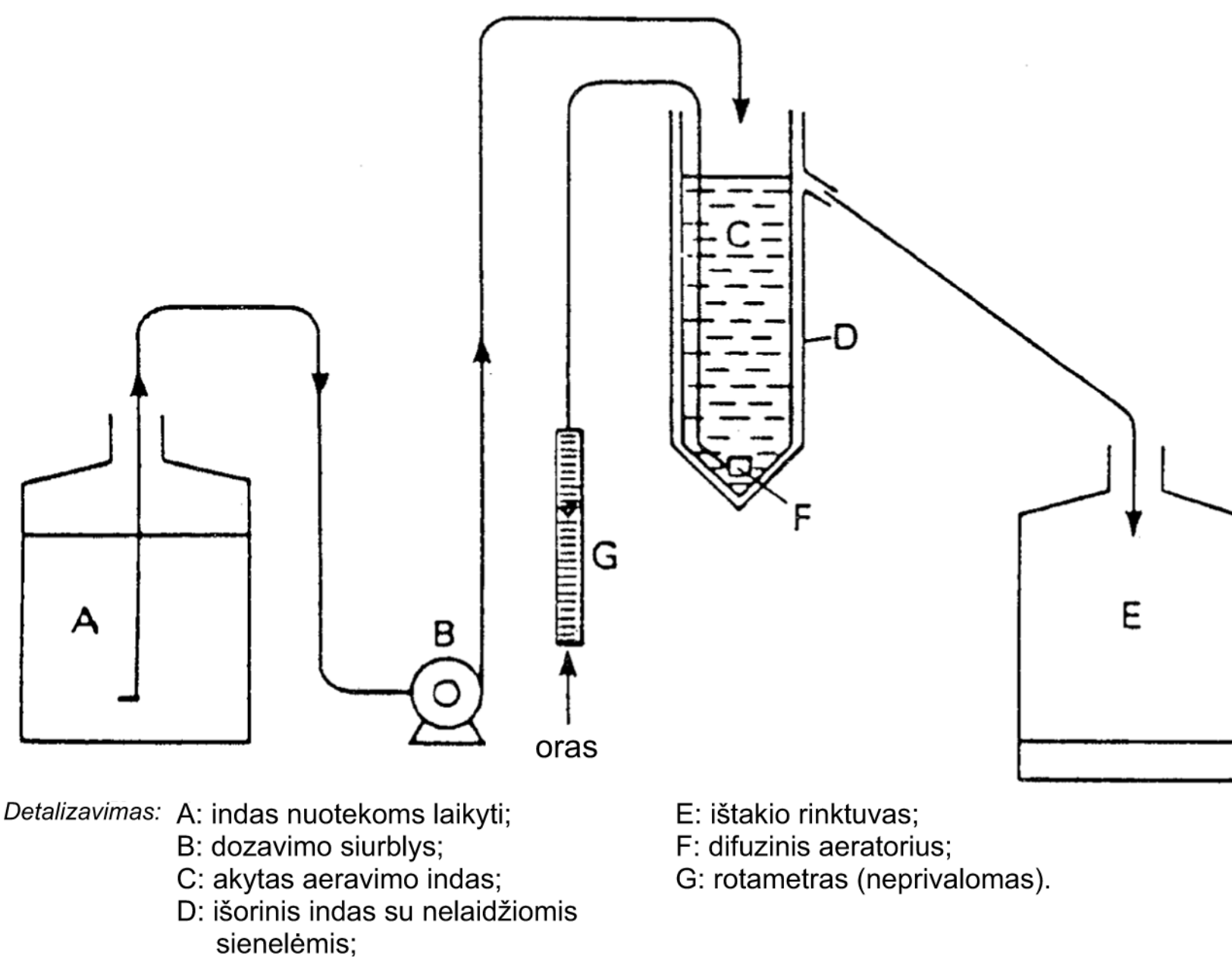


▼ B

2 priedėlis

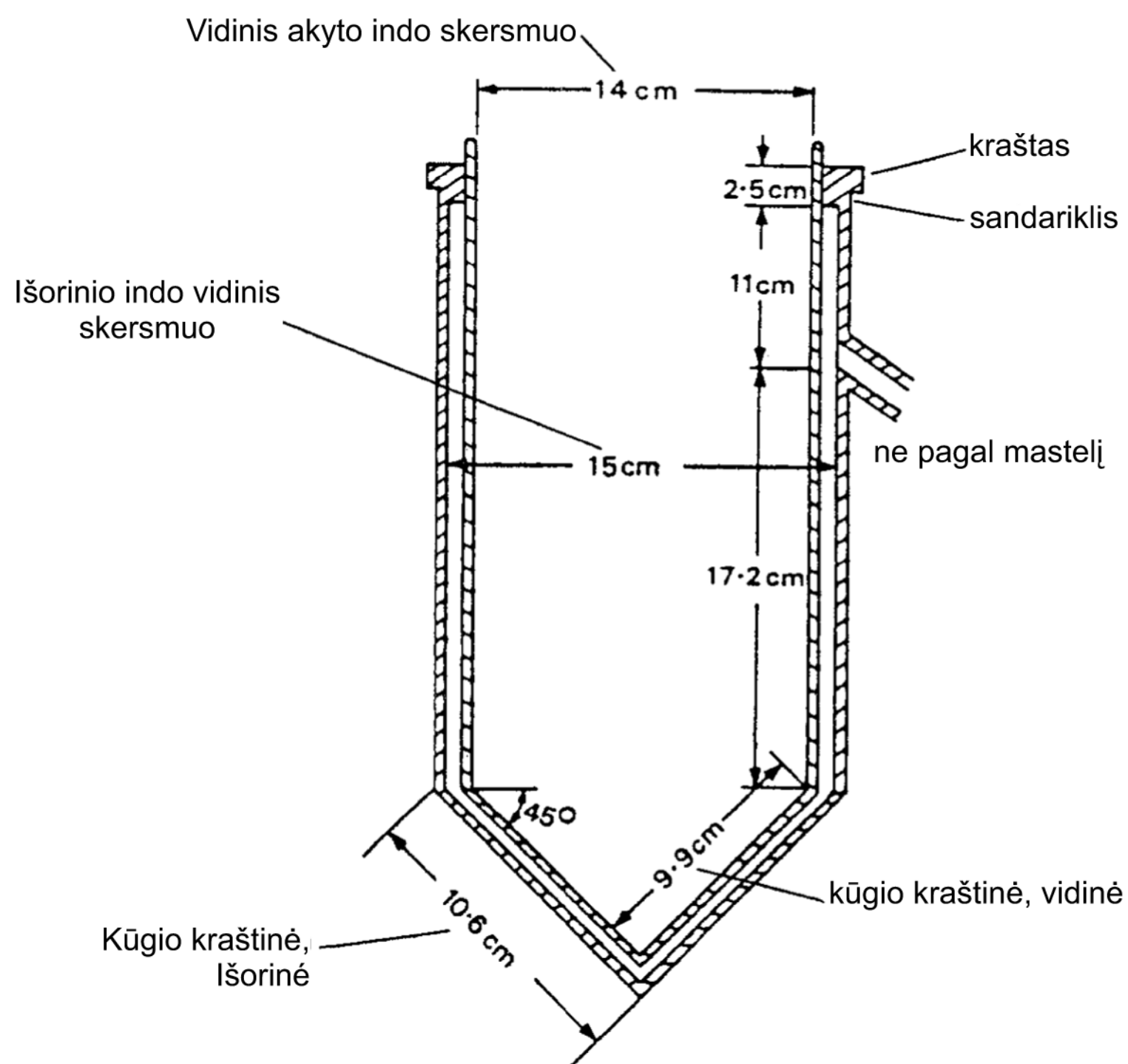
1 paveikslas

Įranga, naudota įvertinti biologinį skaidymą



2 paveikslas

Trijų litrų talpos akyto indo tipo aeratoriaus detalės





3 priedėlis

Veikimo sąlygos aktyviojo dumblo simuliacijos bandymui

Pažymėti kiekvienoje grupėje

Aparatas

OECD patvirtinimasis bandymas
Akytasis indas

Veikimo būdas

Vienas įrenginys
Sudvejinti įrenginiai
Nesudvejinti įrenginiai

Persėjimas

Nėra
Aktyvieji dumbliai
Supernatantinis

Vidutinė sulaikymo trukmė

Trys valandos
Šešios valandos

Bazinė maitinamoji medžiaga

Buitinės nuotekos
Sintetinės nuotekos

Sėjimo kultūra

Biologiškai išvalytas vanduo
Kompostas
Aktyvieji dumbliai

Bandinio medžiagos priedai

Nuo pradžios
Palaipsniui
Po dumblo susidarymo

Analizė

Specifinė
COD
DOC

▼B**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 skaidymo bandymuose.

Prieš galutinį bandymą gali būti daromas 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 daromas 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 EC₅₀.

Išvados, padarytos pagal rezultatus, kurie remiasi deguonies suvartojimu, gali būti klaidingos, kai bandomoji medžiaga turi polinkį atskirti oksidavimą ir fosforilinimą oksidacinio fosforilinimo procese.

Norint daryti bandymą, naudinga turėti tokia 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. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Kvėpavimo intensyvumas yra deguonies suvartojimas nuotekų aerobiniame dumble esančiais mikroorganizmais, paprastai reiškiamas mg O₂ vienam mg dumblo per valandą.

▼B

Norint skaičiuoti konkrečios koncentracijos bandomosios medžiagos inhibuojamąjį veikimą, kvėpavimo intensyvumas reiškiamas dviejų kontrolinių kvėpavimo intensyvumo verčių vidurkio procentine dalimi:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{R_{c1} + R_{c2}}\right) \times 100 = \text{per cent inhibition}$$

inhibavimo procentinė vertė čia:

R_s = deguonies suvartojimo intensyvumas, bandant konkrečią bandomosios medžiagos koncentraciją,

R_{c1} = deguonies suvartojimo intensyvumas 1 kontroliniame bandyme,

R_{c2} = 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. BANDYMŲ METODO ESMĖ

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. Bandomosios medžiagos inhibuojamasis veikimas konkrečiai koncentracijai išreiškiamas dvejuose 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 mažiau kaip 15 %,
- 3,5-dichlorfenolio EC_{50} (30 minučių ir (ar) trijų valandų) yra priimtinaime intervale nuo 5 mg/litre iki 30 mg/litre.

1.6. BANDYMŲ 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.

▼B

1.6.1.2. Etaloninės 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 H₂SO₄, kol pradeda kristi nuosėdos, tam maždaug reikia 8 ml 0,5 M H₂SO₄, 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 ruošama 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 CaCl₂·2H₂O,
- 0,2 g MgSO₄·7H₂O,
- 2,8 g K₂HPO₄.

1 pastaba. Šios sintetinės nuotekos yra koncentratas, kurio koncentracija 100 kartų didesnė, nei nuotekų, aprašytų OECD techninėje ataskaitoje „Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents“ (Siūlomas paviršinio aktyvumo medžiagų, naudojamų sintetiniuose plovikliuose, biologinio skaidomumo nustatymo metodas) (1976 m. birželio 11 d.), ir pridedant kalio hidrofosfato.

2pastaba. 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. Tikslī 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,
- O₂ 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, nusistoti, ir viršutinį smulkesnių dalelių sluoksnį dekantuoti ir toliau naudoti. Kitu būdu dumblą galima sumaišyti, kelioms sekundėms įjungus maišytuvą.

▼ B

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 gautume 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 įpilama 50 ml sintetinių nuotekų mitybinės terpės, paruoštos, kaip aprašyta aukščiau; 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 eiga*

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 atvejui:

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).

▼ B

Bandymų 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, kaip skiesti vandeniu iki 300 ml ir pilti 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. Paskutiniu metu 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 30 min sąlyčio sąlygomis, būtina taikyti kitoki 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 priimtina intervale (nuo 5 iki 30 mg/litre 3,5-dichlorfenoliui), bandymas yra nevalidus 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-tikimybiname) popieriuje, ir gaunama EC_{50} vertė.

95 % pasiklivimo rėžiai EC_{50} vertėms gali būti nustatyti, taikant standartines metodikas.

▼B**3. ATASKAITA****3.1. BANDYMŲ ATASKAITA**

Bandymų ataskaitoje turi būti pateikta, jei įmanoma, tokia informacija:

- bandomoji medžiaga: cheminio identifikavimo duomenys,
- bandymų sistema: aktyviojo dumblo šaltinis, koncentracija ir bet koks pradinis kondicionavimas,
- bandymų sąlygos:
 - reakcijos mišinio pH vertė prieš kvėpavimo intensyvumo matavimą,
 - bandymų temperatūra,
 - bandymų trukmė,
 - etaloninė medžiaga ir jos išmatuota EC₅₀ vertė,
 - abiotinis deguonies suvartojimas (jei tai vyko).
- rezultatai:
 - visi matavimuose gauti duomenys,
 - inhibavimo kreivė ir metodas EC₅₀ skaičiuoti,
 - EC₅₀ ir, jei įmanoma, 95 % pasiklivimo rėžiai, EC₂₀ ir EC₈₀,
 - visi pastebėjimai ir bet kokie nukrypimai nuo šio bandymo metodo, kurie galėtų turėti įtakos rezultatui.

3.2. DUOMENŲ INTERPRETAVIMAS

Į EC₅₀ vertę turi būti žiūrima tiksliai kaip į orientacinę bandomosios medžiagos toksiškumą nuotekų valymo aktyviuoju dumblo 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 atipiškas inhibavimo kreives. Taigi šios kreivės turi būti interpretuojamos 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 Toxicological 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.

▼B**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 pridodant nusistojusių 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 interpretuojant 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 įvairioms bandymų medžiagoms, 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 $C_{\text{bendroji}} - C_{\text{neorganinė}}$.

Jei lygiagrečiai taikyti specifinį analizės metodą, gali būti įmanoma įvertinti medžiagos pirminį biologinį skaidymą (pirminės cheminės sandaros išnykimas).

Metodas tinka tik toms organinėms bandomosioms medžiagoms, kurios bandyme naudojamos koncentracijos:

— tirpios vandenyje (bent 20 mg/litre ištirpusios organinės anglies),

— garų slėgis yra labai mažas,

— neinhibuoja bakterijų,

— bandymų sistemoje adsorbuojamos tik nežymiu laipsniu,

— iš bandomojo tirpalo nepradingsta dėl putojimo.

Turi būti nustatytas organinės anglies kiekis bandomoje medžiagoje.

▼B

Norint paaiškinti gautus rezultatus, ypač kai rezultatai yra maži arba nežymus, naudinga būtų turėti informacijos apie bandomosios medžiagos pagrindinių komponentų santykinę dalį.

Kai reikia paaiškinti mažus rezultatus ir pasirinkti tinkamą bandomąją koncentraciją, pageidautina turėti informacijos apie medžiagos toksiškumą mikroorganizmams.

1.2. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

C_T = bandomosios medžiagos koncentracija, skaičiuojama organinės anglies kiekiu, kuris yra nusistovėjusiose nuotekose ar pridėdamas 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} :

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

čia

D_{da} = skaidymas/kasdienis pridėjimas.

2. Kiekvienos dienos pradžioje turimo medžiagos kiekio šalinimo procentinė vertė D_{ssd} :

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2 (a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2 (b)]$$

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.

▼B

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 papildymą), taigi retkarčiais galima metodą sutikrinti ir jo rezultatus lyginti su rezultatais, gautais kitais metodais.

1.4. BANDYMŲ METODO ESMĖ

Aktyvusis dumblas iš nuotekų valymo įrenginio dedamas į pusiau nepertraukiamo veikimo aktyviojo dumblo įrenginį [*Semi-Continuous Activated Sludge* (SCAS)]. Įdedama bandomosios medžiagos ir nusistojusių butinių nuotekų, ir mišinys aeruojamas 23 valandas. Paskui aeravimas stabdomas, dumblas paliekamas nusistoti 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 nuotekos.

Kai taikomas specifinis analizės metodas, galima nustatyti pradinės medžiagos koncentracijos mažėjimą dėl jos molekulių biologinio skaidymo (pirminis biologinis skaidomumas).

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 gauti medžiagoms, kurios skaidomos dideliu laipsniu).

Metodo jautrumą dideliu laipsniu lemia tuščiojo bandinio kintamumas ir, kiek mažiau, ištirpusios anglies nustatymo preciziškumas ir bandomosios medžiagos kiekis skystyje kiekvieno ciklo pradžioje.

1.6. BANDYMŲ EIGOS APRAŠYMAS

1.6.1. *Paruošiamieji darbai*

Oro tiekimo vamzdeliai (1 paveikslas) jungiami prie reikiamo skaičiaus švarių aeravimo įrenginių, skirtų kiekvienai bandymo 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.

▼B

Pradiniams bandomosios medžiagos tirpalams ruošti naudojamas distiliuotas vanduo; paprastai reikia, kad organinės anglies koncentracija būtų 400 mg/litre, tokiu atveju bandomosios medžiagos koncentracija kiekvieno aeravimo ciklo pradžioje, kai nevyksta biologinis skaidymas, yra 20 mg/litre.

Galima naudoti didesnes koncentracijas, jei tai įmanoma dėl medžiagos toksiškumo mikroorganizmams.

Nustatomas organinės anglies kiekis pradinuose tirpaluose.

1.6.2. *Bandymų sąlygos*

Bandymas turi būti daromas 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 oksiduojama dideliu laipsniu, 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 bandomoji medžiaga, jei ji pati nebuvo lengvai įsisavinta. Šios savybės, kartu su sėjimo kultūros kasdieniu keitimu, kai terpe naudojamos buitinės nuotekos, užtikrina labai palankias aklimatizavimo sąlygas ir galimybę biologiškai skaidyti dideliu laipsniu.

1.6.3. *Bandymų eiga*

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 pradama aeruoti. Po 23 valandų aeravimas baigiamas ir dumblas 45 minutėms paliekamas nusistoti. Kiekvienas indas paeiliui atkemšamas, ir iš jo išsiurbiamas 100 ml skysčio virš dumblo. Prieš pat naudojimą paimamas nusistojusių buitinių nuotekų bandinys, ir 100 ml nuotekų įpilama į kiekvieną aeravimo įrenginį su likusiu jame dumblo. Vėl pradama aeruoti. Šioje pakopoje bandomoji medžiaga nededama, ir į įrenginius kasdieną pilama buitinių nuotekų tol, kol skystis virš nusistojusio 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 pasiekia pastovią vertę.

Kai šis laikotarpis baigiasi, atskirieji nusistojusio dumblo bandiniai yra sumaišomi ir į kiekvieną įrenginį dedama po 50 ml gauto sudėtinio dumblo.

Į kontrolinius įrenginius įpilama 95 ml nusistojusių nuotekų ir 5 ml vandens, į bandomuosius įrenginius įpilama 95 ml nusistojusių nuotekų ir 5 ml atitinkamos bandomosios medžiagos pradinio tirpalo (400 mg/litre). Aeruoti pradama iš naujo ir aeravimas tęsiamas 23 valandas. Po to dumblas paliekamas 45 minutėms nusistoti, skystis virš dumblo nusiurbiamas ir jame nustatomas ištirpusios organinės anglies kiekis.

Aukščiau aprašytas užpylimo ir siurbimo procesas kartojamas kasdien iki bandymo pabaigos.

▼B

Prieš tai, kaip palikti dumblą nusistoti, gali jį tekti nuvalyti nuo įrenginio sienelių, kad kietosios dalelės nesikaupytų 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 kasdieną, nors analizę leidžiama daryti 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 skaidomi arba visiškai neskaidomi, nėra apibrėžta, tačiau patyrimas sako, kad dažniausiai tai turi trukti bent 12 savaičių, bet ne ilgiau kaip 26 savaitės.

2. DUOMENYS IR VERTINIMAS

Ištirpusios anglies kiekio vertės, nustatytos bandomųjų ir kontrolinių įrenginių skysčiuose virš nuosėdų, atidedamos grafiškai kaip laiko funkcija.

Baigus biologinį skaidymą, bandomajame įrenginyje nustatytas lygis artėja prie kontroliniame bandinyje rasto 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. BANDYMŲ ATASKAITA

Bandymų ataskaitoje turi būti pateikta, 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 būseną, koncentraciją ir t. t.,

— mokslinis bet kokių bandymų metodikos keitimų pagrindimas,

— parašas ir data.

▼B**3.2. DUOMENŲ INTERPRETAVIMAS**

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; jos dalyvavimą 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 kontrolinio bandinio 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 daryti 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 (COD) šalinimo vertės gali būti dėl mikroorganizmų inhibavimo bandomąja medžiaga, tai dar gali parodyti dumblo irimas ir jo praradimas, 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 , $^{14}\text{C}\text{O}_2$ surinkimas patvirtintų, kad biologinis skilimas 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 galiojimo patvirtinimas ir tuščiojo bandinio terpėje nustatyta skaidymo vertė.

4. NUORODOS

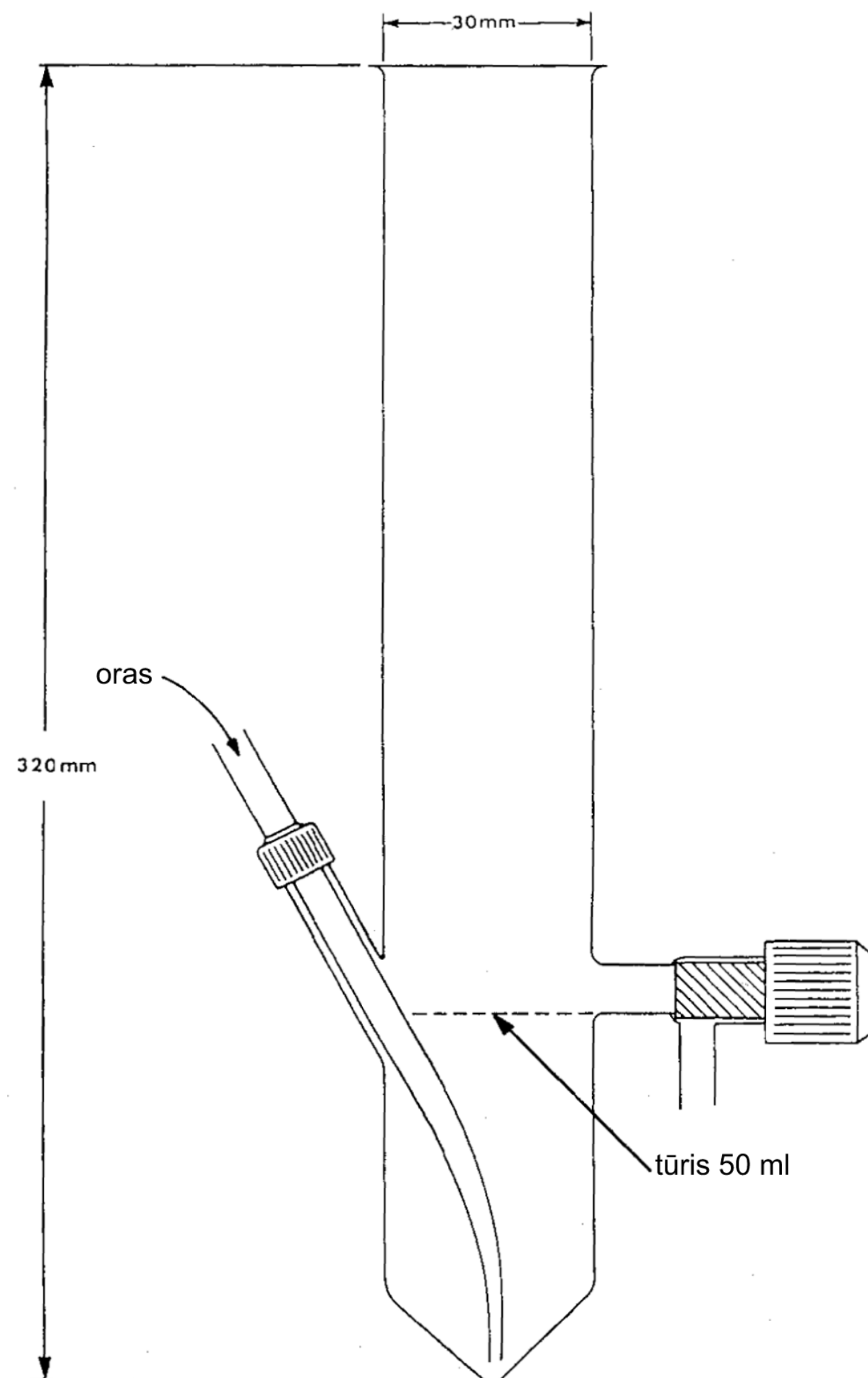
- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 A, Decision of the Council C(81) 30 final.

▼B

1 priedelis

SCAS bandymas. Rezultatų pavyzdys

Medžiaga	C _T (mg/l)	C _t – C _c (mg/l)	Biologinio suirimo procentas D _{da}	Bandymo trukmė (dienomis)
4-acetilaminobenzensulfonatas	17,2	2,0	85	40
Tetrapropenbonzensulfonatas	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

▼B*2 priedėlis***Bandymo aparato pavyzdys**

▼B**C.13 BIOLOGINIS KONCENTRAVIMAS: BANDYMAS SU ŽUVIMIS PRATEKĖJIMO SĄLYGOMIS****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 metodą pratekėjimo sąlygomis, leidžiama naudoti pusiau stacionarius režimus, jei jie atitinka patikimumo kriterijus.

Metodas pateikia pakankamą kiekį bandymui atlikti reikalingų detalių, tačiau palieka atitinkamą laisvę eksperimento schemai pritaikyti konkrečių laboratorijų sąlygoms ir keisti bandymo 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 nuostoviosios 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 ir kt. lygtį (2). Parametrams, kurie apibūdina biologinio koncentravimo gebą, priklauso sugerties greičio konstanta (k_1), apsiavymo greičio konstanta (k_2) ir BKF_{NB} .

Žymėtuosius atomus turinčios bandymo 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 selektyviąją analizę.

Norint nustatyti BKF, kuris remiasi tik pradinio junginio kiekiu, tyrimuose su žymėtaisiais atomais gali būti naudojamos gryninimo metodikos, o pagrindiniai irimo produktai 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. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Biologinis koncentravimas (biologinis kaupimas) yra bandymo medžiagos koncentracijos didėjimas organizme (jo nustatytuose audiniuose) arba organizmo paviršiuje lyginant su bandymo medžiagos koncentracija aplinkinėje terpėje.

Biologinio koncentravimo faktorius (BKF arba K_B) yra bandymo medžiagos koncentracijos žuvies viduje (paviršiuje) arba jos nustatytuose audiniuose (C_f , $\mu\text{g/g}$ (ppm)) ir cheminės medžiagos koncentracijos aplinkinėje terpėje (C_w kaip $\mu\text{g/ml}$ (ppm)) santykis bet kuriuo šio koncentravimo bandymo sugerties tarpsnio metu.

▼B

Nuostoviosios būsenos biologinio koncentravimo faktorius (BKF_{NB} arba K_B) žymiai nekinta ilgesnį laiko tarpą, bandymo medžiagos koncentracijai aplinkinėje terpėje šį laiko tarpą esant pastoviai.

Horizontalioji dalis arba nuostovioji būseną pasiekama tuomet, kai bandymo medžiagos koncentracijos žuvyje (C_f) priklausomybės nuo laiko kreivė tampa lygiagrečiai laiko ašiai, o trys C_f vertės, gautos paeiliui analizuojant bent kas dvi paras paimtus bandinius, viena nuo kitos nesiskiria daugiau kaip $\pm 20 \%$, ir nėra žymių skirtumų tarp trijų bandinių ėmimo periodų. Kai analizuojami sujungti bandiniai, reikia ne mažiau kaip keturių paeiliui padarytų analizių. Lėtai sugeriamoms bandymų 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 tarp oktanolio ir vandens koeficientas (P_{ow}) yra cheminės medžiagos pusiausvyroje o tirpumo n – oktanolioje ir vandenyje santykis (A.8 metodas), taip pat išreiškiamas K_{ow} . P_{ow} logaritmas naudojamas cheminės medžiagos biologinio koncentravimo vandens organizmuose gebos rodikliu.

Veikimo arba sugerties tarpsnis yra laikas, kurį žuvis yra veikama bandymo medžiagos.

Sugerties greičio konstanta (k_1) yra skaitinė vertė, apibūdinanti bandymo medžiagos koncentracijos žuvyje arba jos paviršiuje (arba nustatytuose jos audiniuose) didėjimo greitį, kai žuvis veikama chemine medžiaga (k_1 išreiškiama para^{-1}).

Tarpsnis po veikimo arba apsivalymo (netekimo) tarpsnis yra laikas, kai bandomoji žuvis buvo pernešta iš terpės su bandymo medžiaga į terpę, kurioje šios medžiagos nėra, kuomet tiriamas apsivalymas (arba bendras mažėjimas) nuo šios medžiagos žuvyje (arba nustatytuose jos audiniuose).

Apsivalymo (netekimo) greičio konstanta (k_2) yra skaitinė vertė, apibūdinanti bandymo medžiagos koncentracijos žuvyje arba jos paviršiuje (arba nustatytuose jos audiniuose) mažėjimo greitį po to, kai bandomoji žuvis buvo pernešta iš terpės su bandymo medžiaga į terpę, kurioje šios medžiagos nėra (k_2 išreiškiama para^{-1}).

1.3. BANDYMŲ METODO ESMĖ

Bandymas susideda iš dviejų tarpsnių: veikimo (sugerties) ir tarpsnio po veikimo (apsivalymo). Sugerties tarpsnio metu atskiros vienos rūšies žuvų grupės veikiamos bent dviejų koncentracijų bandymo medžiaga. Vėliau apsivalymo tarpsniui jos pernešamos į terpę be bandymo medžiagos. Apsivalymo tarpsnis būtinas visuomet, išskyrus atvejus, kai medžiagos sugertis sugerties tarpsnio metu buvo nežymi (pvz., BKF yra mažesnis kaip 10). Bandymo medžiagos koncentracija žuvyje (jos paviršiuje) (arba nustatytuose jos audiniuose) matuojama abiejuose bandymo tarpsniuose. Be dviejų bandymo koncentracijų, kontrolinė žuvų grupė laikoma tokiomis pačiomis sąlygomis, bet be bandymo medžiagos, norint biologinio koncentravimo bandyme pastebėtas galimas neigiamas pasekmes palyginti su palyginamąja kontroline grupe ir gauti bandymo medžiagos fono koncentracijas.

▼B

Sugerties tarpsnis vykdomas 28 paras, jei neįrodoma, kad pusiausvyra yra pasiekta anksčiau. Sugerties tarpsnio trukmės ir nuostoviosios būsenos laiko prognozė gali būti padaryta pagal 3 papildymo lygtį. Pernešus žuvis į kitą švarų indą su ta pačia terpe, bet be bandymo medžiagos, pradedamas apsivalymo periodas. Pageidautina, jei įmanoma, biologinio koncentravimo faktorių apskaičiuoti ir kaip santykį koncentracijos žuvyje (C_f) su koncentracija vandenyje (C_w) tariamosios nuostoviosios būsenos sąlygomis (BKF_{NB}) ir kaip kinetinių 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 nuostovioji būsena per 28 paras nepasiekama, sugerties tarpsnis turi būti pratęstas, kol ji bus pasiekta, arba iki 60 parų, žiūrint, kas anksčiau; 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 pasiklivimo ribos apskaičiuojami pagal modelį, kuris geriausiai aprašo žuvyse ir vandenyje išmatuotas bandymo 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 daugeliui organinių medžiagų yra aiški priklausomybė tarp jų biologinio koncentravimo gebos ir 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 $\log P_{ow} > 3$) 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 bandymų medžiaga.

1.4. INFORMACIJA APIE BANDYMŲ MEDŽIAGĄ

Prieš atliekant biologinio koncentravimo bandymą apie bandymo medžiagą turi būti žinoma tokia informacija:

— tirpumas vandenyje,

— pasiskirstymo koeficientas oktanolio ir vandens mišinyje P_{ow} (taip pat žymimas K_{ow} , nustatomas HPLC metodu pagal A. 8),

— hidrolizė,

— fotocheminis virtimas vandenyje, nustatytas apšvietimo saulės arba modeliuota saulės spinduliuote sąlygomis ir biologinio koncentravimo bandyme naudoto apšvietimo sąlygomis (3),

▼B

- paviršiaus įtempis (t. y. medžiagoms, kurioms $\log P_{ow}$ negali būti nustatytas),
- garų slėgis,
- biologinio suardomumo lengvumas (jei reikia).

Kita reikalinga informacija yra nuodingumas bandyme naudojamoms žuvų rūšims, geriausiai asimptotiška (t. y. nuo laiko nepriklausanti) LC_{50} vertė. Reikia turėti tinkamą žinomo tikslumo, preciziškumo ir jautrumo analizinį metodą bandymo medžiagai bandymo tirpaluose ir biologinėje medžiagoje kiekybiškai nustatyti, kartu su bandinių ruošimo ir laikymo detalėmis. Tai pat turi būti žinoma bandymo medžiagos analizinio nustatymo vandenyje ir žuvies audiniuose riba. Kai naudojama ^{14}C žymėta bandymo medžiaga, turi būti žinoma radioaktyvumo dėl priemaišų buvimo procentinė dalis.

1.5. BANDYMŲ PATIKIMUMAS

Turi būti taikomos tokios sąlygos, kad bandymas būtų patikimas:

- temperatūros kitimas mažesnis kaip ± 2 °C;
- ištirpusio deguonies koncentracija neturi sumažėti daugiau kaip iki 60 % soties koncentracijos;
- sugerties tarpsnio metu bandymo medžiagos koncentracija kame-
roje palaikoma vidutinių išmatuotų verčių ribose su ± 20 %
nuokrypiu;
- bandymo pabaigoje kontrolinių ir veikiamų žuvų mirtingumas
arba kiti neigiami veiksniai (liga) yra mažesnis kaip 10 %; jei
bandymas vyksta kelias savaites arba mėnesius, mirtingumas arba
kiti neigiami veiksniai abiejose žuvų grupėse turi būti mažesnis
kaip 5 % per mėnesį, o bendras mirtingumas 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. BANDYMŲ 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 (R), nerūdijančio plieno arba stiklo. Patyrimas parodė, kad medžiagoms su dideliu sugerties koeficientu, pvz., sintetiniams piretroidams, gali būti reikalingas silanizuotas stiklas. Tokiais atvejais įranga po naudojimo turėtų būti išmesta.

▼ B1.7.2. *Vanduo*

Bandymuose dažniausiai naudojamas paprastas vanduo, jis turi būti imamas iš neužteršto ir vienodos kokybės šaltinio. Skiedimo vandens kokybė turi būti tokia, kad pasirinktų rūšių žuvis nežūtų per aklimatizavimo ir bandymo laiką, jų išvaizdoje arba elgesyje neatsirandant kažko neįprasto. Geriausiu atveju reikėtų pademonstruoti, kad bandomosios rūšys skiedimo vandenyje gali išlikti, augti ir daugintis (pvz., laboratoriniame bandyme su kultūra arba ilgaamžiškumo ciklo toksikologiniame bandyme). 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, o jūros žuvų rūšims – sūrumą. Parametrai, kurie būtų svarbūs žuvų optimaliam gerbūviui, yra visiškai žinomi, tačiau 1 papildyme pateiktos rekomenduojamos bandymuose naudojamo gėlo ir jūros vandens eilės 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 $\pm 0,5$ pH vieneto ribose. Norint užtikrinti, kad skiedimo vanduo per daug neturėtų įtakos bandymo rezultatui (pavyzdžiui, sudarydamas kompleksus su bandymo 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, SO₄), pesticidų (pvz., bendrojo fosforoorganinių ir chlororganinių pesticidų kiekio), bendrosios organinės anglies ir suspenduotų kietųjų dalelių analizė turi būti daroma, 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 daroma ne taip dažnai, o tarpai tarp jų padidinti (pvz., kas šešis mėnesius).

Natūralus kietųjų dalelių kiekis, o taip pat bendrosios organinės anglies (BOA) kiekis skiedimo vandenyje turi būti kuo mažesnis, kad būtų išvengta bandymo medžiagos sugerties organine medžiaga, dėl ko gali sumažėti bandymo medžiagos biologinis prieinamumas (4). Didžiausias kietųjų dalelių leistinas kiekis yra 5 mg/l (sausos medžiagos, sulaikomos 0,45 μ m filtru), o bendrosios organinės anglies – 2 mg/l (žr. 1 priedėlį). Jei reikia, vanduo prieš naudojimą turi būti filtruojamas. Bandomųjų žuvų (ekskrementų) ir maisto likučių indėlis į bendrosios organinės anglies kiekį turi būti kiek įmanoma mažesnis. Organinės anglies koncentracija bandymo rezervuare visą bandymo laiką neturi viršyti bandymo medžiagoje ir, jei naudojama, soliubiliavimo medžiagoje, esančios organinės anglies koncentracijos daugiau kaip 10 mg/l (± 20 %).

1.7.3. *Bandymų tirpalai*

Ruošiamas reikiamos koncentracijos bandymo medžiagos pradinis tirpalas. Pradinį tirpalą geriausiai būtų ruošti bandymų medžiagą tiesiog maišant arba plakant skiedimo vandenyje. Naudoti tirpiklius arba disperguojančias medžiagas (solubilizavimo medžiagas) nerekomenduojama; tačiau jų gali prireikti kai kuriais atvejais, norint pagaminti pakankamai koncentruotą pradinį tirpalą. Tirpikliai, kuriuos būtų galima naudoti, yra etanolis, metanolis, etandiolio monometilis eteris, etandiolio dimetilis eteris, dimetilformamidas ir trietilenglikolis. Disperguojančios medžiagos, kurias galima naudoti, yra Cremophor RH40, Tween 80, metilceliuliozės 0,01 % tirpalas ir HCO-40. Naudojant biologiškai lengvai suardomas medžiagas reikia žiūrėti, kad neatsirastų problemų dėl bakterijų augimo bandymuose pratekančiame vandenyje. Bandymo medžiaga gali turėti žymėtųsių atomus ir turi būti aukščiausio grynumo (pvz., geriausiai > 98 %).

▼B

Bandymuose su pratekančiu vandeniu bandymų koncentracijai bandymų kameroje užtikrinti reikalinga sistema, kuri nuolat dozuotų ir skiestų bandymų medžiagos pradinį tirpalą (pvz., dozuojančią siurblys, proporcingas skiestuvas, saturatoriaus sistema). Geriausiai būtų daryti bent penkis vandens tūrio keitimus per dieną kiekvienoje bandymų kameroje. Geriau naudoti pratekėjimo režimą, tačiau jei jis netinka (pvz., kai tai kenkia bandomiesiems organizmams), galima taikyti pusiau stacionariąją metodiką, jei ji atitinka patikimumo kriterijus. Pradinio tirpalo ir skiedimo vandens srautas turi būti tikrinamas 48 valandas prieš bandymą ir vėliau bent kasdieną 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 patenkinamai prižiūrėti laboratorijoje. Kiti žuvų rūšies pasirinkimo kriterijai apima rekreacinę, komercinę, ekologinę svarbą, taip pat palyginamą jautrumą, sėkmingą naudojimą praeityje ir t. t.

Rekomenduotos 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 bandymų 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 mirtingumas ir taikomi tokie kriterijai:

- populiacijos mirtingumas per septynias paras didesnis kaip 10 %: visa partija atmetama,
- populiacijos mirtingumas per septynias paras 5-10 %: aklimatizuojama dar septynias papildomas paras,
- populiacijos mirtingumas per septynias paras mažesnis kaip 5 %: partija priimama, jei mirtingumas 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.

▼B

1.8. BANDYMO ATLIKIMAS

1.8.1. *Išankstinis bandymas*

Gali būti naudinga atlikti išankstinį bandymą, norint optimizuoti galutinio bandymo sąlygas, pvz., bandymo 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 praktiniu patyrimu (pvz., iš ankstesnio panašios cheminės medžiagos sugerties tyrimo) arba pagal tam tikras empirines priklausomybes, naudojant tirpumo vandenyje duomenis arba bandymo medžiagos pasiskirstymo tarp oktanolio ir vandens koeficientą (žr. 3 priedėlį).

Sugerties tarpsnis turi trukti 28 paras, jei negalima įrodyti, kad pusiausvyra pasiekta anksčiau. Jei nuostovioji būseną nepasiekama per 28 paras, sugerties tarpsnis turi būti pratęstas, atliekant tolesnius matavimus, kol pasiekama nuostovioji būseną arba, iki 60 parų, kas trumpiau.

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 papildymą 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 trumpesnę periodą (pvz., kol bandymo medžiagos koncentracija pasiekia mažiau nei 10 % nuostoviosios 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 bandymo medžiagos koncentracija žuvyje yra vis dar didesnė nei analizinio aptikimo riba.

1.8.2.3. Bandomųjų žuvų skaičius

Koncentracijai nustatyti 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 žuvis ar abiejų lyčių žuvis 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.

▼ **B**

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 turimų žuvų atsargų pobandinį.

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) litrai vandens parai. Didesles įkrovas galima taikyti, jei įrodoma, kad reikiamą bandymo medžiagos koncentraciją įmanoma palaikyti ± 20 % ribose ir kad ištirpusio deguonies koncentracija nesumažėja daugiau kaip iki 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 baltymų bendrasis 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 atitikimą tarp kūno masės ir riebalų kiekio, 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 neužilgo 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 bandymo medžiagos biologinį prieinamumą (1).

Kadangi daugelis pašarų gaminama iš žuvies miltų, pašaras turi būti analizuojamas, ieškant bandymo medžiagos. Taip pat pageidautina analizuoti pašarą pesticidams ir sunkiesiems metalams nustatyti.

▼B**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 papildymą). Turi būti žinomas apšvietimo tipas ir jo charakteristikos. Reikia atkreipti dėmesį į galimą bandymo 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 spindulių.

1.8.2.7. Bandymų koncentracija

Žuvys pratekėjimo sąlygomis veikiamos vandenyje bent dvejų koncentracijų bandymo medžiaga. Paprastai didesnė (arba didžiausia) bandomosios medžiagos koncentracija parenkama taip, kad ji būtų lygi maždaug 1 % jos aštrios asimptotinės LC_{50} ir būtų bent dešimt kartų didesnė nei jos aptikimo riba vandenyje taikomu analizės metodu.

Didžiausią bandymo medžiagos koncentraciją taip pat galima nustatyti padalinant aštrios 96 h LC_{50} vertę iš atitinkamo aštrios ir chroniškos koncentracijų santykio (kai kurių cheminių medžiagų atitinkamas santykis gali keistis maždaug nuo trijų 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 mažesnę nei 10 daugiklį arba turi būti atsižvelgta į galimybę naudoti ^{14}C žymėtą bandymo medžiagą. Neturi būti naudojama koncentracija, kuri būtų didesnė nei bandymo medžiagos tirpumas.

Jei naudojama soliubilizavimo 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 bandymo 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 soliubilizavimo medžiaga tikrinimas, jei buvo nustatyta, kad soliubilizavimo medžiaga neveikia žuvų. Jei taip nėra, turi būti atliekami abu tikrinimai.

1.8.3. Vandens kokybės matavimų dažnis

Bandymo metu visuose induose būtina matuoti ištirpusį deguonį, BOA, 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. BOA 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.

▼B1.8.4. *Bandinių ėmimas ir žuvų bei vandens analizė*1.8.4.1. *Žuvies ir vandens bandinio ėmimo grafikas*

Vanduo iš bandymo kamerų bandymo 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 bandymo medžiagos koncentracija nustatoma tikrinant atitikimą 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 abu bandinius imti dažniau (žr. 4 priedėlį). Papildomi bandiniai dedami saugoti ir analizuojami tik tuo atveju, jei pasirodo, kas pirmosios eilės analizės duomenų nepakanka BKF apskaičiuoti norimu tikslumu.

Tinkamo bandinių ėmimo grafiko pavyzdys pateiktas 4 papildyme. 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 pasiekama nuostovioji būseną, arba 28 paras, žiūrint, kas trumpiau. Jei nuostovioji būseną nebuvo pasiekta per 28 paras, bandinių ėmimas tęsiamas toliau, kol pasiekama nuostovioji būseną, arba iki 60 parų, žiūrint, kas trumpiau. Prieš pradėdant 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 bandymo 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 galima neapdoroti.

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 vandeniui, „sausinamos“ filtravimo popieriumi, tuojau pat užmušamos pačiu tinkamiausiu ir žmoniškiausiu 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 nevēluojant nustatyti, kada pasiekama horizontalioji sugerties kreivės dalis.

▼B

Jei iš karto analizė nedaroma, bandiniai tinkamu būdu laikomi. Prieš pradėdant tyrimą gaunama informacija apie tinkamą konkrečios bandymo medžiagos laikymo metodą, pvz., šaldymą, laikymą 4 °C temperatūroje, laikymo trukmę, ekstrahavimą ir t.t.

1.8.4.3. Analizės metodo kokybė

Kadangi visa bandymo eiga iš esmės priklauso nuo bandymo medžiagai nustatyti taikomo analizės metodo tikslumo, preciziškumo ir jautrumo, eksperimentiškai patikrinkite, ar konkretaus metodo cheminės analizės preciziškumas ir atkuriamumas, taip pat bandymo medžiagos regeneravimas iš vandens ir žuvies yra patenkinami. Taip pat patikrinkite, ar bandymo medžiagos negalima aptikti naudojant skiedimo vandenį.

Jei būtina, bandyme gautoms C_w ir C_f vertėms daromos pataisos, 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 sugerties) būtų kuo mažesni.

1.8.4.4. Žuvies bandinio analizė

Jei bandyme naudojamos žymėtusius 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 nuostovią būseną arba sugerties tarpsnio pabaigą, kas būtų anksčiau, galima apibūdinti pagrindinius metabolitus. Jei BKF, apskaičiuotas pagal bendrąją žymėtusius atomus turinčių likučių kiekį, yra $\geq 1\,000\%$, būtų patartina, o kai kurių cheminių medžiagų rūšių, pvz., pesticidų, atveju labai rekomenduotina, identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti irimo produktus, kurie sudaro daugiau kaip $> 10\%$ bendrojo likučių kiekio žuvies audiniuose nuostoviosios būsenos sąlygomis. Jei yra identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti irimo produktai, kurie atstovauja daugiau kaip $\geq 10\%$ bendrojo žymėtusius atomus turinčių likučių kiekio, taip pat rekomenduojama identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti irimo produktus bandymo vandenyje.

Bandymo medžiagos koncentracija paprastai turi būti nustatoma kiekvienoje pasvetoje atskiroje žuvyje. Jei tai neįmanoma, kiekvieno bandinio ėmimo 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 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 atveju, jei tai įmanoma. Riebalų kiekiui nustatyti turi būti taikomi atinkami metodai (3 priedėlio 8 ir 2 nuorodos). Etaloniniu metodu gali būti rekomenduota ekstrahavimo chloroformo ir metanolio mišiniu metodika (9). Įvairūs metodai neleidžia gauti vienodas vertes (10), todėl svarbu pateikti taikyto metodo detales. Kai tai įmanoma, riebalų analizė turi būti daroma tame pačiame ekstrakte, kuris buvo gautas bandymo medžiagai analizuoti, kadangi riebalus dažnai reikia pašalinti iš ekstrakto prieš tai, kai jį galima būtų analizuoti chromatografiškai. Riebalų kiekis žuvyje (mg/kg šlapios masės) bandymo pabaigoje turi nesiskirti nuo bandymo pradžioje nustatyto kiekio daugiau kaip $\pm 25\%$. Taip pat reikia pateikti procentais apskaičiuotą sausos audinio medžiagos kiekį, kad riebalų koncentraciją būtų galima apskaičiuoti sausos medžiagos kiekiui.

▼B**2. REZULTATAI****2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS**

Bandymo medžiagos sugerties kreivė gaunama aritmetinėje skalėje brėžiant sugerties bandyme gautos koncentracijos žuvyje arba jos paviršiuje (arba nustatytuose audiniuose) kitimą laike. Jei kreivė pasiekė horizontaliąją dalį, t. y., pasidaro beveik asimptotiška laiko ašiai, nuostoviosios būsenos BKF_{NB} apskaičiuojamas taip:

$$\frac{C_f \text{ (nuostovioji būsena) (vidutinė vertė)}}{C_w \text{ (nuostovioji būsena) (vidutinė vertė)}}$$

Kai nuostovioji būsena nepasiekama, BKF_{NB} pakankamu pavojui įvertinti tikslumu gali būti įmanoma apskaičiuoti pagal 80 % ($1,6/k_2$) arba 95 % ($3,0/k_2$) „nuostoviosios 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., bandymo medžiagos žuvyje koncentracijos mažėjimo laike grafiką). Tuomet, turint k_2 vertę ir C_f , 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 parametų 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 biologinio statistiko patarimo.

2.3. REZULTATŲ INTERPRETAVIMAS

Rezultatai turi būti interpretuojami atsargiai, jei išmatuotos bandymo tirpalų koncentracijos yra arti analizinio metodo aptikimo ribos.

Aiškiai apibrėžtos sugerties ir apsivalymo kreivės yra biologinio koncentravimo duomenų geros kokybės ženklas. Dvejoms koncentracijoms nustatytų sugerties (apsivalymo) konstantų kitimas turi būti mažesnis kaip 20 %. Dvejoms bandymų koncentracijoms stebėti dideli sugerties (apsivalymo) greičių skirtumai turi būti registruojami ir pateikti galimi aiškinimai. Dažniausiai gero planavimo tyrimuose BKF verčių pasiklovimo režis artėja prie ± 20 %.

3. ATASKAITOS PATEIKIMAS

Bandymų ataskaita turi apimti tokią informaciją:

3.1. BANDYMŲ 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 atomo (-ų) padėtis ir su priemaišomis siejamo radioaktyvumo procentinė dalis.

▼B

3.2. BANDOMOSIOS RŪŠYS

- mokslinis pavadinimas, rūšis, šaltinis, bet koks išankstinis apdorojimas, aklimatizavimas, amžius, dydžio intervalas ir t. t.

3.3. BANDYMŲ SĄLYGOS:

- naudota bandymų metodika (pvz., pratekėjimo arba pusiau stacionariomis sąlygomis),
- naudoto apšvietimo tipas ir charakteristikos bei apšvietimo periodas (-ai),
- bandymų 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 soliubilizavimo medžiaga, turi būti nurodyta jos koncentracija ir indelis į organinės anglies kiekį bandymo vandenyje),
- norminės bandymų koncentracijos, bandymų 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 demonstravimo rezultatai ir vandens charakteristikos: pH, kietumas, temperatūra, ištirpusio deguonies koncentracija, liekamojo chloro lygiai (jei matuoti), bendroji organinė anglis, suspenduotos kietosios dalelės, bandymo terpės sūrumas (jei tinka) ir visi kiti daryti matavimai,
- vandens kokybė bandymų rezervuaruose, pH, kietumas, BOA, 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 bandymų 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 mirtinumas bei bet koks jų neįprastas elgesys,
- riebalų kiekis žuvyje (jei nustatymas daromas bandymo proga),
- kreivės (įskaitant visus matavimuose gautus duomenis), rodančios bandymų medžiagos sugertį žuvimis ir jų apsivalymą laikas iki nuostoviosios būsenos,

▼ B

- Cf ir Cw (ir jų standartinis nuokrypis bei intervalas, jei tinka) visiems bandinio ėmimo atvejams (Cf išreikšta ug/g viso kūno arba tam tikrų jo audinių, pvz., riebalų, šlapios masės (ppm), o Cw – µg/ml (ppm)). Cw vertės kontrolinėse serijose (taip pat turi būti nurodytas fonas),
- nuostoviosios būsenos biologinio koncentravimo faktorius (BKFNb) ir (arba) kinetinis koncentravimo faktorius (BKFK) ir, jei taikytina, 95 % pasiklivimo ribos sugerties ir apsivalymo (netekimo) greičio konstantoms (viskas apskaičiuota viso gyvūno kūno ir bendro riebalų kiekio, jei nustatytas, arba tam tikrų jo audinių atžvilgiu), pasiklivimo ribos ir standartinis nuokrypis (kai yra) bei apskaičiavimo (duomenų analizės) metodai kiekvienai naudotos bandymo 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 tinkama informacija,

Mažinkite rezultatų, kurie būtų „nenustatyti aptikimo riboje“, kieki, 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(1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.
- 8) Compaan H. (1980) in „The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation“ Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, the Hague, The Netherlands.

▼B

- 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.



I PRIEDAS

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 fosforoorganinių pesticidų kiekis	50 ng/l
6	Bendras chlororganinių pesticidų ir polichlorintų dife- nilų 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

▼B

2 PRIEDAS

Bandyti rekomenduotos žuvų rūšys

	Rekomendmatos rūšys	Rekomenduotas bandymų temperatūros intervalas (°C)	Rekomenduotas bandomojo gyvūno bendras ilgis (cm)
1	<i>Danio rerio</i> ⁽¹⁾ (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (Hamilton-Buchanan) Dryžuotasis danio	20–25	3,0±0,5
2	<i>Pimephales promelas</i> (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (<i>Rafinesque</i>) Rainė (<i>Phaxinus phoxinus</i>)	20–25	5,0±2,0
3	<i>Cyprinus carpio</i> (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (Linnaeus) Paprastasis karpis	20–25	5,0±3,0
4	ORYZIA latipes (<i>Teleostei, Poeciliidae</i>) (Temminck ir Schlegel) Japūninė medaka, japoninė oryzija	20–25	4,0±1,0
5	<i>Poecilia reticulata</i> (<i>Teleostei, Poeciliidae</i>) (Peters) Gupis	20–25	3,0±1,0
6	<i>Lepomis macrochirus</i> (<i>Teleostei, Centrarchidae</i>) (<i>Rafinesque</i>) Ilgapelekis saulešeris, melsvažiaunis saulešeris	20–25	5,0±2,0
7	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (<i>Teleostei, Salmonidae</i>) (<i>Walbaum</i>) Margasis upėtakis	13–17	8,0±4,0
8	<i>Gasterosteus aculeatus</i> (<i>Teleostei, Gasterosteidae</i>) (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 buvo naudojamos įvairios upių žiočių ir jūros žuvų rūšys, pvz.

Dryžuotoji kupriukė	<i>Leiostomus xanthurus</i>
Margasis dančiakarpis	<i>Cyprinodon variegatus</i>
Priekrančių menidija	<i>Menidia beryllina</i>
Tuntiniai gyvavedžiai ešeriai	<i>Cymatogaster aggregata</i>
Plekšnė	<i>Parophrys vertulus</i>
Siauragalvė plernė	<i>Leptocottus armatus</i>
Trispyglė dyglė	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
Jūros ešerys	<i>Dicentracus labrax</i>
Aukšlė	<i>Albumus albumus</i>

Rinkimas

Lentelėje nurodytas gėlųjų vandens žuvis lengva auginti ir (arba) jų galima gauti ištisus metus, tuo tarpu galimybė gauti jūros ir upių žiočių žuvų iš dalies ribota 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.

▼ B*3 Priedas***Sugerties ir apsivalymo tarpsnių trukmės prognozavimas**1. *Sugerties tarpsnio trukmės prognozavimas*

Prieš atliekant bandymą, k_2 įvertis, taigi, nuostoviajai būsenai pasiekti reikalingo laiko tam tikra procentinė dalis, gali būti gauta iš empirinių priklausomybių tarp k_2 ir n – oktanolio/vandens pasiskirstymo koeficiento (P_{ow}) arba k_2 ir tirpumo vandenyje (s).

k_2 (para^{-1}) įvertis gali būti gautas, pvz., pagal tokią empirinę priklausomybę (1):

$$\log_{10} k_2 = 0,414 \log_{10}(P_{ow}) + 1,47 \quad (r_2 = 0,95) \quad (1 \text{ lygtis})$$

Kitos priklausomybės pateiktos 2 nuorodoje.

Jei pasiskirstymo koeficientas (P_{ow}) nežinomas, įvertis gali būti padarytas (3), jei žinomas medžiagos tirpumas vandenyje (s), taikant lygtį:

$$\log_{10}(P_{ow}) = 0,862 \log_{10}(s) + 0,710 \quad (r_2 = 0,994), \quad (2 \text{ lygtis})$$

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).

Nuostoviajai 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):

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

arba, jei C_w yra pastovus dydis:

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

Artėjant prie nuostoviosios būsenos ($t \rightarrow \infty$), 3 lygtis gali būti supaprastinta (5) (6) iki:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \text{ arba } C_f/C_w = k_1/k_2 = \text{BCF}$$

Tokiu atveju, $k_1/k_2 \times C_w$ yra arti koncentracijos žuvyje „nuostoviosios būsenos“ sąlygomis ($C_{f,s}$).

3 lygtis gali būti pertvarkyta į

$$C_f = C_{f,s}(1 - e^{-k_2 t}) \text{ arba } \frac{C_f}{C_{f,s}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad (4 \text{ lygtis})$$

Taikant 4 lygtį, galima prognozuoti laiką, reikalingą pasiekti tam tikrą nuostoviosios būsenos procentinę dalį, kai pagal 1 arba 2 lygtį iš anksto yra įvertinta k_2 .

▼B

Statistiškai priimtiniams duomenims (BKF_K) gauti statistiškai optimalios sugerties tarpsnio trukmės atskaitos tašku laikomas laikas, per kurį kreivė, vaizduojanti priklausomybę tarp bandymų medžiagos žuvyje koncentracijos logaritmo ir tiesinėje skalėje atidėto laiko, pasiektų jos vidurio tašką arba $1,6/k_2$, arba 80 % nuostoviosios būsenos, tačiau ne didesnis kaip $3,0/k_2$, arba 95 % nuostoviosios būsenos (7).

Laikas 80 % nuostoviosios būsenos pasiekti yra lygus (4 lygtis):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \text{ arba } t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \quad (5 \text{ lygtis})$$

Panašiu būdu, laikas 95 % nuostoviosios būsenos pasiekti yra lygus:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \quad (6 \text{ lygtis})$$

Pvz., sugerties tarpsnio trukmė (sug) bandymų medžiagai, kurios $\log_{10}(P_{ow}) = 4$, būtų (taikant lygtis 1, 5 ir 6):

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \cdot (4) + 1,47 \quad k_2 = 0,652 \text{ paros}^{-1}$$

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 bandymų medžiagos $s = 10^{-5} \text{ mol/l}$ ($\log(s) = -5,0$), sug trukmė būtų (taikant lygtis 1, 2, 5 ir 6):

$$\log_{10}(P_{ow}) = -0,862 \cdot (-5,0) + 0,710 = 5,02$$

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \cdot (5,02) + 1,47$$

$$k_2 = 0,246 \text{ paros}^{-1}$$

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:

$$T_{eq} = 6,54 \times 10^{-3} P_{ow} + 55,31 \text{ (valandos)}$$

gali būti naudojama apskaičiuoti laiką, reikalingą tikrajai nuostoviajai 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 redukuota į lygtį:

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

▼ **B**

kurioje C_f o yra koncentracija apsivalymo tarpsnio pradžioje. Tuomet 50 % apsivalymas bus pasiektas per laiką (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \text{ arba } t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Panašiai, 95 % apsivalymas bus pasiektas per laiką:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

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 neklausoma, turi būti naudojami sudėtingesni modeliai (pvz., (1) nuoroda).

Nuorodos (3 priedo)

- 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 bioconcentration 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 & Sons Ltd N. Y.
- 7) Reilly P. M., Bajramovic R., Blau G. E., Branson D. R. and Sauerhoff M. W. (1977). *Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models*, Can. J. Chem. Eng. 55. 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.

▼B

4 Priedas

Bandinių ėmimo tiriant medžiagų, kurių log P_{ow} = 4, Biologinį koncentravimą grafiko teorinis pavyzdys

Žuvų bandinių ėmimas	Bandinių ėmimo tvarkarštis		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 bandymo 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“.

NB: Prieš bandymą darytas k₂ 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 papildymą.

Vertės skliausteliuose rodo bandinių (vandens, žuvų) skaičių, kurį reikia paimti, jei daromas papildomas bandinių ėmimas.

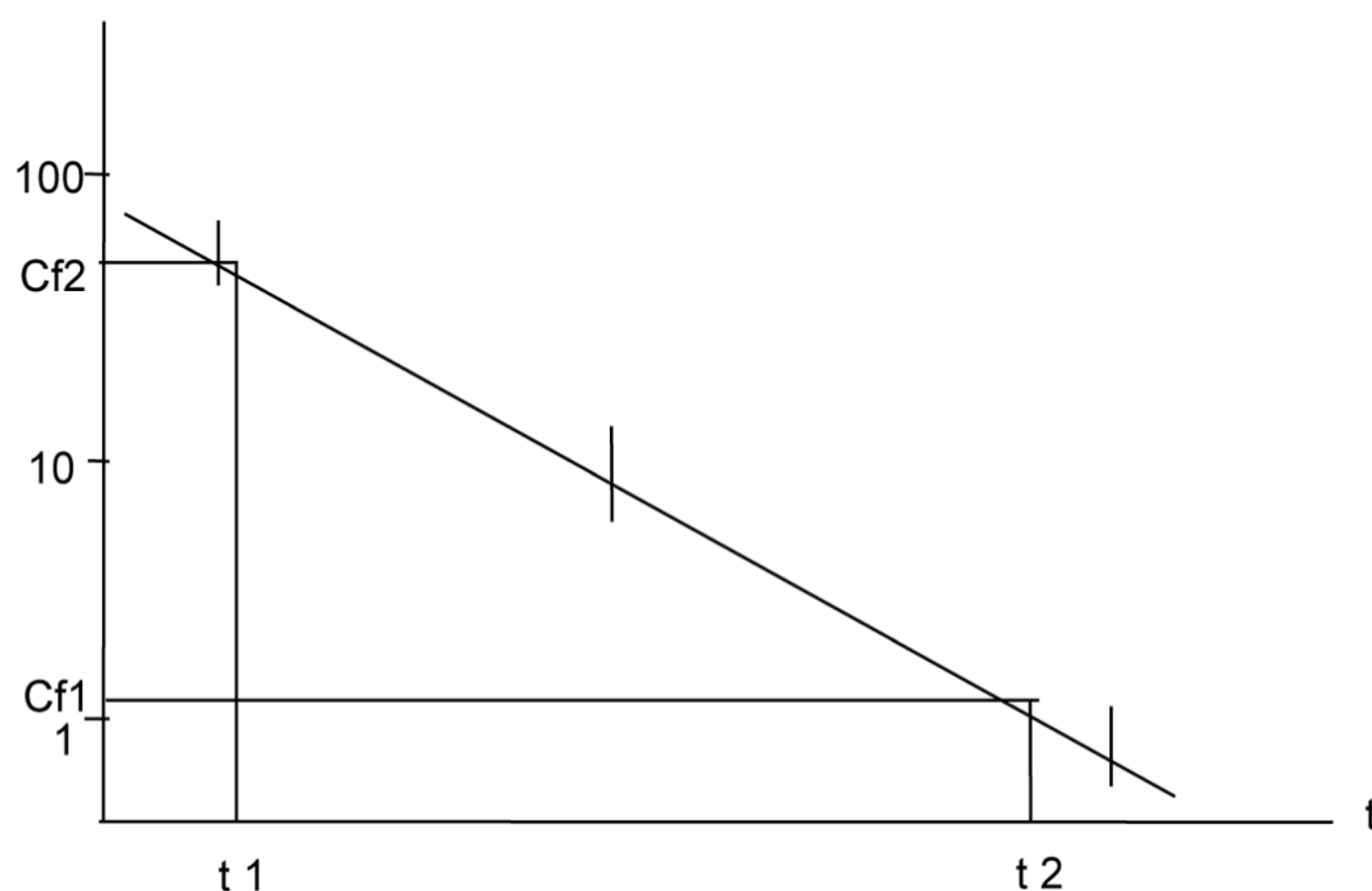
▼ **B**5 *Priedėlis***Modelio pasirinkimas**

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 and Hamelink, 3 papildymo 1 nuoroda).

Grafinis metodas apsivalymo (netekimo) greičio konstantai k_2 nustatyti

Pusiau logaritminiame popieriuje nubraižykite kiekviename žuvies bandinyje rastos bandymo 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:

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \quad (1 \text{ lygtis})$$

▼B**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 parametų vertinimo metodų taikymas panaudojant kompiuterį. Jei duota koncentracijos kitimo laike duomenų aibė ir modelis, šios programos apskaičiuoja k_1 ir k_2 vertes:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(1 - e^{-k_2 t}\right) \quad 0 < t < t_c \quad (2 \text{ lygtis})$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}\right) \quad t > t_c \quad (3 \text{ lygtis})$$

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 parametų 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 .

▼ B

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 cheminių medžiagų ilgo veikimo poveikius žuvų mailiaus augimui. Jis pagrįstas Europos Sąjungoje sukurtu ir tarplaboratoriniais bandymais patikrintu (1) (3) dinaminio metodu, taikytu įvertinti cheminių medžiagų poveikius vaivorykštinio upėtakio (*Oncorhynchus mykiss*) mailiaus augimui. Galima naudoti kitas dokumentais tinkamai patvirtintas rūšis. Pvz., įgyta patyrimo darant dryžuotojo danio (*Danio rerio*) ⁽¹⁾ (3) (4) ir *ricefish* (*medaka*, *Oryzias latipes*) (5) (6) (7) augimo bandymus.

Žr. taip pat C dalies bendrąjį įvadą.

1.2. APIBRĖŽIMAI

Mažiausia stebimo poveikio koncentracija LOEC – mažiausia bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant medžiagos poveikis yra statistiškai reikšmingas lyginant su kontroliniais bandiniais ($p < 0,05$). Tačiau visų didesnių kaip LOEC bandomųjų koncentracijų kenksmingas poveikis turi būti lygus ar didesnis už LOEC poveikis.

Nestebimo poveikio koncentracija NOEC – bent kiek už LOEC mažesnė bandomoji koncentracija.

EC_x – šiam bandymui 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 rezervuarui – išreiškia rezervuaro populiacijos vidutinį augimo greitį 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.

▼B

1.3. BANDYMO METODO ESMĖ

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 diapazono 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 stebimo poveikio koncentracijai (LOEC), taigi ir nestebimo 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 daryto su šiam bandymui pasirinkta rūšimi, rezultatus. Tai reikėtų, kad yra žinomas bandomosios medžiagos tirpumas vandenyje ir garų slėgis ir kad yra patikimas metodas ištirpintai bandomajai medžiagai kiekybiškai nustatyti žinomą tikslumą ir aptikimo riba, kurie nurodomi ataskaitoje.

Naudingą informaciją sudaro struktūrinė formulė, medžiagos grynumas, stabilumas vandenyje ir veikiant šviesai, pK_a , P_{ow} ir lengvo biologinio skaidomumo bandymo rezultatai (žr. C.4 metodą).

1.5. BANDYMO VALIDUMAS

Bandymas yra validus, jei galioja šios sąlygos:

- baigiant bandymą kontrolinio (-ių) bandinio (ių) žuvų gaištumas 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 dar laikomas reikšmingu. Tarplaboratorinio lyginimo bandymas (3) 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: $\geq 1,5$ g/žuviai (≥ 150 %);
- ištirpusio deguonies koncentracija per visą bandymą turi sudaryti bent 60 % soties ore vertės (ASV);
- kiekvienu bandymo momentu bandymo kamerų vandens temperatūra turi nesiskirti daugiau kaip ± 1 °C ir būti palaikoma 2 °C intervale bandymo rūšims nurodytame diapazone (1 priedėlis).

1.6. BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.6.1. Aparatūra

Įprasta laboratorinė įranga ir ši speciali įranga:

- deguonies ir pH matuokliai,

▼B

- įranga vandens kietumui ir šarmingumui nustatyti,
- atitinkama aparatūra temperatūrai kontroliuoti, geriau nuolatinės kontrolės aparatūra,
- rezervuarai, pagaminti iš chemiškai inertiškos medžiagos ir rekomenduotą įkrovą bei žuvų tankį atitinkančios talpos (žr. 1.8.5 skirsnį ir 1 priedėlį),
- reikiamo tikslumo svarstyklės (t. y. $\pm 0,5$ % tikslumo).

1.6.2. Vanduo

Galima naudoti bet kokį vandenį, kuriame žuvis gali ilgai gyventi ir augti. Vandens kokybė turi būti pastovi visą bandymo laiką. pH vertė turi būti 6,5-8,5, tačiau darant konkretų bandymą pH reikšmė neturi kisti daugiau kaip $\pm 0,5$ pH vieneto. Rekomenduojamas didesnis kaip 140 mg/l (skaiciuojant 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, Cl, SO_4), pesticidų (pvz., fosforo organinių ir chloro organinių pesticidų bendro kiekio), bendrosios organinės anglies ir suspenduotų kietųjų dalelių analizė turi būti daroma, 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 daroma 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 organinius tirpiklius ar dispergatorius. 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 suardomas medžiagas (pvz., acetoną) ir (ar) labai lakius junginius, nes, darant dinaminius bandymus, jie gali kelti problemų dėl bakterijų kaupimosi. Naudojama soliubilizavimo medžiaga neturi daryti reikšmingo poveikio žuvų augimui ir neigiamo poveikio mailiui, kaip kad nustatoma darant kontrolinį bandymą vien tik su tirpikliu.

▼B

Bandomosios koncentracijos tirpalams į bandymo kameras tiekti dinaminių bandymų metu reikalinga sistema, kuri nepertraukiamai dozuočių 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 (3) parodė, kad, darant 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 didžiausias tarplaboratorinio palyginimo bandymų patyrimas buvo sukauptas naudojant šią rūšį (1) (3). Galima naudoti ir kitas dokumentais tinkamai patvirtintas rūšis, bet tinkamoms bandymo sąlygoms gauti bandymo metodiką gali tekti pritaikyti. Pvz., igyta patyrimo su dryžuotuoju danio (*Danio rerio*) (3) (4) ir ricefish (*medaka*, *Oryzias latipes*) (5) (6) (7). Tokiu atveju ataskaitoje reikia pateikti rūšies pasirinkimo priežastį ir bandymų metodą.

1.6.5. **Žuvų laikymas**

Pasirenkamos vieno štamo populiacijos ir geriau to paties neršto bandymo žuvis, 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 %: žuvis 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 žuvis neturėtų būti gydomos vaistais.

▼B

1.7. BANDYMO PLANAS

„Bandymo planas“ bandomosios koncentracijos verčių ir tarpo tarp jų pasirinkimas, rezervuarų skaičiaus kiekvienai koncentracijai ir žuvų skaičiaus viename rezervuare parinkimas. Geriausia būtų, kad bandymo planas būtų pasirinktas atsižvelgiant į:

- tyrimo tikslą
- taikomą statistinės analizės metodą;
- bandymų 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 (9) 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 analizuojamo bandymo plano nagrinėtini klausimai yra šie:

- Bandymui naudotos koncentracijos būtinai turi aprėpti poveikio koncentraciją (pvz., $EC_{10, 20, 30}$) ir dominančio medžiagos poveikio koncentracijos verčių diapazoną. Poveikio koncentracijos įverčių preciziškumas bus geriausias, kai poveikio koncentracijos bus per bandomųjų koncentracijos verčių diapazono vidurį. Tinkamoms bandomosioms koncentracijoms parinkti gali būti naudingas išankstinis diapazono nustatymo bandymas.
- Norint turėti patenkinamą statistinį modelį, bandymui turi būti naudojamas vienas kontrolinis rezervuaras ir penki papildomi rezervuarai, skirti skirtingoms koncentracijos vertėms. Jei naudojama soliubilizavimo medžiaga, be bandomosios serijos, turi būti dar vienas kontrolinis bandinys su didžiausios bandomosios koncentracijos soliubilizavimo 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.

▼ B

- Jei yra daugiau kaip šeši rezervuarai, papildomi rezervuarai turi būti panaudoti lygiagrečiams bandymams arba paskirstyti visam koncentracijos verčių diapazonui tarpams tarp jų sumažinti. Abi šios priemonės vienodai tinka.

1.7.2. NOEC/LOEC įvertinimo planas taikant dispersing analizę

Kiekvienai koncentracijos vertei geriau būtų turėti dar vieną rezervuarą ir statistinę analizę turėtų būti daroma rezervuaro lygiu (11). Jei nėra rezervuarų lygiagrečiam bandymui, neįmanoma atsižvelgti į kintamumą tarp rezervuarų be to kintamumo, kuris atsiranda dėl atskirų žuvų. Tačiau patyrimas parodė (12), 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 daromi turint rezervuarus lygiagrečiams 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 lygiagrečiams bandymams nėra, kontrolinės grupės žuvų skaičius turi būti lygus kiekvienai bandomajai koncentracijai naudojamam žuvų skaičiui.

Jei dispersinė analizė (ANOVA) turi būti daroma rezervuarų lygiu, o ne kiekvienos žuvies lygiu (tam reikėtų kiekvieną žuvį paženklinėti ar naudoti „pseudo“ savituosius augimo greičius (žr. 2.1.2 skirsnį)), reikia turėti pakankamą rezervuarų lygiagrečiams bandymams skaičių, kad būtų galima nustatyti standartinį nuokrypį tarp „vienos koncentracijos rezervuarų“. Vadinasi, dispersinės analizės paklaidai reikėtų turėti bent 5 laisvės laipsnius (10). Jei daromi tik lygiagretūs kontroliniai bandymai, esama pavojaus, kad paklaidos kintamumas bus pasislinkęs, 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. DARBO EIGA

1.8.1. Bandymų žuvų atranka ir svėrimas

Svarbu, kad žuvų masės skirtumas bandymo pradžioje būtų kuo mažesnis. Bandymams rekomenduotų skirtingų rūšių žuvų masės tinkami diapazonai yra pateikti 1 priedėlyje. Būtų geriausia, kad bandymo pradžioje visos partijos žuvų masės kitimo diapazonas būtų lygus žuvų masės aritmetiniam vidurkiui $\pm 10\%$ ir jokių būdu nebūtų didesnis kaip 25% . Vidutinei masei nustatyti rekomenduojama prieš bandymą pasverti žuvų ėminio dalį.

▼B

Žuvys turi būti nustoamos maitinti prieš 24 h iki bandymo pradžios. Toliau jos turi būti atsitiktinai atrenkamos. Vartojant bendrąją 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 diapazoną paliekamos ir vėliau paskirstomos tarp bandymų indų. Turi būti registruojama bendra kiekvieno bandymų 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 bandymų 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 naudotas 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 (3) parodė, kad vaivorykštiniam upėtakiui priimtina įkrova, jei 40 l tūrio vandenyje būtų 16 upėtakių po 3–5 g masės. Rekomenduojamas vandens keitimo darant 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 drums-tumo. Vaivorykštiniam upėtakiui 4 % kūno masės davinys per parą turėtų atitikti šias sąlygas (3) (16) (17) (18). Paros davinys turi būti padalytas į dvi lygias dalis ir sušeriamas žuvims per du kartus darant bent penkių valandų pertrauką. Davinys grindžiamas kiekvieno bandymų indo bendra pradine žuvų mase. Jei žuvys vėl sveriamos 14 parą, davinys perskaičiuojamas. Prieš sveriant žuvys turi būti nemaitintos 24 h.

▼B

Nesuėstas maistas ir išmatos iš bandymų 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 planą (žr. 1.7.2 skirsnį). Ankstesnės žinios apie bandomosios medžiagos toksiškumą (pvz., ūmaus toksiškumo bandymo ir (ar) koncentracijų diapazono 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 soliubilizavimo medžiaga, jos galutinė koncentracija turi būti ne didesnė kaip 0,1 ml/l, ir geriau būtų, jei ji visuose bandymų 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 plano (žr. 1.7-1.7.2 skirsnius). Jei naudojama soliubilizavimo medžiaga, į bandymo planą turi būti įtrauktas toks soliubilizavimo medžiagos kontrolinių bandinių skaičius, kiek yra skiedimo vandens kontrolinių bandinių.

1.8.5. **Kiekybinių analizių ir matavimų dažnis**

Darant bandymą bandomosios medžiagos koncentracijų vertės nustatomos reguliariais tarpais (žr. toliau).

Darant dinامينius bandymus, skiediklio ir toksiškos 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 % diapazonu; žr. 1.6.2 ir 1.6.3 skirsnius), rekomenduojama bent didžiausią ir mažiausią bandomąją koncentraciją nustatyti bandymo pradžioje, o vėliau kas savaitę. Jei darant bandymus nesitikima, kad bandomosios medžiagos koncentracija gali likti vardinės koncentracijos ± 20 % vertės (pagal bandomosios medžiagos stabilumo duomenis), būtina nustatyti visas bandomąsias koncentracijas, bet pagal tą patį grafiką.

Jei tikimasi, kad, darant pusiau statinius (atnaujinimo) bandymus, bandomosios medžiagos koncentracija liks vardinės koncentracijos ± 20 % 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 darant nemanoma, kad koncentracija liks vardinės koncentracijos ± 20 % vertės, turi būti nustatomos visos koncentracijos vertės laikantis to paties kaip ir stabilioms medžiagoms analizės režimo.

▼B

Rekomenduojama rezultatus pagrįsti išmatuotomis koncentracijos vertėmis. Tačiau jei yra įrodymų, leidžiančių parodyti, kad bandomosios medžiagos koncentracija visą bandymo laiką buvo patenkinamai palaikoma vardinės koncentracijos $\pm 20\%$ vertės ar išmatuotos pradinės koncentracijos vertės, rezultatai gali būti grindžiami vardine ar išmatuota vertėmis.

Bandinius gali tekti filtruoti (pvz., pro $0,45\ \mu\text{m}$ akytumo filtrą) ar centrifuguoti. Rekomenduojama metodika būtų centrifugavimas. Tačiau, jei filtras bandomosios medžiagos neabsorbuoja, priimtinas būtų ir filtravimas.

Darant bandymą visuose bandymų 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). Mažiausiai ištirpusio deguonies koncentracija ir sūrumas (jei tinka) turi būti matuojami tris kartus (bandymo pradžioje, viduryje ir pabaigoje). Darant pusiau statinius bandymus, ištirpusio deguonies koncentraciją rekomenduojama matuoti dažniau, geriau prieš kiekvieną vandens atnaujinimą ir po jo ar bent kartą per savaitę. Darant statinius bandymus su atnaujinimu pH vertė turi būti matuojama prieš kiekvieną vandens atnaujinimą ir po jo, o darant dinامينius bandymus – bent kartą per savaitę. Vandens kietumas ir šarmingumas kiekvienam bandymui matuojami vieną kartą. Temperatūrą bent viename bandymų 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 bandymų indus ar atskirai kiekvienos žuvies. Labiau tinka svėrimas bandymų 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 tiktį žuvų ženklinimo užšaldant 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 viename rezervuarui tenkančio žuvų skaičiaus kitimo. Tačiau maitinimo normą reikia koreguoti.

2. DUOMENYS IR ATASKAITA

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

Rekomenduojama, kad, rengiant bandymo planą ir jį 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 plano variantų įvairovę, jokių specialių nurodymų dėl statistinės metodikos čia nepateikiama.

▼ B

Augimo greitis neturėtų būti apskaičiuojamas bandymų 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 žuvis yra ženklinamos atskirai ar ne, arba pagal tai, ar reikia nustatyti rezervuarui vidutinį greitį.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

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 laikotarpiais.

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 šį 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.

▼B

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 pasiklovimo intervalą). Pritaikyto modelio grafikas turėtų būti parodytas lyginant su duomenimis, kad būtų galima įvertinti pritaikyto modelio atitikimą (9) (19) (20) (21).

2.1.2. Rezultatų analizė LOEC įvertinti

Jei darant 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 kriterijus (13) (14) (15) (22), 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 kriterijaus reikšmingumo lygmeniui. Jei parametriniais metodams reikiamos hipotezės (nenormalus pasiskirstymas (pvz., *Shapiro—Wilk* kriterijus) ar heterogeninė sklaida (*Bartlett* kriterijus)) nepasitvirtina, reikėtų numatyti duomenų pertvarkymą sklaidoms homogenizuoti prieš darant dispersinę analizę ar daryti svorinę dispersinę analizę.

Jei darant bandymą rezervuarai lygiagrečiam bandymui yra ne visoms koncentracijos vertėms, rezervuarais pagrįsta dispersinė analizė bus nejautri ar neįmanoma. Šiuo atveju priimtinas vidurys 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 patyrimas parodė (9), 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 toksiškų medžiagų koncentracijos vertės yra arti analizės metodo aptikimo ribos arba jei darant 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:

▼B**2.3.1. Bandomoji medžiaga:**

- fizikinė būseną ir atitinkamos fizikocheminės savybės,
- cheminio identifikavimo duomenys, įskaitant grynumą, ir, jei tinka, analizės metodas bandomajai medžiagai kiekybiškai nustatyti.

2.3.2. Bandymų 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 planas (pvz., bandymų indų skaičius, bandomosios koncentracijos ir lygiagrečių bandinių skaičius, žuvų skaičius viename inde),
- pradinių tirpalų ruošimo metodas ir jų atnaujinimo dažnis (jei naudojama soliubilizavimo medžiaga, turi būti nurodyta jos koncentracija),
- vardinės bandymo koncentracijos, bandymų 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,
- bandymų 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 išlikimo validumo 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;

▼B

— 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.

▼ B

- 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 *Textbook of Fish Health*. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 P.
- 18) Bruce, R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data . *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494.
- 19) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M.D. and McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA.
- 20) Norbert-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. p. 12.
- 21) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, p. 510–531.

BANDYMAMS REKOMENDUOJAMOS ŽUVŲ RŪŠYS IR TINKAMOS BANDYMO SĄLYGOS

Rūšys	Rekomenduojamas bandymo temperatūros diapazonas (°C)	Apšvietimo trukmė (valandos)	Rekomenduojamas žuvų pradinės masės diapazonas (g)	Butinas matavimo preciziskumas	Įkrova (g/l)	Gyvūnų tankis (litrai)	Maistas	Bandymo trukmė (paros)
Rekomenduojamos rūšys: <i>Oncorhynchus mykiss</i> 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: <i>Danio rerio</i> Dryžuotasis danio	21 — 25	12 — 16	0,050 — 0,100	1 mg tikslumu	0,2 — 1,0	5 — 10	Gyvas maistas (<i>Brachionus Artemia</i>)	≥ 28
<i>Oryzias latipes</i> ricefish (Medaka)	21 — 25	12 — 16	0,050 — 0,100	1 mg tikslumu	0,2 — 1,0	5 — 20	Gyvas maistas (<i>Brachionus Artemia</i>)	≥ 28

*2 priedelis***KAI KURIOS TINKAMO SKIEDIMO VANDENS CHEMINĖS
CHARAKTERISTIKOS**

Medžiaga	Koncentracija
Kietosios dalelės	< 20 mg/l
Bendra 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 dife- nilų kiekis	< 50 ng/l
Bendras organinis chloras	< 25 ng/l

▼B

3 Priedelis

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.

▼B**C.15. ŽUVYS, TRUMPALAIKIS TOKSIŠKUMO EMBRIONUI IR MAILIUI SU TRYNIO MAIŠELIU BANDYMAS****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 chroniško 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 chroniško toksiškumo žuvims įvertį ir kad bent kiek sutrumpinus veikimą neįtraukiant kurios nors gyvenimo stadijos, gali sumažėti jautrumas, taigi gali būti nepakankamai įvertintas chroniškas 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 toksiško 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 patyrimo darant embriono ir mailiaus su trynio maišeliu bandymą buvo sukaupta su gėlavandene žuvimi *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae* – įprastas danio pavadinimas). Taigi smulkesni nurodymai, kaip daryti šios žuvų rūšies bandymą pateikti 1 priedėlyje. Tačiau tai netrukdo naudoti kitas rūšis, su kuriomis yra sukaupta patyrimo (1 lentelė).

1.2. APIBRĖŽIMAI

Mažiausia stebimo poveikio 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.

Nestebimo poveikio koncentracija NOEC: bent kiek už LOEC mažesnė bandomoji koncentracija.

▼B

1.3. BANDYMO ESME

Embriono ir mailiaus su trynio maišeliu augimo stadijų žuvis 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 žuvis. 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/EC x , čia x yra tam tikras % išreikštas poveikis).

1.4. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

Reikėtų turėti ūmaus toksiškumo bandymo (žr. C.1 bandymo metodą), geriau daryto su šiam bandymui pasirinkta rūšimi, rezultatus. Rezultatai gali būti naudingi ankstyvųjų gyvenimo tarpsnių bandymui pasirenkant atitinkamą bandomųjų koncentracijų diapazoną. 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 skaidomumo bandymo rezultatai (žr. C.4 metodą).

1.5. BANDYMO VALIDUMAS

Bandymas yra validus, jei galioja 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 % soties ore vertės (ASV),
- kiekvienu bandymo momentu temperatūros verčių bandymo kameroje ar skirtingomis bandymo dienomis skirtumas turi būti ne didesnis kaip $\pm 1,5$ °C ir temperatūra turėtų būti palaikoma bandymo rūšims nurodytu diapazonu (2 ir 3 priedėliai).

▼B

1.6. BANDYMŲ METODO APRAŠYMAS

1.6.1. **Bandymų 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). Bandymų indus bandymo plote rekomenduojama išdėstyti atsitiktinai. Jei laboratorijoje yra sisteminiai poveikiai, kuriuos būtų galima kontroliuoti suskirstant į blokus, indus geriau išdėstyti nevysiškai atsitiktinai, bet pagal randomizuotą blokinę schemą kiekviename bloke darant kiekvieną apdorojimą. Jei taikoma blokinė schema, į tai būtina atsižvelgti vėliau analizuojant duomenis. Bandymų 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 bandymų sąlygas, gali tekti priderinti bandymų metodiką. Šiuo atveju ataskaitoje turi būti pagrįstas rūšies parinkimo motyvas ir tyrimo metodas.

1.6.3. **Veislinių žuvų laikymas**

Detalių apie veislinių žuvų laikymą patenkinamomis 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 sienes 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 ikrų gali būti laikomi dėžėse ar tinkluose su pakankamai didelėmis akutėmis, kad išsiritusios lervos galėtų pro jas iškristi. Lervoms pernešti darant pusiau statinius bandymus su visišku kasdieniu atnaujinimu tinka Pastero pipetės (žr. 1.6.6 skirsnį).

Jei ikrų talpyklos, grotelės ar tinkeliai buvo naudojami ikrams pagrindiniame inde laikyti, šitos apribojimo priemonės turėtų būti pašalintos išsiritus lervoms, tačiau reikia palikti tinkelius, 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 gležnomis rūšims, pvz., karpui). 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 turis 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

▼ **B**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 $\pm 0,5$ 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 anjonų 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 daroma, 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 daroma 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 (soliubilizavimo 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 laktus junginius, nes, darant dinامينius bandymus, jie gali kelti problemų dėl bakterijų kaupimosi. Naudojama soliubilizavimo medžiaga neturi daryti reikšmingo poveikio išgyvenamumui ir neigiamo poveikio ankstyvosioms stadijoms, kaip kad nustatoma darant 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 švairuose induose ir gyvi likę ikrai bei lervos mažuose seno tirpalo tūriuose švelniai pernešami į naujus indus vengiant sąlyčio su oru; ar 2) bandymų 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.

▼B

Bandomosios koncentracijos tirpalams į bandymo kameras tiekti darant dinامينius 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 EIGA

Vertingos informacijos, kaip daryti 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 % soties ore koncentracijos. Dinaminiams bandymams yra rekomenduota (2) ne didesnė kaip 0,5 g/l per 24 h ir bet kuriuo momentu ne didesnė kaip 5 g/l tirpalo.

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 patogų turėti papildomą bandymų indą.

▼ B**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 diapazoną turi būti išnagrinėta ūmaus toksiškumo tyrimų kreivė, siejanti LC_{50} ir veikimo trukmė. Tam tikromis aplinkybėmis gali pasiteisinti mažiau kaip penkių koncentracijos verčių naudojimas, pvz., darant ribinės koncentracijos vertės nustatymo bandymus, ar siauresnio koncentracijos verčių diapazono 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 daromi bandymai su koncentracijos vertėmis, didesnėmis kaip medžiagos tirpumo ribinė koncentracija.

Jei pradinio tirpalo ruošimui lengvinti naudojama soliubilizavimo medžiaga, jos galutinė koncentracija turi būti ne didesnė kaip 0,1 ml/l ir geriau, kai ji visuose bandymo induose būtų vienoda (žr. 1.6.6 skirsnį).

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 soliubilizavimo medžiaga (su lygiagrečiais bandiniais, kai reikia).

1.7.4. Kiekybinių analizių ir matavimų dažnis

Darant bandymą bandomosios medžiagos koncentracijų vertės nustatomos reguliariais tarpais.

Jei manoma, kad darant pusiau statinius bandymus bandomosios medžiagos koncentracija lieka vardinės koncentracijos $\pm 20\%$ vertės (t. y. 80–120 % diapazono; 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. reikia analizuoti tą patį tirpalą imant šviežio tirpalo bandinius ir prieš pat jo atnaujinimą).

Jei tai bandymai, kuriuos darant nesitikima, kad koncentracija lieka lygi vardinei vertei $\pm 20\%$ (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 patenkinamai palaikoma vardinės koncentracijos $\pm 20\%$ vertės ar išmatuotos pradinės koncentracijos vertės, rezultatai gali būti grindžiami vardine ar išmatuota vertėmis.

Darant dinامينius 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.

▼ **B**

Bandinius gali tekti filtruoti (pvz., per 0,45 µm aktytumo filtrą) 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.

Darant bandymą visuose bandymų 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). Darant pusiau statinius bandymus ištirpusio deguonies koncentraciją rekomenduojama matuoti dažniau, geriau prieš kiekvieną vandens atnaujinimą ir po jo ar bent kartą per savaitę. Darant pusiau statinius bandymus pH vertė turi būti matuojama prieš kiekvieną vandens atnaujinimą ir po jo, darant dinامينius 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 poveikio 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.

▼ **B**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 net 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 toksiško 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 daromas teisingai, ilgio variacijos koeficientas lygiagrečiams kontroliniams bandiniams turi būti $\leq 20\%$.

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 daromas teisingai, masės variacijos koeficientas lygiagrečiams kontroliniams bandiniams turi būti $\leq 20\%$.

Darant stebėjimus bus gauta dalis nurodytų duomenų ar visi duomenys, kuriems daroma 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 išgyvenusius gyvūnų ilgis (ir masė),
- deformuotų ar nenormalios išvaizdos lervų skaičius,
- nenormalaus elgesio lervų skaičius.

▼ B**2. DUOMENYS IR ATASKAITA****2.1 REZULTATŲ APDOROJIMAS**

Rekomenduojama, kad rengiant bandymo planą ir bandymą analizuojant dalyvautų statistikas, nes šis bandymų metodas leidžia smarkiai keisti eksperimento planą pvz., bandymo kamerų skaičių, bandomųjų koncentracijų skaičių, pradinį apvaisintų ikrų skaičių, matuojamų parametrų skaičių. Atsižvelgiant į bandymo plano 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 pasiklovimo rėžių apie LC ar EC_X apskaičiavimą. Jei nėra svarbių priežasčių pirmenybę teikti kitiems pasiklovimo lygmenims, turi būti nurodomas dvipusis 95 % pasiklovimo intervalas. Pageidautina, kad pritaikymo metodika turėtų priemonių įvertinti atitikimo stokos reikšmę. 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 toksiškų 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 būseną ir atitinkamos fizikocheminės savybės;

— cheminio identifikavimo duomenys, įskaitant grynumą, ir, jei tinka, analizės metodas bandomajai medžiagai kiekybiškai nustatyti.

▼B**2.3.2 Bandymų 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 planas (pvz., bandymų indų skaičius ir lygiagrečių bandinių skaičius, embrionų skaičius vienam lygiagrečiam bandiniui),
- pradinių tirpalų ruošimo metodas ir jų atnaujinimo dažnis (jei naudojama soliubilizavimo medžiaga, turi būti nurodyta jos koncentracija),
- vardinės bandomosios koncentracijos, išmatuotos bandymų indų tirpalų koncentracijos vertės, jų vidutinės vertės, standartiniai nuokrypiai ir nustatymo metodas; jei bandomosios medžiagos tirpumas yra mažesnis kaip išmatuotos koncentracijos, įrodymai, kad buvo matuojama ištirpintos bandomosios medžiagos tirpalų koncentracija,
- 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,
- bandymų 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 bandymų rūšies išgyvenamumo priimtino standartą (2 ir 3 priedėliai),
- embriono ir lervos stadijos žuvų gaištamumo/išgyvenamumo ir bendrogaištamumo/išgyvenamumo duomenys,
- ikrų inkubavimo parų skaičius ir išsiritusių lervų skaičius,
- ilgio (ir masės) duomenys,
- morfologinių anomalijų, jei yra, dažnis ir aprašymas,
- poveikių elgesiui, jei yra, dažnumas ir aprašymas,
- duomenų statistinė analizė ir apdorojimas,
- jei bandymų duomenims buvo taikoma dispersinė analizė, kiekvieno įvertinto atsako mažiausia stebimo poveikio koncentracija (LOEC), kai $p = 0,05$, ir nestebimo poveikio koncentracija (NOEC), įskaitant taikytų statistinių metodikų aprašymą ir nuorodą, kokio dydžio poveikis gali būti aptiktas,

▼B

— jei bandymo duomenims buvo taikomas regresinės analizės metodas, LC ir ECX, jų pasiklovimo 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.

▼ **B**

- 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 1/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 comparative 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 D.O., Poccocic T.L., Reichenbach N.G., Dean J.H. and Marcus M.D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. *Environ. Tox. Chem.* 10, 1189-1203.
- 23) Calow P. (1993). *Handbook of Ecotoxicology*, Blackwells, Oxford. Vol. 1, chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.
- 24) Balon E.K. (1985). *Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives*, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.
- 25) Blaxter J.H.S. (1988). Pattern and variety in development, In: W.S. Hoar and D.J. Randall Eds., *Fish Physiology*, vol. XIA, Academic press, pp 1-58.

IA lentelė

BANDYMUĮ REKOMENDUOJAMOS ŽUVŲ RŪŠYS

GĖLAVANDENĖS

Oncorhynchus mykiss

Vaivorykštinis upėtakis (9)(16)

Danio rerio

Dryžuotasis danio (7)(17)(18)

Cyprinus caprio

Paprastasis karpis (8)(19)

Oryzias latipes

Japanese ricefish/Medaka (20)(21)

Pimephales promelas

Rainė (8)(22)

▼B

I B lentelė

Kitų dokumentais tinkamai patvirtintų naudotų rūšių pavyzdžiai

GĖLAVANDENĖS	SŪRIAVANDENĖS (JŪRŲ)
<i>Carassius auratus</i> Sidabrinis karosas (8)	<i>Menidia peninsulae</i> Tidewater silverside (23)(24)(25)
<i>Lepomis macrochirus</i> Bluegill (8)	<i>Clupea har engus</i> Silkė (24)(25)
	<i>Gadus morhua</i> Menkė (24)(25)
	<i>Cyprinodon variegatus</i> Sheepshead minnow (23)(24)(25)



1 Priedėlis

TOKSIŠKUMO DANIO (*BRACHYDANIO RERIO*) EMBRIONUI IR MAILIUI SU TRYNIO MAIŠELIU BANDYMO REKOMENDACIJOS

IVADAS

Danio 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 žinyuose 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 tai, kaip bus ruošiama bandymui skirtų ikrų partija. Žuvų tankis šiuo laikotarpiu turi būti ne didesnis kaip 1 gramas žuvų litrai 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 dviem keturioms 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 tai, kaip bus ruošiama bandymui skirtų ikrų partija.

▼B

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 pasiekama vienu laipsniu didesnė negu aklimatizacijos temperatūra. Šviesa išjunginama ir stengiamasi kiek įmanoma netrikdyti rezervuare esančių žuvų. Ryte nerštui pradėti įjunginama silpna šviesa. Po 2-4 valandų žuvis išimamos ir surenkami ikrai. Jei ikrai 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 kaip vanduo 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 išsigeria 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 išsiritą 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 žuvis 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.

Ankstyvosios gyvenimo stadijos taikomos bandymo sąlygos išvardytos 2 priedėlyje. Optimalios praskiedimo vandens pH ir kietumo vertės yra atitinkamai lygios 7,8 ir 250 mg CaCO₃/l.

APSKAIČIAVIMAI IR STATISTIKA

Siūlomas dviejų stadijų metodas. Iš pradžių statistiškai analizuojami gaishtamumas, nenormalaus vystymosi ir išsiritimo trukmės duomenys. Vėliau toms koncentracijoms, kurioms esant neigiamo poveikio šioms parametrų nebuvo aptikta, statistiškai įvertinamas kūno ilgis. Siūloma taikyti šį metodą, nes nuo toksiškos medžiagos gali selektyviai žūti kai kurios mažesnės žuvis, 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 validumas.

▼BLC₅₀ IR EC₅₀ 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 = pataisyta

P' = bandomajai koncentracijai stebėta išgyvenamumo vertė %

C = kontroliniams bandiniams stebėta išgyvenamumo vertė

Jei įmanoma, bandymo pabaigoje tinkamu metodu nustatoma LC₅₀.

Jei vertinant EC₅₀ 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.

REKOMENDUOJAMŲ RŪŠIŲ BANDYMŲ SĄLYGOS, TRUKMĖ IR IŠGYVENAMUMO KRITERIJAI

Rūšis	Temp eratūr a (°C)	Sūrumas (0/00)	Apšviet imo trukmė (valandos)	Stadijų trukmė (paros)		Tipiška bandymo trukmė	Isgyvenamumas kontroliniuose bandiniuose (ne mažesnis kaip %)	
				Embrion as	Mailius su trynio maišeliu		Išsiritimo sėkmė	Po išsiritimo
GĖLAVANDENĖS								
<i>Brachydanio rerio</i> Dryžuotasis danio	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
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Vaivorykštinis upėtakis	10 ± 1 ⁽¹⁾ 12 ± 1 ⁽²⁾	—	0 ^(a)	30 – 35	25 – 30	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 20 parų po išsiritimo (50-55 paros)	66	70
<i>Cyprinus carpio</i> 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
<i>Oryzias latipes</i> Japanese ricefish/Medaka	24 ± 1 ⁽¹⁾ 23 ± 1 ⁽²⁾	—	12 – 16	8 – 11	4 – 8	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 5 parų po išsiritimo (13-16 parų)	80	80
<i>Pimephales promelas</i> Raine	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
^(a) Embrionas ir lerva vieną savaitę po išsiritimo laikomi tamsoje, išskyrus kai jie yra tikrinami. Toliau susilpnintas apšvietimas visą bandymo laiką.

3 Priedėlis

Kitų dokumentais tinkamai patvirtintų rūšių bandymų sąlygos, trukmė ir išgyvenamumo kriterijai

Rūšis	Tem perat ūra (°C)	Sūrumas (0/00)	Apšvietimo trukmė (valandos)	Stadijų trukmė (paros)		Tipiška embriono ir mailiaus su trynio maišelių bandymo trukmė	Kontrolinių bandinių išgyvena- mumas (ne mažesnis kaip %)	
				Embrio nas	Mailiaus su trynio maišeliu bandym as		Išsiritimo sėkmė	Po išsiritimo
GĖLAVANDEN ES								
<i>Carassius auratus</i> Sidabrinis karosas	24 ± 1	—	—	3 – 4	> 4	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 4 parų po išsiritimo (7 paros)	—	80
<i>Leopomis macrochirus</i> Blugill sunfish	21 ± 1	—	16	3	> 4	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 4 parų po išsiritimo (7 paros)	—	75
JŪROS								
<i>Menidia peninsulae</i> Tidewater silverside	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
<i>Clupea harengus</i> 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
<i>Gadus morhua</i> Menke	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
<i>Cyprinodon variegatus</i> Sheepshead minnow	25 ± 1	15 – 30	12	—	—	Kiek įmanoma greičiau po apvaisinimo (ankstyvoji gastrulės stadija) iki 4/7 parų po išsiritimo (28 paros)	> 75	80

*4 PRIEDAS***KAI KURIOS TINKAMO SKIEDIMO VANDENS CHEMINĖS
CHARAKTERISTIKOS**

Medžiaga	Koncentracija
Kietosios daleles	< 20 mg/l
Bendra 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 dife- nilų kiekis	< 50 ng/l
Bendras organinis chloras	< 25 ng/l

▼B**C.16. NAMINĖS BITĖS. ŪMAUS ORALINIO TOKSIŠKUMO BANDYMAS****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 oralinį toksiškumą suaugusioms naminėms bitėms darbininkėms.

Vertinant ir nustatant cheminių medžiagų toksiškumo charakteristikas, gali būti reikalinga nustatyti ūmų oralinį toksiškumą naminėms bitėms, pvz., kai galimas naminių bičių veikimas chemine medžiaga. Ūmaus oralinio toksiškumo bandymas daromas 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 aktyviosios medžiagos (a. m.) ar kaip preparatai.

Turi būti vartojamas toksiškumo etalonas bičių jautrumui ir bandymo metodo preciziškumui tikrinti.

1.2. APIBRĖŽIMAI

Ūmus oralinis toksiškumas – neigiami poveikiai, kurie 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 LD₅₀ (medianinė letali dozė) – yra statistškai apskaičiuota vienkartinė medžiagos dozė, kurią duodant per burną gali žūti 50 % gyvūnų. LD₅₀ vertė yra išreiškiama (µg) bandomosios medžiagos vienai bitei. Jei tai pesticidai, bandomoji medžiaga gali būti aktyvioji medžiaga (a. m.) ar preparatas, kuriame yra viena ar daugiau kaip viena aktyvioji medžiaga.

Gaištamumas – gyvūnas registruojamas kaip žuvęs, kai jis visiškai nejuda.

1.3. BANDYMO METODO ESMĖ

Taikant tam tikrą dozių diapazoną, suaugusios naminės bitės darbininkės (*Apis mellifera*) yra veikiamos sacharozės tirpale ištirpinta bandomąja medžiaga. Toliau bitės maitinamos tuo pačiu maistu be bandomosios medžiagos. Gaištamumas registruojamas kasdien bent 48 h ir lyginamas su gaištamumo kontroliniuose bandiniuose vertėmis. Jei gaištamumas didėja 24-48 h laikotarpiu, o gaištamumas kontroliniuose bandiniuose lieka priimto lygio, t. y. < 10 %, bandymą reikia tęsti ne ilgiau kaip iki 96 h. Rezultatai analizuojami LD50 po 24 h ir 48 h, o jei bandymas tęsiamas, po 72 h ir 96 h apskaičiuoti.

▼B

1.4. BANDYMO VALIDUMAS

Bandymas yra validus, jei galioja šios sąlygos:

— baigiant bandymą vidutinis gaištamumas visuose kontroliniuose bandiniuose turi būti ne didesnis kaip 10 %;

— toksiškumo etalono LD₅₀ atitinka apibrėžtą diapazoną.

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 motinėlių kolonijų, kurių istorija ir fiziologinė būseną 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 daromi 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 bandymų 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 bandymų patalpoje.

▼ B

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 pradėdant 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 apie 1 % ir didesnės naudoti nereikėtų.

Turi būti paruošti atitinkami kontroliniai tirpalai, t. y., jei bandomajai medžiagai soliubilizuoti 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 EIGA

1.6.1. Bandymų ir kontrolinės grupės

Dozių ir lygiagrečių bandinių skaičius turi atitikti statistinius LD_{50} nustatymo reikalavimus esant 95 % pasiklivimo rėžiams. Paprastai bandymui reikia penkių LD_{50} diapazono 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 (gaištamumas kaip dozės funkcija) krypties koeficientą ir atsižvelgiant į rezultatus analizuoti pasirinktą statistinį metodą. Dozavimui tinkamas koncentracijas galima pasirinkti pagal diapazono nustatymo bandymo rezultatus.

Kiekvienos bandymo koncentracijos dozė 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 diapazonas yra 0,10-0,35 µg aktyviosios medžiagos vienai bitei (2). Tačiau būtų priimtini ir kiti toksiškumo etalonai, jei būtų pateikta pakankamai duomenų laukiamam atsakui į dozės poveikį patikrinti (pvz., parationas).

▼B**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 gaištamumas po pirmųjų 24 h vis dar didėja daugiau kaip 10 %, bandymo trukmė turi būti prailginta ne daugiau kaip iki 96 h, jei gaištamumas kontroliniuose bandiniuose yra ne didesnis kaip 10 %.

1.6.4. Stebėjimai

Gaištamumas 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 gaištamumas 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 daryti ribinį bandymą naudojant 100 µg aktyviosios medžiagos vienai bitei, taip norint parodyti, kad LD₅₀ 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 gaišimo atvejų, turi būti daromas visas tyrimas. Jei pastebimi subletalūs poveikiai (žr. 1.6.4 skirsnį), jie turi būti užregistruoti.

▼B**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, gaištamumą kiekvienu stebėjimo momentu ir neįprastai besielgiančių bičių skaičių. Gaištamumo 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 medianines letalias dozes (LD_{50}) su 95 % pasikliovimo rėžiais. Galima padaryti pataisas dėl gaištamumo kontroliniuose bandiniuose naudojant Abboto 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 būseną ir atitinkamos fizikocheminės savybės (pvz., stabilumas vandenyje, garų slėgis),
- cheminio identifikavimo duomenys, įskaitant struktūrinę formulę, grynumą (t. y., pesticidams – identiškumas ir aktyviosios (-ųjų) medžiagos (-ų) koncentracija).

2.2.2. Bandymų 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 planas, 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.

▼B**2.2.4. Rezultatai:**

- parengtinio diapazono nustatymo tyrimo, jei darytas, rezultatai;
- neapdoroti duomenys: gaištamumas po kiekvienos bandytos dozės ir kiekvienu stebėjimo momentu;
- dozės ir atsako kreivių brėžinys baigiant bandymą;
- bandomosios medžiagos ir toksiškumo etalono LD₅₀ vertės su 95 % pasiklivimo ribomis, nustatytos kiekvienu rekomenduotu stebėjimo momentu;
- LD₅₀ nustatymui taikyti statistiniai metodai;
- gaištamumas kontroliniuose bandiniuose;
- kiti stebėti ar išmatuoti biologiniai poveikiai, 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 reikalinga 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. Ther., 96, 99-113.
- 4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- 5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, 265-267.

▼B**C.17. NAMINĖS BITĖS – ŪMAUS TOKSIŠKUMO DĖL SĄLYČIO 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 toksiškumą dėl sąlyčio suaugusioms naminėms bitėms darbininkėms.

Vertinant ir nustatant cheminių medžiagų toksiškumo charakteristikas, gali būti reikalinga nustatyti ūmų toksiškumą dėl sąlyčio naminėms bitėms, pvz., kai yra galimas naminių bičių veikimas chemine medžiaga. Ūmaus oralinio toksiškumo bandymas daromas 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 aktyviosios medžiagos (a. m.) ar kaip preparatai.

Turi būti vartojamas toksiškumo etalonas bičių jautrumui ir bandymo metodo preciziškumui tikrinti

1.2. APIBRĖŽIMAI

Ūmus toksiškumas dėl sąlyčio – neigiami poveikiai, kurie 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 (ug) vienam bandymų gyvūnui (μg/bitei).

Sąlyčio LD₅₀ (medianinė letali dozė) – yra statistiškai apskaičiuota vienkartinė medžiagos dozė, kurią naudojant gali žūti 50 % gyvūnų. LD₅₀ vertė yra išreiškiama (ug) bandomosios medžiagos vienai bitei. Jei tai pesticidai, bandomoji medžiaga gali būti aktyvioji medžiaga (a. m.) ar preparatas, kuriame yra viena ar daugiau kaip viena aktyvioji medžiaga.

Gaištamumas – gyvūnas registruojamas kaip žuvęs, kai jis visiškai nejuda.

1.3. BANDYMO METODO ESMĖ

Taikant tam tikrą dozių diapazoną, suaugusios naminės bitės darbininkės (*Apis mellifera*) yra veikiamos tinkamame nešiklyje ištirpinta bandomąja medžiaga ją tiesiogiai užlašinant ant torakso (lašeliais). Bandymo trukmė yra 48 h. Jei gaištamumas per 24-48 h didėja, o gaištamumas kontroliniuose bandiniuose lieka priimto lygio, t. y. < 10 %, bandymą reikia tęsti ne ilgiau kaip iki 96 h. Gaištamumas registruojamas kasdien ir lyginamas su gaištamumo kontroliniuose bandiniuose vertėmis. Rezultatai yra analizuojami LD₅₀ po 24 h ir 48 h, o jei bandymas yra tęsiamas, po 72 h ir 96 h apskaičiuoti.

▼B**1.4. BANDYMO VALIDUMAS**

Bandymas yra validus, jei galioja šios sąlygos:

- baigiant bandymą vidutinis gaištamumas visuose kontroliniuose bandiniuose turi būti ne didesnis kaip 10 %;
- toksiškumo etalono LD₅₀ atitinka apibrėžtą diapazoną.

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 motinėlių kolonijų, kurių istorija ir fiziologinė būseną 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 daromi 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 bandymų 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), 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 pradėdant bandymą gaištančios 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 bitėms mažai toksiškus tirpiklius (pvz., dime-tilformamidą, dimetilsulfoksida). Jei tai vandenyje disperguoti cheminiai preparatai ir organiniuose tirpikliuose netirpios labai polinės organinės medžiagos, būtų lengviau užlašinti nedidelės koncentracijos prekybiniame drėkiklyje (pvz., *Agral*, *Cittowett*, *Lubrol*, *Triton*, *Tween*) paruoštus tirpalus.

▼ B

Turi būti paruošti atitinkami kontroliniai tirpalai, t. y., jei bandomajai medžiagai soliubilizuoti 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 EIGA

1.6.1. Bandymų ir kontrolinės grupės

Dozių ir lygiagrečių bandinių skaičius turi atitikti statistinius LD_{50} nustatymo reikalavimus esant 95 % pasiklivimo režiams. Paprastai bandymui reikia penkių LD_{50} diapazono 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 (gaištamumas kaip dozės funkcija) krypties koeficientą ir atsižvelgiant į rezultatus analizuoti pasirinktą statistinį metodą. Dozavimui tinkamas koncentracijas galima pasirinkti pagal diapazono 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 sąlyčio LD_{50} 24 h vertės diapazonas yra 0,10-0,30 µg aktyviosios 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 torakso 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 gaištamumas 24-48 h laikotarpiu didėja daugiau kaip 10 %, bandymo trukmė turi būti prailginta ne daugiau kaip iki 96 h, jei gaištamumas kontroliniuose bandiniuose yra ne didesnis kaip 10 %.

▼B**1.6.4. Stebėjimai**

Gaištamumas 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 mirtingumgaištamumas 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 daryti ribinį bandymą naudojant 100 µg aktyviosios medžiagos vienai bitei, taip norint parodyti, kad LD₅₀ 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 gaištamumo atvejų, turi būti daromas visas tyrimas. Jei pastebimi subletalūs poveikiai (žr. 1.6.4 skirsnį), jie turi būti užregistruoti.

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, gaištamumą kiekvienu stebėjimo momentu ir neįprastai besielgiančių bičių skaičių. Gaištamumo 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 medianines letalias dozes (LD₅₀) su 95 % pasiklovimo rėžiais. Galima padaryti pataisas dėl gaištamumo kontroliniuose bandiniuose naudojant Abbotto pataisą (4) (5). LD₅₀ turi būti išreikšta ug bandomosios medžiagos vienai bitei.

2.2 BANDYMO ATASKAITA

Bandymo ataskaitoje turi būti tokia informacija:

2.2.1 Bandomoji medžiaga:

- fizikinė būseną ir atitinkamos fizikocheminės savybės (pvz., stabilumas vandenyje, garų slėgis);
- cheminio identifikavimo duomenys, įskaitant struktūrinę formulę, grynumą (t. y., pesticidams – identiškumas ir aktyviosios (-ųjų) medžiagos (-ų) koncentracija).

2.2.2 Bandymų 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.

▼B**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 planas, 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 diapazono nustatymo tyrimo, jei darytas, rezultatai;
- neapdoroti duomenys: gaištamumas po kiekvienos bandytos dozės ir kiekvienu stebėjimo momentu;
- dozės ir atsako kreivių brėžinys bandymo pabaigoje;
- bandomosios medžiagos ir toksiškumo etalono LD₅₀ vertės su 95 % pasiklovimo ribomis, nustatytos kiekvienu rekomenduotu stebėjimo momentu;
- LD₅₀ nustatymui taikyti statistiniai metodai;
- gaištamumas kontroliniuose bandiniuose;
- kiti pastebėti ar išmatuoti biologiniai poveikiai ir bet koks bičių neįprastas elgesys;
- visi nukrypimai nuo čia aprašytų bandymo metodikų ir visa kita reikalinga 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. Ther., 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.

▼B**C.18. ADSORBCIJA/DESORBCIJA TAIKANT ĮKROVOS PUSIAUSVYROS METODĄ****1. METODAS**

Šis metodas yra OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development* – Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacijos) TG (*Test Guidelines* – Bandymų rekomendacijų) 106 dėl dirvožemio adsorbcijos/desorbcijos taikant įkrovos pusiausvyros metodą kopija (2000).

1.1. ĮVADAS

Metodas atsižvelgia 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 paėmimą organizmais (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 natūraliuosius 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).

▼B

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 talpa (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: Padinis tyrimas norint nustatyti:

- dirvožemio/tirpalo santykį;
- adsorbcijos pusiausvyros nusistovėjimo trukmę ir pusiausvyros sąlygomis adsorbuotos medžiagos kiekį;
- medžiagos adsorbciją ant bandymų 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: Freundlichio adsorbcijos izotermių apskaičiavimas norint nustatyti koncentracijos įtaką adsorbcijos dirvožemiui laipsniui.

Desorbcijos tyrimas taikant desorbcijos kinetiką/- Freundlichio desorbcijos izotermes (1 priedėlis).

1.3. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Simbolis	Apibrėžimas	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 dirvožemiui laiku Δt_i , masė	μg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	bandomosios medžiagos, adsorbuotos dirvožemiui per laiką Δt_i , masė	μg
$m_s^{ads}(eq)$	bandomosios medžiagos, adsorbuotos dirvožemiui 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

▼ B

Simbolis	Apibrėžimas	Vienetai
C_{st}	medžiagos pradinio tirpalo masės koncentracija	$\mu\text{g cm}^{-3}$
C_o	sąlytyje su dirvožemiu esančio bandomojo tirpalo pradinė masės koncentracija	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	medžiagos vandeninės fazės masės koncentracija laiku t_i , kai buvo daroma analizė	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_s^{ads}(eq)$	dirvožemiu adsorbuotos medžiagos kiekis adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis	$\mu\text{g}^{-1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{ g}^{-1}$
$C_{aq}^{ads}(eq)$	medžiagos vandeninės fazės masės koncentracija adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis	$\mu\text{g cm}^{-3}$
V_0	sąlytyje su dirvožemiu esančios vandeninės fazės pradinis tūris darant adsorbcijos bandymą	cm^3
v_a^A	alikvotinės tirpalo dalies tūris, kuriame matuojama bandomoji medžiaga	cm^3
K_d	adsorbcijos pasiskirstymo koeficientas	$\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$
K_{oc}	pagal organinę anglį normalizuotas adsorbcijos koeficientas	$\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$
k_{om}	pagal organinę medžiagą normalizuotas pasiskirstymo koeficientas	$\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$
K_F^{ads}	Freundlichio adsorbcijos koeficientas	$\mu\text{g}^{-1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{ g}^{-1}$
$1/n$	Freundlichio 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	$\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$
K_F^{ads}	Freundlichio desorbcijos koeficientas	$\mu\text{g}^{-1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{ g}^{-1}$
$m_{aq}^{ads}(t_i)$	bandomosios medžiagos, desorbuotos nuo dirvožemio laiku t_i masė	μg
$m_m^{ads}(\Delta t_i)$	bandomosios medžiagos, desorbuotos nuo dirvožemio per laiką Δt_i , masė	μg
$m_m^{ads}(eq)$	medžiagos masė, analiziškai nustatyta vandeninėje fazėje desorbcijos pusiausvyros sąlygomis	μg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	bandomosios medžiagos, desorbuotos desorbcijos pusiausvyros sąlygomis, bendroji masė	μg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	medžiagos, kuri liko adsorbuota dirvožemiu praėjus laiko tarpui Δt_i , masė	μg
m_{aq}^A	medžiagos, likusios po adsorbcijos pusiausvyros bandymo dėl nevisiško tūrio pakeitimo, masė	μg
$C_s^{ads}(eq)$	bandomosios medžiagos, kuri liko adsorbuota dirvožemiu desorbcijos pusiausvyros sąlygomis, kiekis	$\mu\text{g g}^{-1}$

▼ B

Simbolis	Apibrėžimas	Vienetai
$C_{aq}^{ads} (eq)$	bandomosios medžiagos vandeninės fazės masės koncentracija desorbcijos pusiausvyros sąlygomis	$\mu g\ cm^{-3}$
V_T	vandeninės fazės, esančios sąlytyje su dirvožemiu darant 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 darant desorbcijos kinetikos bandymą nuosekliuoju metodu, alikvotinės dalies tūris	cm^3
V_r^r	tirpalo, paimto iš mėgintuvėlio (i) bandomosios medžiagos kiekiui nustatyti darant 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}	oktanolio/vandens pasiskirstymo koeficientas	
pKa	disociacijos konstanta	
S_w	tirpumas vandenyje	$g\ l^{-1}$

1.4. BANDYMŲ METODO ESME

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 daroma 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 bandymų 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.

▼B**1.5. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ**

Cheminiai reagentai turi būti analiziškai grynai. Rekomenduojama naudoti bent 95 % grynumo žinomos sudėties žymėtųjų atomų neturinčias bandomąsias medžiagas ar žinomos sudėties radioaktyviai grynas medžiagas su žymėtaisiais atomais. Jei radioaktyviųjų indikatorių pusamžis yra trumpas, turi būti taikomos skilimo pataisos.

Prieš darant 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 skaidomumas (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 nustatyti yra 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 darant bandymą su bandomosiomis medžiagomis, kurių tirpumas vandenyje yra mažas ($S_w < 10^{-4}$ g l⁻¹), taip pat esant dideliame bandomųjų medžiagų kiekiui, nes medžiagos koncentracija vandeninėje fazėje negali būti analiziškai nustatyta gana 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 daryti. Svarbu, kad šie mėgintuvėliai ar indai:
 - būtų pritaikyti centrifugavimo aparatui, norint sumažinti manipuliavimo ir pernešimo paklaidas;
 - būtų pagaminti iš inertinės medžiagos, kurios paviršiuje bandomosios medžiagos adsorbcija būtų kuo mažesnė.

▼B

- b) maišymo įtaisas: vertikalioji purtyklė ar lygiavertė įranga; maišant maišymo įtaisu dirvožemis turi sudaryti suspensija;
- c) centrifuga: geriau didelio apsisukimų dažnio, pvz., centrifugavimo jėga $> 3\,000\text{ g}$, su termostatu, iš vandeninio tirpalo galinti pašalinti daleles, kurių skersmuo didesnis kaip $0,2\text{ }\mu\text{m}$. 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 – $0,2\text{ }\mu\text{m}$, sterilūs, vienkartiniai. Ypatinę 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 $103\text{--}110\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrai palaikyti.

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. poskyrį „Taikymo sritis“), konkrečios medžiagos adsorbcijai/desorbcijai įtakos gali turėti kitos fizikocheminės 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 $0,01\text{ M CaCl}_2$ tirpale (t. y. tirpale, naudojamame adsorbcijos/desorbcijos bandymuose) pH vertę. Taip pat rekomenduojama, kad standartiniais metodais (pvz., ISO „*Handbook of Soil Analysis*“) 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 dirvą adsorbcijos/desorbcijos bandymams, pateikti 1 lentelėje. Parinkti septyni dirvožemio tipai apima vidutinėse geografinėse zonose pasitaikančius dirvožemio tipus. Jei bandomosios medžiagos yra joninės, parinkti dirvožemio tipai turi apimti platų pH verčių diapazoną, kad būtų galima įvertinti jonizuotos ir nejonizuotos medžiagos adsorbciją. Nurodymai, kiek skirtingų dirvožemio tipų naudoti įvairiose bandymo pakopose, pateikti 1.9 poskyryje „Bandymo eiga“.

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.



1 lentelė

Nurodymai, kaip parinkti dirvožemio bandinius adsorbcijos ir desorbcijos bandymams

Dirvožemio tipas	pH diapazonas (0,01 M CaCl ₂)	Organinės anglies kiekis (%)	Molio kiekis (%)	Dirvožemio struktūra (*)
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 ⁽¹⁾	<0,5-1,5 ⁽¹⁾ ⁽²⁾	< 10- 15 ⁽¹⁾	rišlus smėlis
6	>7,0	< 0,5-1,0 ⁽¹⁾ ⁽²⁾	40-65	sunkus priemolis/ molis
7	<4,5	> 10	< 10	smėlis/rišlus smėlis

(*) Pagal FAO {Food and Agricultural Organization – Maisto ir žemės ūkio organizacija) ir JAV sistemą (85).
(¹) Būtų geriau, jei atitinkamų kintamųjų vertės būtų nurodytame diapazone. Tačiau, jei kyla sunkumų rasti tinkamą dirvožemį, priimtinos mažesnės nei nurodytos mažiausios vertės.
(²) Dirvožemis, kuriame organinės anglies yra mažiau kaip 0,3 %, gali sugriauti 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 pradinės dirvožemio savybes ir jų labai nepakeistų.

▼B1.7.3.2. *Laikymas*

Geriau naudoti ką tik iš lauko paimtą dirvožemį. Jei tai neįmanoma, išdžiovinamas 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 talpai (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 išdžiovinoto 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.

Atitinkamas soliubilizavimo agentas gali būti reikalingas tik mažai tirpioms medžiagoms ($S_w < 10^{-4} \text{ g} \times \text{l}^{-1}$), kai bandomąją medžiagą sunku ištirpinti. Šis soliubilizavimo agentas: 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 paviršiaus aktyvioji medžiaga arba dalyvauti solvolizės reakcijoje su bandomąja medžiaga. Duomenų ataskaitoje turi būti nurodytas ir pagrįstas tokio soliubilizavimo agento naudojimas.

Kitas mažai tirpioms medžiagoms taikomas būdas yra pridėti bandomosios medžiagos į bandymo sistemą naudojant pagalbinių tirpiklių: bandomoji medžiaga ištirpinama organiniame tirpiklyje, alikvotinė šio tirpalo dalis pridama 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 pagalbinių tirpiklio koncentracija visuose bandymuose gali būti nevienoda.

▼ B

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 diapazoną, kuris greičiausiai bus taikomas darant bandymą. Bandytojas gali laisvai tobulinti atitinkamą metodą, turintį reikiamą tikslumą, preciziškumą, atkuriamumą, aptikimo ribas ir regeneravimo lygį. Toliau pateikti nurodymai, kaip tokį bandymą daryti.

Atitinkamas 0,01 M CaCl_2 tirpalo tūris, pvz., 100 cm³, 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 diapazone, kuris greičiausiai bus taikomas darant 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), spektrometrų a (pvz., GC/masių spektrometrija, HPLC/masių spektrometrija) ir skysčių scintiliacijos skaičiavimas (medžiagų su žymėtaisiais atomais). Nesvarbu, koks analizės metodas taikomas, patenkinamu 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 eigos ir numato alternatyvius sprendimus, jei galimybes riboja analizės metodas ir laboratorijos įranga.

▼ **B**1.8.2. **Optimalaus dirvožemio/tirpalo santykio parinkimas**

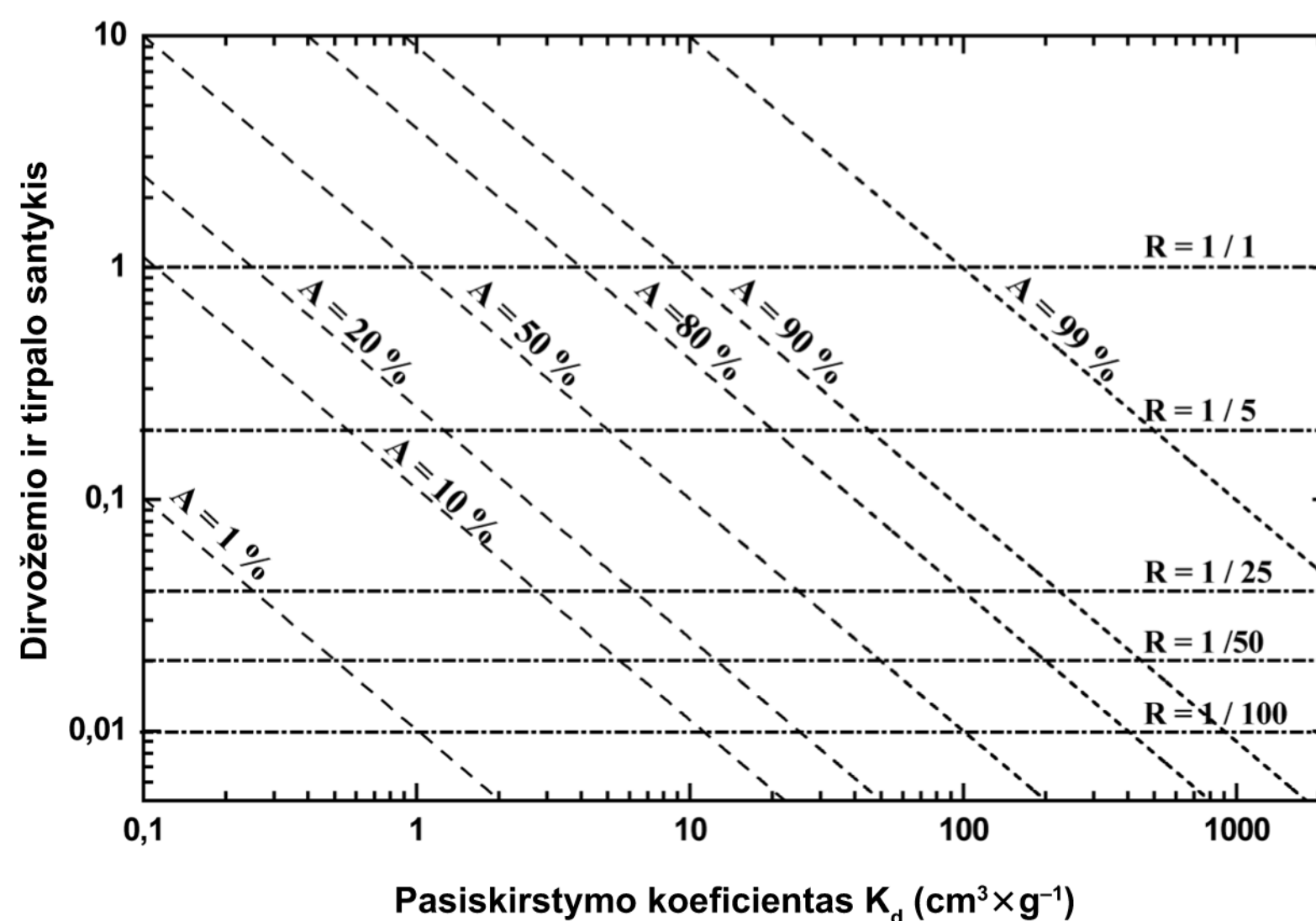
Tinkamo dirvožemio ir tirpalo santykio parinkimas sorbcijos tyrimams priklauso nuo pasiskirstymo koeficiento K_d ir nuo pageidaujamo santykinio adsorbcijos laipsnio. Matavimo, pagrįsto adsorbcijos lygties forma ir analizės metodo riba, statistinį tikslumą nustatant medžiagos tirpalo koncentraciją lemia 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:

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

ar į jos logaritminę išraišką, darant prielaidą, kad $R = m_{\text{soil}}/V_0$ and $A_{\text{eq}} \% / 100 = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0}$:

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



1 pav. Dirvos/tirpalo santykio ir K_d sąryšis esant įvairioms adsorbuotos medžiagos procentinėms dalims

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

▼ B

1 pav. 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 EIGA

1.9.1. **Bandymų sąlygos**

Visi bandymai daromi 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 poskyryje „Taikymo sritis“. Toliau pateikiamos rekomendacijos, kaip daryti tokių 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 cm³ bandomosios medžiagos vandeninio tirpalo (santykis 1/1);

▼B

- 10 g dirvožemio ir 50 cm³ bandomosios medžiagos vandeninio tirpalo (santykis 1/5);
- 2 g dirvožemio ir 50 cm³ bandomosios medžiagos vandeninio tirpalo (santykis 1/25).

Mažiausias dirvožemio kiekis, su kuriuo gali būti daromas 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 CaCl₂ tirpale ir jos galimai adsorbcijai ant bandymų indų paviršių patikrinti vienas kontrolinis bandinys, kurį sudaro 0,01 M CaCl₂ 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 cm³ 0,01 M CaCl₂ tirpalo tūriu (be bandomosios medžiagos) bandomas pagal tą pačią bandymo metodiką. Darant analizę šis bandinys yra fono kontrolės priemonė trukdančioms medžiagoms ar užterštiems dirvožemiams aptikti.

Visi bandymai, įskaitant kontrolinius ir tuščiuosius, turi būti daromi 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 išimtyms nurodomos.

Pusiausvyrai pasiekti ore išdžiovinti dirvožemio bandiniai sumaišomi su ne mažesnio kaip 45 cm³ tūrio 0,01 M CaCl₂ tirpalu ir mišinys purtomas per naktį (12 h) prieš bandymo dieną. Po to galutiniam 50 cm³ tūriui gauti įpilamas tam tikras tūris bandomosios medžiagos pradinio tirpalo. Šis įpilamo pradinio tirpalo tūris: a) neturi sudaryti daugiau kaip 10 % galutinio 50 cm³ 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 (C₀) 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 (C₀), 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 cm³ į 45 cm³ 0,01 M CaCl₂ pusiausvyros nusistovėjimo tirpalo (pradinis tirpalas sudaro 10 % 50 cm³ 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.

▼ **B**

Mišinys purtomas tol, kol pasiekama 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 didesnę kaip 1 % bendrojo tirpalo tūrio, kad darant 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 pav. 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 poskyryje „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 priedėlyje. 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.).

▼ B

Jeigu konkrečiai medžiagai kreivės lygiagrečioji dalis nepasiekama, bet adsorbcija visą laiką didėja, gali būti padėti 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 bandymų indų paviršiaus ir bandomosios medžiagos stabilumas*

Tam tikros informacijos apie bandomosios medžiagos adsorbciją ant bandymų indų paviršiaus, taip pat apie jos stabilumą galima gauti analizuojant kontrolinius bandinius. Jei pastebimas medžiagos išsekvojimas yra didesnis nei analizės metodo standartinė paklaida, gali vykti abiotinis skaidymas ir (ar) adsorbcija ant bandymų 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 išsekvojimas rodo abiotinį bandomosios medžiagos nestabilumą. Jei adsorbcija įrodoma, būtina keisti medžiagas, iš kurių pagaminti bandymų indai. Tačiau šiuo bandymu surinkti duomenys apie adsorbciją ant bandymų 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 daroma vandeninės fazės, dirvožemio ekstraktų ir bandymų indų sienelių analizė ieškant bandomosios medžiagos. Skirtumas tarp pridėtos bandomosios medžiagos masės ir bandomosios medžiagos vandeninėje fazėje, ekstraktuose ir ant bandymų indų sienelių masių sumos yra lygus masei medžiagos, kuri buvo suardyta ir (ar) išgaravo, ir (ar) nebuvo ekstrahuota. Norint nustatyti masių balansą, darant 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 % išsekvojimas. Baigus santykio nustatymo bandymą, kai po 48 h padaroma 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 ją įpilama tinkamo ekstrahavimo tirpiklio (ekstrahavimo faktorius bent 95 %). Rekomenduojama nuosekliai ekstrahuoti bent du kartus. Nustatomas medžiagos kiekis dirvožemio ir bandymų 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.

▼B1.9.2.4. *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 daryti nereikia.

Pusiausvyros nusistovėjimo trukmė, dirvožemio/tirpalo santykis, dirvožemio bandinio masė, sąlytyje su dirvožemiu esančios vandinės fazės tūris ir bandomosios medžiagos tirpalo koncentracija pasirenkami pagal pradinio tyrimo rezultatus. Analizę būtų geriau daryti 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) daromas bent du kartus, kad būtų galima įvertinti rezultatų sklaidą. Darant 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 ir (ar) laiko tarpui $A_{\Delta t}$ (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 sorbcinį elgesį (35) (78) ir yra cheminių medžiagų būdingo judrumo dirvožemyje išraiška. Pvz., paprastai cheminės medžiagos, kurių $K_d \leq 1 \text{ cm}^3 \times \text{g}^{-1}$, 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 $0,3 \text{ cm}^3 \times \text{g}^{-1}$ K_d vertės negali būti tiksliai įvertintos pagal vandinės 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.

▼B

Atsižvelgiant į šias pastabas, rekomenduojama tęsti adsorbcinį cheminės medžiagos dirvoje elgesio ir jos potencialaus judrumo tyrimą nustatant Freundlichio adsorbcijos izotermės 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).

1.9.2.5. 3 tarpsnis. Adsorbcijos izotermės ir desorbcijos kinetika/desorbcijos izotermės

1.9.2.5.1. Adsorbcijos izotermės

Taikomos penkios 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 daromas 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 Freundlichio izotermė. Smulkesnė informacija aiškinant adsorbcijos modelius ir jų svarbą pateikta nuorodose (41) (45) (80) (81) (82).

Pastaba. Reikėtų paminėti, kad skirtingų medžiagų K_F (Freundlichio adsorbcijos koeficiento) vertes galima lyginti, jei šios K_F vertės yra išreikštos tais pačiais vienetais (83).

1.9.2.5.2. 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 varbų 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.

▼B

(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. Darant 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 pasiekama adsorbcijos pusiausvyra (kaip nustatyta pirmiau pagal 2 tarpsnį). Toliau fazės atskiriamos centrifugavimu ir vandeninės fazės yra kuo daugiau pašalinamos. Pašalinti tirpalai pakeičiami tokio 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 pasiekama desorbcijos pusiausvyra.

b) Nuoseklusis metodas: baigus adsorbcijos kinetikos bandymą, mišinys centrifuguojamas ir vandeninė fazė kiek įmanoma daugiau pašalinama. Pašalintas tirpalas pakeičiamas tokio pat tūriu 0,01 M CaCl_2 tirpalo be bandomosios medžiagos. Naujas mišinys purtomas tol, kol pasiekama 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 pradinio 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)) ir (ar) laiko tarpui ($(D_{\Delta t})$) (pagal tyrimo poreikius) ir braižomas kitimo laike grafikas. Taip pat apskaičiuojamas desorbcijos koeficientas K_{des} pusiausvyros sąlygomis. Visos taikomos lygtys pateiktos poskyryje „Duomenys ir ataskaita“ ir 5 priedėlyje.

Desorbcijos kinetikos bandymo rezultatai

Bendri desorbcijos procentinės dalies D_t ir adsorbcijos A_t 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.

1.9.2.5.3. Desorbcijos izotermės

Freundlichio desorbcijos izotermės apskaičiuojamos dirvožemiams, kuriems buvo apskaičiuojamos adsorbcijos izotermės. Desorbcijos bandymas daromas, 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).

▼ B**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.

Darant ši bandymą laikoma, kad 1 cm³ 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:

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

čia:

A_{t_i} = adsorbcijos procentinė dalis laiko momentu t_i (%),

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = 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.

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

čia:

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = dirvožemiu adsorbuotos medžiagos kiekis adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis (μg × g⁻¹),

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = medžiagos vandeninės fazės masės koncentracija adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis (μg × g⁻³). Ši koncentracija nustatoma analizės būdu atsižvelgiant į vertes, gautas tuščiaisiais bandymais;

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = dirvožemiu adsorbuotos medžiagos masė adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = tirpale esančios medžiagos masė adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis (μg);

m_{soil} = dirvožemio fazės kiekis, išreikštas sauso dirvožemio mase (g);

V_0 = sąlytyje su dirvožemiu esančios vandeninės fazės pradinis tūris (cm³).

A_{eq} ir K_d santykis aprašomas lygtimi:

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

▼ **B**

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:

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

čia:

%OC = organinės anglies dirvožemio bandinyje procentinė dalis (g x 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

Freundlichio adsorbcijos izotermių lygtis susieja adsorbuotos bandomosios medžiagos kiekį ir bandomosios medžiagos tirpalo koncentraciją pusiausvyros sąlygomis (8 lygtis).

Duomenys apdorojami, kaip nurodyta „Adsorbcijos“ poskyryje, 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:

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

Freundlichio adsorbcijos lygtis pateikta (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} \text{ (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)} \quad (8)$$

ar tiesės pavidalu:

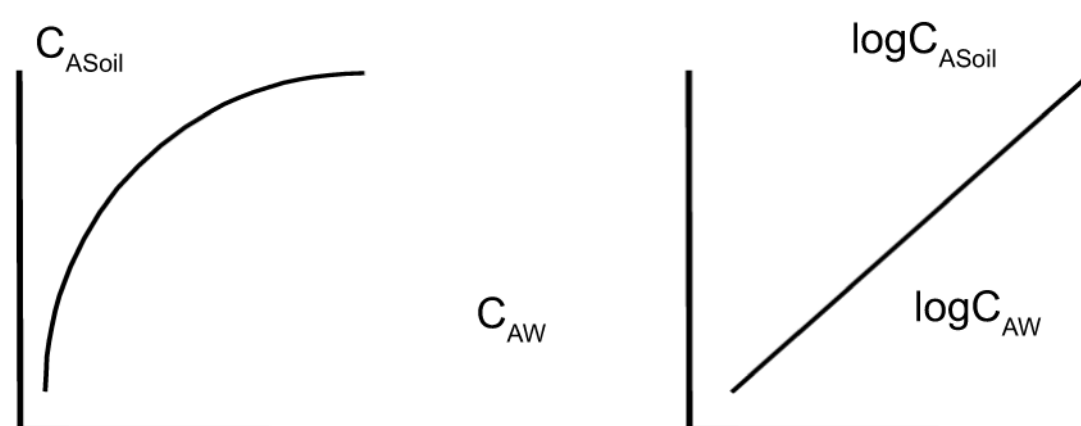
$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

čia:

K_F^{ads} = Freundlichio adsorbcijos koeficientas; jo dimensija yra cm³ × g⁻¹, tik jei 1/n = 1; visais kitais atvejais i $K_F^{ads} \text{ (}\mu\text{g}^{1-1/n} \text{ (cm}^3\text{)}^{1/n} \text{ g}^{-1}\text{)}$;

n = regresijos konstanta; 1/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 1/n. Taip pat apskaičiuojamas logaritminės lygties koreliacijos koeficientas r². Tokių grafikų pavyzdys pateiktas 2 pav.

▼ **B**

2 pav. Freundlichio 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 „Desorbcijos“ poskyryje. 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 bandymų indo sienelių, masių sumą:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} (\%) \quad (10)$$

čia:

MB = masių balansas (%),

m_E = bandomosios medžiagos, dviem pakopomis ekstrahuotos iš dirvožemio ir nuo sienelių, bendroji masė (μg);

C_0 = sąlytyje su dirvožemiu esančio bandomojo tirpalo pradinė masės koncentracija ($\mu g \text{ cm}^{-3}$),

V_{rec} = adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis regeneruoto tirpalo virš nuosėdų tūris (cm^3).

2.2. DESORBCIJA

Desorbeija (D) apibrėžiama kaip desorbuotos bandomosios medžiagos procentinė dalis nuo medžiagos kiekio, prieš tai adsorbuotos bandymo sąlygomis:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (11)$$

čia:

D_{t_i} = desorbcijos procentinė dalis laiko momentu t_i (%),

▼ B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = 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_i lygiagrečiuoju ir nuosekliuoju metodu, išsamiai aprašyta 5 priedėlyje.

Tariamasis desorbcijos koeficientas (K_{des}) bandymo sąlygomis yra dirvožemio fazėje likusios medžiagos kiekio ir desorbuotos medžiagos vandeninio tirpalo masės koncentracijos santykis pasiekus desorbcijos pusiausvyrą:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (12)$$

čia:

K_{des} = desorbcijos koeficientas ($\text{cm}^3 \times \text{g}^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = nuo dirvožemio desorbuotos bandomosios medžiagos bendroji masė desorbcijos pusiausvyros sąlygomis (μg);

V_T = darant desorbcijos kinetikos bandymą sąlytyje su dirvožemiu esančios vandeninės fazės bendrasis tūris (cm^3).

Kaip apskaičiuoti $m_{aq}^{des}(eq)$ nurodyta 5 priedėlio poskyryje „Desorbcija“.

Pastaba.

Jei prieš tai darant adsorbcijos bandymą buvo taikomas lygiagretusis metodas, laikoma, kad tūris V_T 12 lygtyje yra lygus V_0 .

2.2.1. Desorbcijos izotermės

Freundlichio 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:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} \text{ (}\mu g \text{ g}^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ yra apibrėžiama taip:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r} - m_{aq}^A \text{ (}\mu g) \quad (14)$$

čia:

$C_s^{des}(eq)$ = bandomosios medžiagos, kuri liko adsorbuota dirvožemiu desorbcijos pusiausvyros sąlygomis, kiekis ($\mu g \times g^{-1}$);

$m_m^{des}(eq)$ = medžiagos, analiziškai nustatytos vandeninėje terpėje desorbcijos pusiausvyros sąlygomis, masė (μg);

▼ B

m_{aq}^A = bandomosios medžiagos, likusios po adsorbcijos pusiausvyros bandymo dėl nevysiško tūrio pakeitimo, masė (μg);

$m_{aq}^{\text{des}}(\text{eq})$ = medžiagos, esančios tirpale adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis, masė (μg);

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (15)$$

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);

Freundlichio desorbcijos lygtis pateikta (16):

$$C_s^{\text{des}}(\text{eq}) = K_F^{\text{des}} \cdot C_{aq}^{\text{des}}(\text{eq})^{1/n} (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (16)$$

ar tiesės pavidalu:

$$\log C_s^{\text{des}}(\text{eq}) = \log K_F^{\text{des}} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{\text{des}}(\text{eq}) \quad (17)$$

čia:

K_F^{des} = Freundlichio desorbcijos koeficientas;

n = regresijos konstanta;

$C_{aq}^{\text{des}}(\text{eq})$ = medžiagos vandeninėje fazėje masės koncentracija desorbcijos pusiausvyros sąlygomis ($\mu\text{g x cm}^{-3}$).

Gali būti nubrėžti 16 ir 17 lygčių grafikai ir taikant 17 lygtį regresijos analizės metodu apskaičiuojami K_F^{des} ir $1/n$.

Pastaba:

Jei Freundlichio adsorbcijos ar desorbcijos laipsnio rodiklis $1/n$ yra lygus 1, Freundlichio 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. Bandymų ataskaita

Bandymų ataskaitoje turi būti ši informacija:

— išsamus naudotų dirvožemio bandinių identifikavimas, įskaitant:

— geografinį vietos nurodymą (platuma, ilguma),

— bandinio ėmimo datą,

▼B

- kilmę (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 talpą (mmol/kg),
- visą informaciją apie dirvožemio bandinių rinkimą ir laikymą,
- jei tinka, visą informaciją, reikalingą bandomosios medžiagos adsorbcijai/desorbcijai aiškinti,
- metodus, taikomus kiekvienam parametruui nustatyti,
- atitinkama informacija apie bandomąją medžiagą,
- bandymų temperatūra,
- centrifugavimo sąlygos,
- analizės metodika, taikyta bandomajai medžiagai analizuoti,
- priežastys, kurios pagrįstų soliubilizavimo agento 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 Brümmer 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.

▼ **B**

- 6) US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.
- 7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.
- 8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.
- 9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- 10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.
- 11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.
- 12) Calvet R., (1989), „Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils“, in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).
- 13) Calvet R., (1980) „Adsorption-Desorption Phenomena“ in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.
- 14) Hassett 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.

▼ **B**

- 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)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption“. Pestic. Sci. 12, 45-52.
- 24) Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). „Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides“. Proc. Br. Crop Prot. Conf, 3, 961-971.
- 25) Osgerby J.M., (1973), „Process affecting herbicide action in soil“. Pestic. Sci., 4, 247-258.
- 26) Guth J.A., (1972), „Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in 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 Karickhoff 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.

▼ **B**

- 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.

▼B

- 53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.
- 54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.
- 55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality – Sampling – Part 3: Guidance on safety of sampling.
- 56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality – Sampling – Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.
- 57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality – Sampling – Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.
- 58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- 59) Green R.E., and Yamane V.K., (1970) „Precision in pesticide adsorption measurements“. *Soil Sci. Am. Proc.*, 34, 353-354.
- 60) Grover R., and Hance R.J. (1970), „Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine“. *Soil Sci.*, 109-138.
- 61) Boesten, J.J.T.I., „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system“. *Pest. Sci.* 1990, 30, 31-41.
- 62) Boesten, J.J.T.I. „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106“ *Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects*, Brussels, 26-29 April 1994.
- 63) Bastide J., Cantier J.M., et Coste C, (1980), „Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique“. *Weed Res.* 21, 227-231.
- 64) Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), „Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments“. *J. Environ. Qual.*, 10(3), 382-386.
- 65) Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), „Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water“. *Environ. Sci. Technol.*, 17(4), 227-231.
- 66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), „Sorption of organic substances by soils and sediments“. *J. Environm. Sci. Health*, B19 (3), 297-312.
- 67) Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), „Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons“. *Chemosphere*, 16(1), 109-116.
- 68) Lyman W.J. , Reehl W.F. and Rosenblatt D.H. (1990). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds*. American Chemical Society, Washington DC.
- 69) Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). „Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota“ in *Aquatic Toxicology* (eds J.G Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

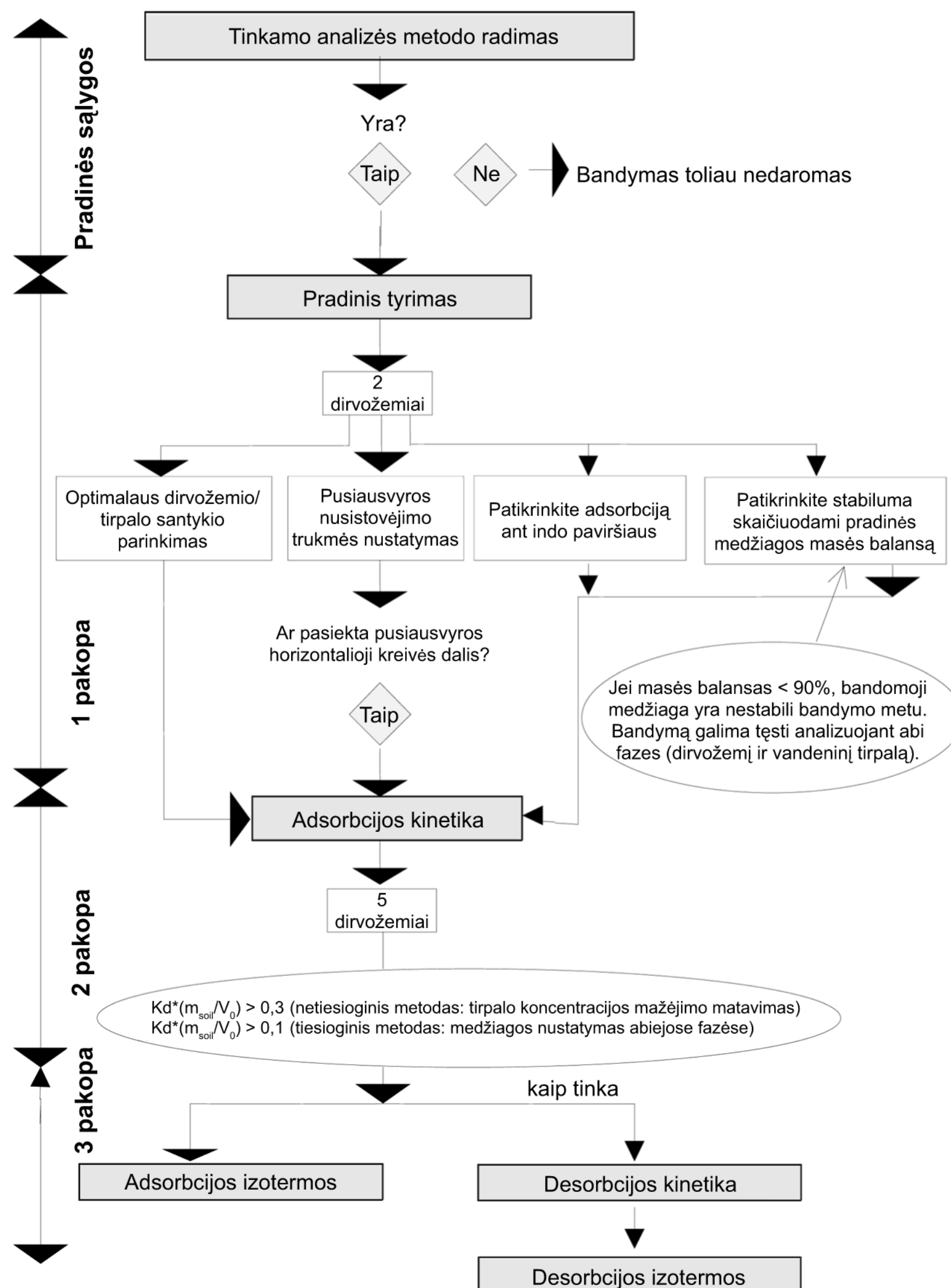
▼B

- 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 – réactivité. *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. Caractéristiques générales de l'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).



I PRIEDĖLIS

Bandymo planas



▼B

2 priedelis

ANALIZĖS METODO IR KONCENTRACIJOS POKYČIO ĮTAKA
ADSORBCIJOS REZULTATŲ TIKSLUMUI

15 toliau pateiklamos lentelės (84) matyti, kad, jei tirpale esančios bandomosios medžiagos pradinis masės ($m_0 = 110 \text{ } \mu\text{g}$) ir pusiausvyros masės ($m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = 100 \text{ } \mu\text{g}$) skirtumas labai mažas, dėl 5 % paklaidos matuojant pusiausvyros koncentracija, susidaro 50 % paklaida apskaičiuojant dirvožemiu adsorbuotos medžiagos masę ($m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$) ir 52,4 % paklaida apskaičiuojant K_d

Dirvožemio kiekis $m_{\text{soil}} = 10 \text{ g}$
Tirpalo tūris $V_0 = 100 \text{ cm}^3$

	$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ (μg)	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	R	$m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})^*$ (μg)	$C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})^*$ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$R_{\ddagger}$	K_d^*	$R_{\ddagger}$
$m_0 = 110 \text{ } \mu\text{g ar}$ $C_0 = 1,100 \text{ } \mu\text{g/cm}^3$	FOR A = 9 %							
	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 %
$m_0 = 110 \text{ } \mu\text{g ar}$ $C_0 = 1,100 \text{ } \mu\text{g/cm}^3$	FOR A = 55 %							
	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 %
$m_0 = 110 \text{ } \mu\text{g ar}$ $C_0 = 1,100 \text{ } \mu\text{g/cm}^3$	FOR A = 99 %							
	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 %

$$*m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}), C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{[C_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})] V_0}{m_{\text{bodem}}} . K_d = \frac{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \times \frac{V_0}{m_{\text{bodem}}}$$

$m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = bandomosios medžiagos dirvožemio fazėje masė pusiausvyros sąlygomis, μg ;

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = bandomosios medžiagos vandeninėje fazėje masė pusiausvyros sąlygomis, μg ;

$C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = bandomosios medžiagos dirvožemio fazėje kiekis pusiausvyros sąlygomis, $\mu\text{g g}^{-1}$;

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = bandomosios medžiagos vandeninės fazės koncentracija pusiausvyros sąlygomis, $\mu\text{g cm}^{-3}$;

R = analizinė paklaida nustatant $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$;

$R_{\ddagger}$ = apskaičiuota paklaida dėl analizinės paklaidos R.



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:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}\text{)} = K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%OC} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}\text{)}$$

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 priešaringi.
3. Kai kurie adsorbcijos koeficiento ir oktanolio-vandens pasiskirstymo koeficiento bei tirpumo vandenyje koreliacijų pavyzdžiai pateikti atitinkamai 1 ir 2 lentelėje.

1 lentelė

Koreliacijos tarp adsorbcijos pasiskirstymo koeficiento ir oktanolio-vandens pasiskirstymo koeficiento pavyzdžiai; kiti pavyzdžiai pateikti (12) (68)

Medžiagos	Koreliacijos lygtys	Autoriai
Pavaduoto karbamido dariniai	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs(1981)(39)
Chlorinti aromatiniai junginiai	$\log K_{oc} = - 0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou <i>et al.</i> (1983) (65)
Įvairūs pesticidai	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	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	$\log K_{om} = (4,040 \pm 0,038) - (0,557 \pm 0,012) \log S_w$	Chiou <i>et al.</i> (1979) (70)
α-naftolis	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hassetetal. (1981) (71)
Ciklinės, alifatinės aromatinės medžiagos	$\log K_{oc} = - 1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953 \text{ (mp-25)}$	Karickhoff (1981) (72)
Įvairūs junginiai	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log$	Moreale van Blade (1982)

▼ **B**

4 Priedėlis

SKAIČIAVIMAI CENTRIFUGAVIMO SĄLYGOMS APIBRĖŽTI

1. Centrifugavimo trukmė nustatoma pagal šią formulę darant prielaidą, kad dalelės yra rutulio formos:

$$t = \frac{9}{2} \left[\frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_s - \rho_{aq})} \right] \ln(R_b/R_t) \quad (1)$$

Siekiant supaprastinti, visi parametrai yra išreikšti ne SI vienetais (g, cm).

Čia:

ω = sukimosi greitis ($=2 \pi \text{ rpm}/60$), $\text{rad} \times \text{s}^{-1}$,

r_p = apsisukimų dažnis, min^{-1} , m

η = tirpalo klampis, $\text{g} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$,

r_p = dalelių spindulys, cm,

ρ_s = dirvožemio tankis, $\text{g} \times \text{cm}^{-3}$,

ρ_{aq} = tirpalo tankis, $\text{g} \times \text{cm}^{-3}$,

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.

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 klampis (η) ir tankis (ρ_{aq}) yra lygūs vandens 25 °C klampiui ir tankiui; taigi, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ and $\rho_{aq} = 1,0 \text{ g} \times \text{cm}^{-3}$.

Tuomet centrifugavimo trukmė išreiškiama 2 lygtimi:

$$t = \frac{3.7}{(\text{rpm})^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

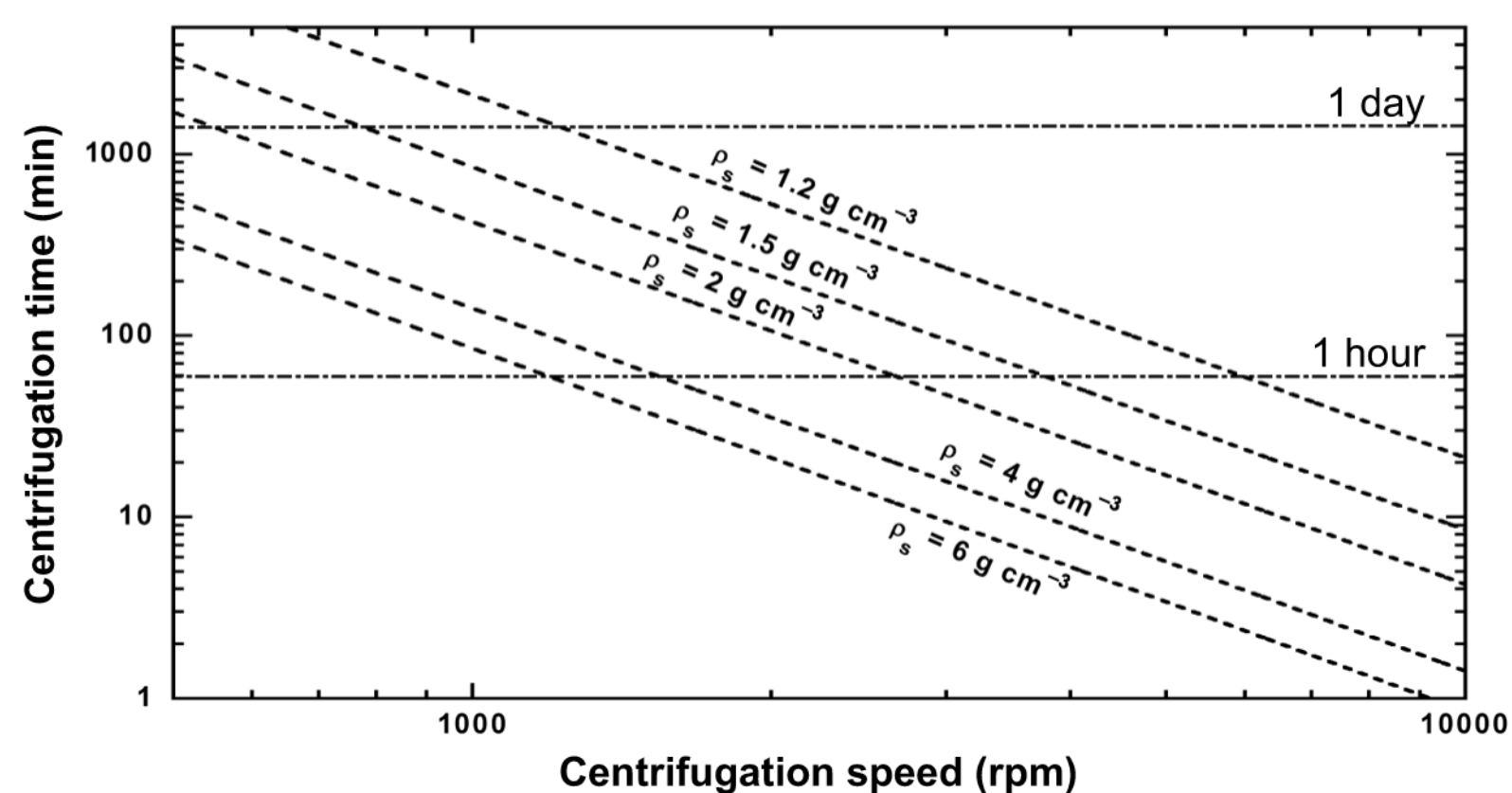
3. Iš 2 lygties aišku, kad norint pasiekti tam tikro dydžio dalelių atsiskyrimą (mūsų atveju 0,1 μm spindulio) centrifugavimo režimui, t. y. laikui (t) ir apsisukimų dažniui (min^{-1}), apibrėžti yra svarbūs du parametrai: 1) dirvožemio tankis ir 2) mišinio stulpelio centrifugavimo mėgintuvėlyje ilgis ($R_b - R_t$), 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 pav. 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 pav. matyti, kad dirvožemio tankio įtaka yra akivaizdi; pvz., tradicinis centrifugavimas 3000 min^{-1} dažniu trunka maždaug 240 min, kai dirvožemio tankis 1,2 $\text{g} \times \text{cm}^{-3}$, tuo tarpu ši trukmė yra tik 50 min, jei tankis 2,0 $\text{g} \times \text{cm}^{-3}$. Panašiai, pagal 1b pav. centrifuguojant tradiciniu 3000 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 darančiam lengvai atskirti fazes po centrifugavimo.

▼ **B**

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 $0,2 \mu\text{m}$, 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.

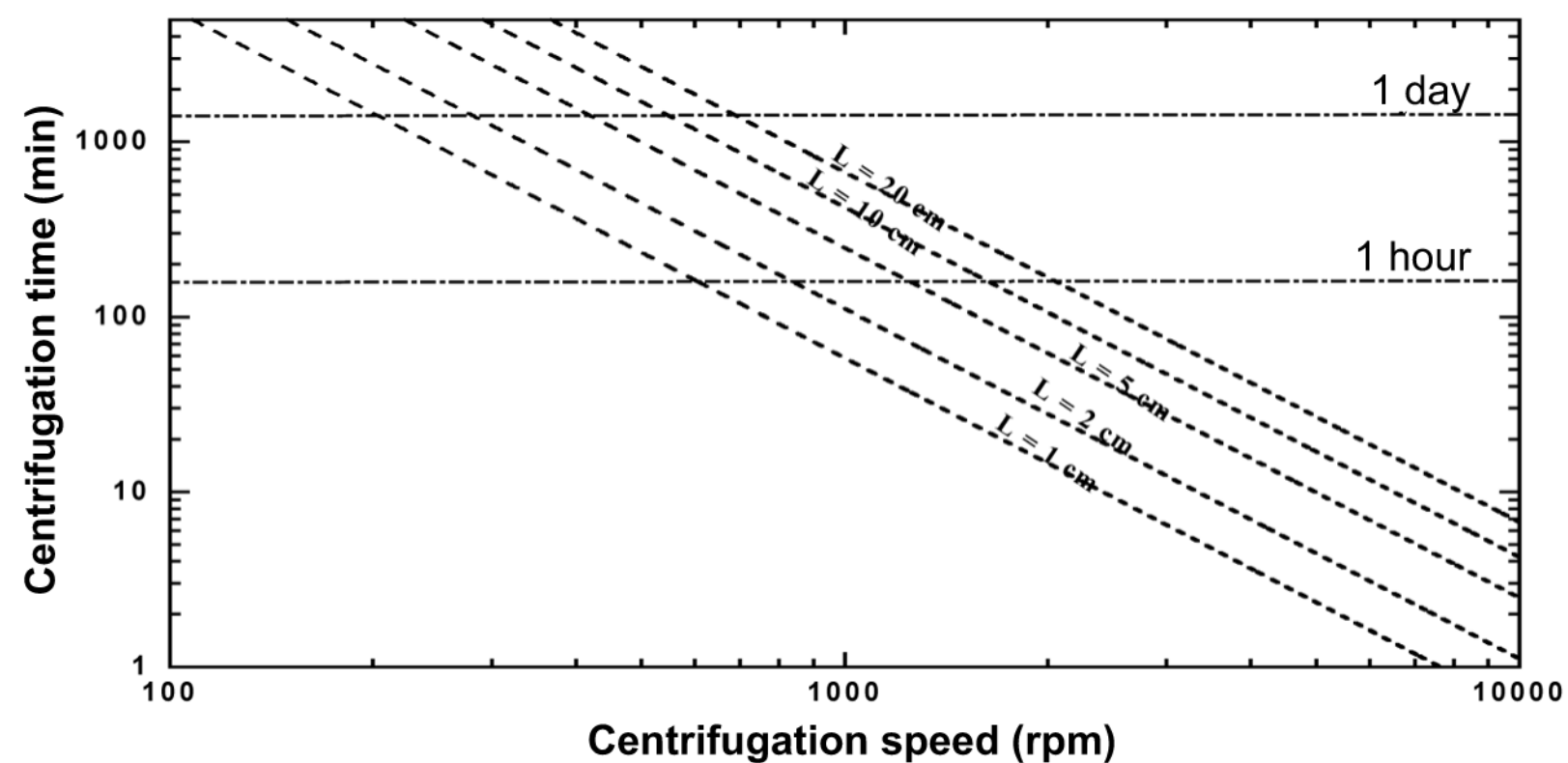
Jei bandymus daranti laboratorija turi ultracentrifugavimo ar ultrafiltravimo priemones, medžiagos adsorbcija/desorbcija dirvožemiu galėtų būti ištirta išsamiau, įskaitant informaciją apie medžiagos adsorbciją koloidinėmis dalelėmis. Šiuo atveju norint atskirti tris fazes: dirvožemį, koloidines daleles ir tirpalą, turi būti taikomas ultracentrifugavimas $60\,000 \text{ min}^{-1}$ 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). $R_t = 10 \text{ cm}$, $R_b - R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ir $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g} \times \text{cm}^{-3}$ 25°C temperatūroje.

1b pav.



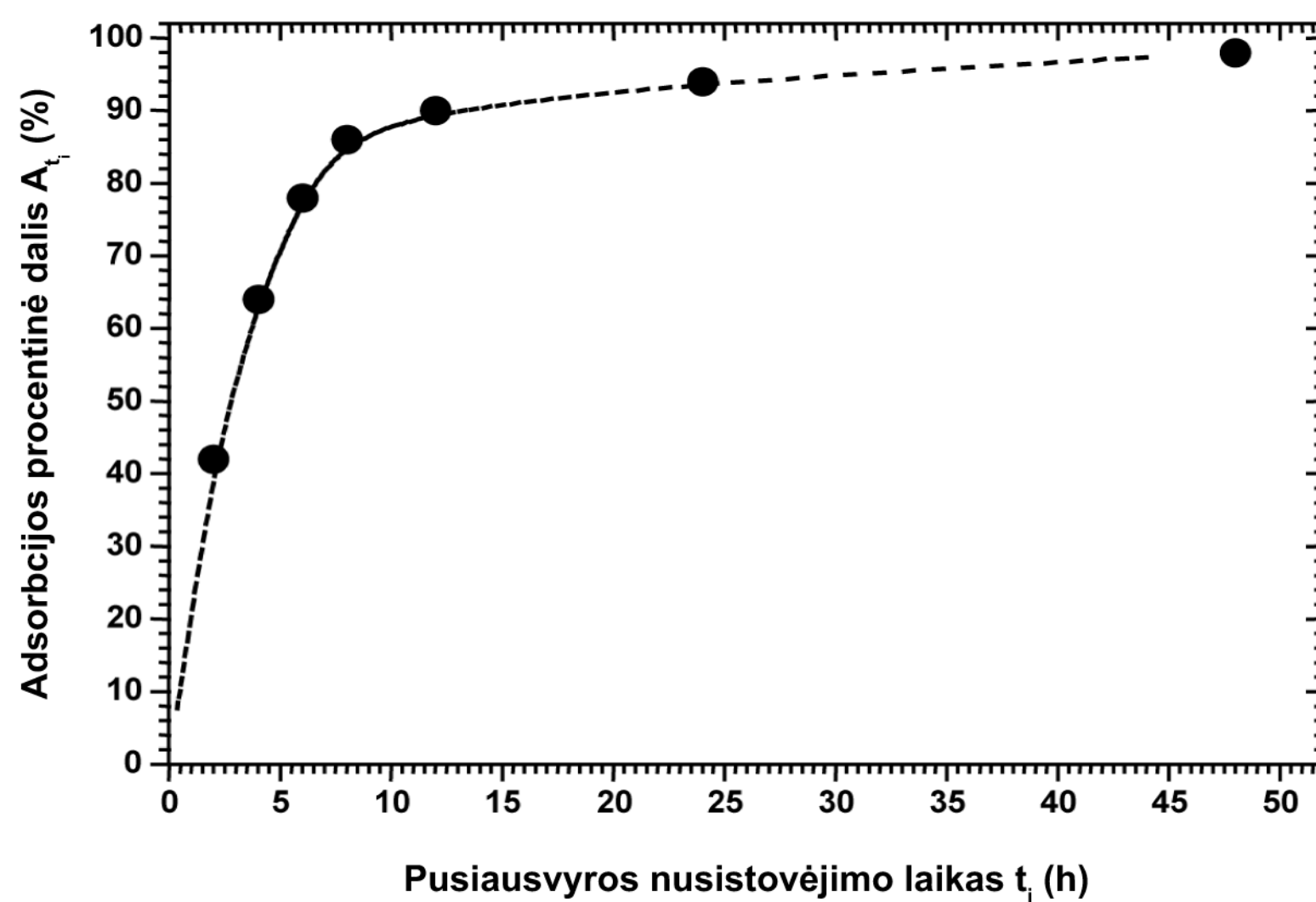
Centrifugavimo trukmės (t) kitimas pagal centrifugos apsisukimų dažnį (min^{-1}) esant skirtingam mišinio stulpelio centrifugavimo mėgintuvėlyje ilgiui ($R_b - R_t = L$; $R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g} \times \text{cm}^{-3}$ 25°C temperatūroje ir $\rho_s = 2,0 \text{ g cm}^{-3}$.

▼ B

5 Priedas

ADSORBCIJOS A (%) IR DESORBCIJOS D (%) APSKAIČIAVIMAS

Metodikai taikyta laiko schema yra tokia:



Darant visus skaičiavimus daroma prielaida, kad bandomoji medžiaga yra stabili, ir jos žymiai neadsorbuoja indo sienelės.

ADSORBCIJA A (A %)

a) *Lygiagretusis metodas*

Kiekvienam mėgintuvėliui (i) kiekvienu laiko momentu (t_i) adsorbcijos procentinė dalis apskaičiuojama pagal lygtį:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (1)$$

Šios lygties nariai gali būti apskaičiuoti taip:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m_s^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (3)$$

kai:

A_{t_i} = adsorbcijos procentinė dalis (%) laiko momentu t_i ;

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = dirvožemiu adsorbuotos bandomosios medžiagos masė laiko momentu t_i , kai buvo daroma analizė (μg);

m_0 = bandymo pradžioje mėgintuvėlyje buvusios bandomosios medžiagos masė (μg);

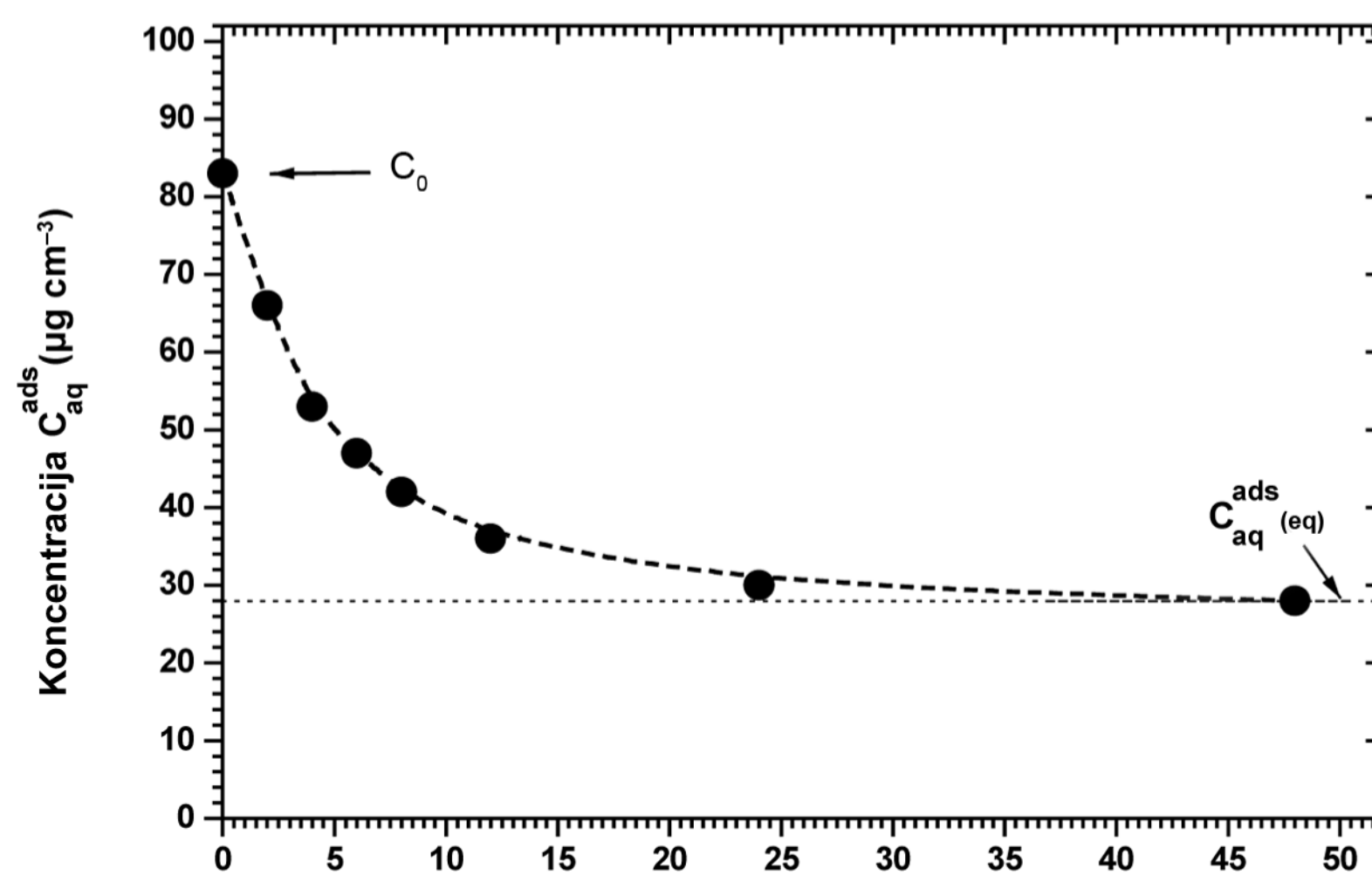
C_0 = sąlytyje su dirvožemiu esančio bandomojo tirpalo pradinė masės koncentracija ($\mu\text{g cm}^{-3}$);

▼ **B**

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = medžiagos vandeninės fazės masės koncentracija laiko momentu t_i , kai daroma analizė ($\mu\text{g} \times \text{cm}^{-3}$); ši koncentracija nustatoma analizės būdu atsižvelgiant į tuščiuosiuose bandymuose gautas vertės,

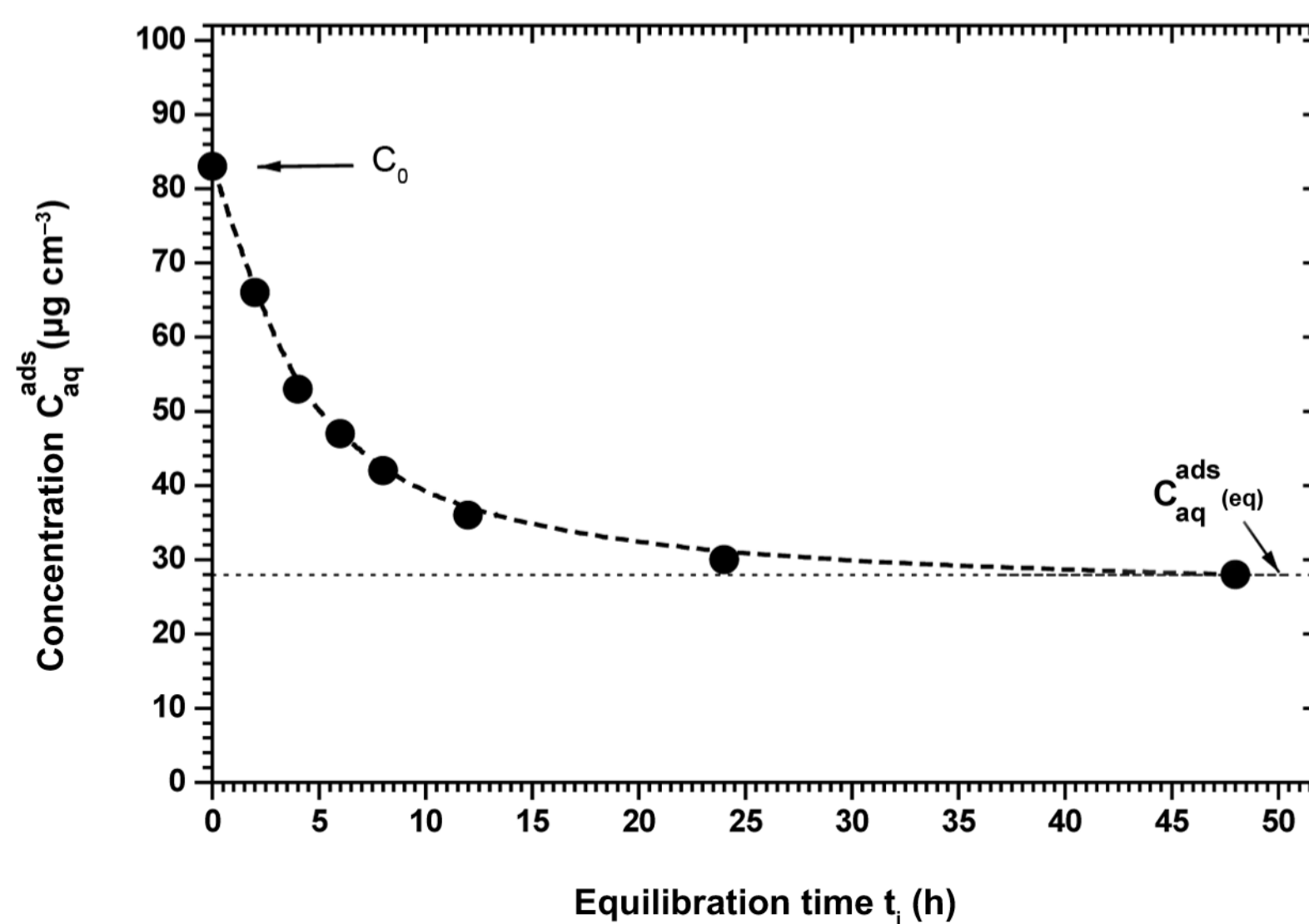
V_0 = sąlytyje su dirvožemiu esančio bandomojo tirpalo pradinis tūris (cm^3).

Adsorbcijos procentinės dalies A_{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 pav. ir 2 pav.



1 pav.

Adsorbcijos pusiausvyros grafikas



2 pav.

Bandomosios medžiagos masės koncentracijos (C_{aq}) kitimas laike

▼ Bb) *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 $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{V_a^A} \right) \quad (4)$$

— antrajam laiko tarpui $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{V_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - V_a^A}{V_a^A} \right) \quad (5)$$

— trečiajam laiko tarpui $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_3) = m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - V_a^A}{V_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot V_a^A}{V_a^A} \right) \quad (6)$$

— n-ajam laiko tarpui $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n) = m_m^{\text{ads}}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot V_a^A}{V_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot V_a^A}{V_a^A} \right) \quad (7)$$

— Kiekvienam laiko tarpui procentinė adsorbcijos $A_{\Delta t_i}$ dalis, apskaičiuojama pagal šią lygtį:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (8)$$

tuo tarpu procentinė adsorbcijos dalis A_{t_i} laiko momentu t_i apskaičiuojama pagal lygtį:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{\text{ads}}(j)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (9)$$

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:

$$m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼ B

— bandomosios medžiagos tirpale masė yra lygi:

$$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— ir adsorbcijos procentinė dalis pusiausvyros sąlygomis yra lygi:

$$A_{\text{eq}} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (12)$$

Pirmiau naudoti parametrai apibrėžiami kaip:

$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1), m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2), \dots, m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n)$ = bandomosios medžiagos, adsorbuotos dirvožemiu atitinkamai per laiko tarpus $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ masė (μg);

$m_m^{\text{ads}}(t_1), m_m^{\text{ads}}(t_2), \dots, m_m^{\text{ads}}(t_n)$ = atitinkamai laiko momentu t_1, t_2, t_n nustatyta bandomosios medžiagos masė t_1, t_2, t_n atitinkamai (μg);

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = adsorbcijos pusiausvyros sąlygomis dirvožemiu adsorbuotos medžiagos masė (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = 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 pasiekama 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:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_m^{\text{des}}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i} \right) - m_{\text{aq}}^A \quad (13)$$

Desorbcijos pusiausvyros sąlygomis $t_i = t_{\text{eq}}$ todėl $m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$

Per laiko tarpą (Δt_i) desorbuotos medžiagos masė nustatoma pagal lygtį:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{\text{aq}}^{\text{des}}(j) \quad (14)$$

Desorbcijos procentinė dalis apskaičiuojama:

laiko momentu t_i pagal lygtį:

▼ B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 (\%) \quad (15)$$

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 (%),

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = laiko momentu t_i desorbuotos bandomosios medžiagos masė (μg),

$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ = 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 darant 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:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \quad (18)$$

▼ B

Laiko momentu t_i :

- bandomosios medžiagos masė matuojama mažame alikvotinės dalies tūryje $\left(v_a^D\right)$ ir desorbuotos medžiagos masė apskaičiuojama pagal lygtį:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_T}\right) \quad (19)$$

- desorbcijos procentinė dalis 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 $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \quad \text{and} \quad m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

- 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 $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right) \right]$$

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Galiausiai desorbcijos procentinė dalis kiekvienam laikotarpiu $D_{\Delta t_i}$ apskaičiuojama pagal šią lygtį:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 (\%) \quad (24)$$

tuo tarpu desorbcijos procentinė dalis D_{t_i} laiko momentu t_i ; nustatoma pagal lygtį:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 (\%) \quad (25)$$

▼ B

Šiose lygtyse naudoti parametrai apibrėžiami kaip:

$m_s^{\text{des}}(\Delta t_1), m_s^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_s^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = medžiagos, kuri dar liko adsorbuota dirvožemiu pasibaigus atitinkamai laiko tarpams $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ masė (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = bandomosios medžiagos desorbuotos atitinkamai per laiko tarpus $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ masė (μg);

$m_m^{\text{des}}(t_1), m_m^{\text{des}}(t_2), \dots, m_m^{\text{des}}(t_n)$ = Medžiagos masė, nustatyta alikvotinės dalies tūryje (v_a^D) atitinkamai laiko momentais $t_1, t_2, \dots, t_n$, (μg);

V_T = vandeninės fazės, esančios sąlytyje su dirvožemiu darant desorbcijos kinetikos bandymą pagal nuoseklųjį metodą, bendras tūris (cm^3);

m_{aq}^A = bandomosios medžiagos, likusios po adsorbcijos pusiausvyros bandymo dėl nevisiško tūrio pakeitimo, masė (μg);

$$m_{\text{aq}}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (26)$$

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 darant desorbcijos kinetikos bandymą, alikvotinės dalies tūris (cm^3);

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \quad (27)$$

▼B

	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	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	$\mu g\ cm^{-3}$								
Nuoseklusis metodas										
Alikvotinės tirpalo dalies tūryje V_a^A išmatuota medžiagos masė	$m_m^{ads}(t_i)$	μg								
Tiesioginis 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	Tusciasis bandymas		Tuščiasis bandymas		Kontrolinis bandymas	
Mėgintuvėlio Nr.								
Pasverta dirvožemio		g					0	0
Vandens pasvertame dirvožemyje tūris (apskaičiuotas)		cm^3					—	—
ipilto 0,01 M		cm^3						
ipiltas bandomosios medžiagos pradinio tirpalo tūris		cm^3	0	0				
Bendras vandeninės fazės tūris (apskaičiuotas)		cm^3					—	—

▼B

	Simbolis	Vienetai	Tusciasis 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 nusistovėjimo trukmė	t _{eq}	h				

1-asis praskiedimas tirpikliu

Nupiltos vandeninės fazės tūris	V _{rec}	cm ³				
ipilto 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				

▼B

	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				
ipilto tirpiklio tūris	ΔV'	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								
ipilto 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								
Po sumaisymo ir centrifugavimo										
Bandomosios medžiagos vandeninės fazės koncentracija, įskaitant tuščiojo bandymo pataisą	C _{aq} ^{ads} (eq)	µg cm ⁻³								

$$\nabla \underline{\mathbf{B}}$$

	Simbolis	Vienetai								
Temperatūra		°C								
Adsorbuotos medžiagos masė, tenkanti dirvožemio masės vienetui	C_s^{ads} (eq)	$\mu\text{g g}^{-1}$								

Regressijas analīzē:

 K_F^{ads} vertè:

1/n vertè:

regresijos koeficientas r^2 :

Bandyta medžiaga:

Bandytas dirvožemis:

Sauso dirvožemio masės dalis (105 °C, 12h): %

Temperatūra: °C

Taikytas analizės metodas: Netiesioginis ☐ Lygiagre- ☐ Nuoseklusis ☐

Desorbcijos bandymas

		Simbolis	Vienetai	Laiko tarpas	Laiko tarpas	Laiko tarpas	Laiko tarpas
Mēģintuvēlio, gauto iš adsorbcijos pakopos tarpsnio, Nr.							
Adsorbcijos pustausrvyros 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		$m_m^{\text{des}}(t_i)$	μg				
Tirpalo, palinto 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)		$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)$	μg				
Per laiko tarpą Δt_i nuo dirvožemio desorbuotos medžiagos masė (apskaičiuota)		$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)$	μg				

Desorbcijas procentinē dalis

Desorbciija laiko momentu t_i	D_{ti}	%				

▼B

	Simbolis	Vienetai	Laiko tarpas	Laiko tarpas	Laiko tarpas	Laiko tarpas
Desorbcija per laiko tarpą Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Tiriamas desorbcijos koeficientas	K_{des}					

PM: lygiagretusis metodas

SM: nuoseklusis metodas

▼ B**C.19. DIRVOŽEMIO IR NUOTEKŲ DUMBLO ADSORBCIJOS KOEFICIENTO (K_{oc}) VERTINIMAS TAIKANT DIDELIO EFEKTYVUMO SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJĄ (HPLC)****1. METODAS**

Šis metodas yra OECD TG121 (2001) kopija.

1.1. ĮVADAS

Medžiagų sorbciją dirvožemiu ar nuotekų dumblo gali apibūdinti parametrai, bandymais nustatyti taikant C. 18 bandymų 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 n – oktanolio/-vandens pasiskirstymo koeficientu (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Pagal aprašytą šio bandymo metodą adsorbcijos dirvožemiu ir nuotekų dumblo koeficientui K_{oc} nustatyti taikomas HPLC (8). Įvertiniai 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, daromų pagal C. 18 bandymų metodą. Tačiau įvertintas K_{oc} gali būti naudingas tinkamiems bandymų parametrams pasirinkti adsorbcijai/desorbcijai tirti pagal C. 18 bandymų metodą apskaičiuojant K_d (pasiskirstymo koeficientą) ar K_f (Freundlichio adsorbcijos koeficientą) pagal 3 lygtį (žr. 1.2 skirsnį).

1.2. APIBRĖŽIMAI

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 $\text{ml} \times \text{g}^{-1}$. K_d gali keistis keičiantis sorbento savybėms ir gali priklausyti nuo koncentracijos.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \text{ or } \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \quad (1)$$

čia:

C_{soil} = bandomosios medžiagos dirvožemyje koncentracija pusiausvyros sąlygomis ($\mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$)

C_{sludge} = bandomosios medžiagos dumble koncentracija pusiausvyros sąlygomis ($\mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$)

C_{aq} = bandomosios medžiagos vandeninės fazės koncentracija pusiausvyros sąlygomis ($\mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$, $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$).

▼ B

K_f : Freundlichio adsorbcijos koeficientas yra apibrėžiamas kaip bandomosios medžiagos dirvožemyje ar nuotekų dumble koncentracija (x/m), kai vandeninės fazės pusiausvyros koncentracija C_{aq} lygi vienetui; vienetui yra $ug \times g^{-1}$ sorbento. Vertė gali keistis keičiantis sorbento savybėms.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

čia:

x/m = kiekis x (ug) bandomosios medžiagos, pusiausvyros sąlygomis adsorbuotos sorbentu, kurio kiekis m (g)

$1/n$ = Freundlichio adsorbcijos izotermės lygties krypties koeficientas

C_{aq} = bandomosios medžiagos vandeninės fazės koncentracija pusiausvyros sąlygomis ($\mu g \times ml^{-1}$)

$$\text{At } C_{aq} = 1; \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc} : pasiskirstymo koeficientas (K_d) ar Freundlichio adsorbcijos koeficientas (K_f), normalizuoti pagal sorbento organinės anglies kiekį (f_{oc}); ypač nejoninėms cheminėms medžiagoms 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 vienetui yra $ml \times g^{-1}$ ar $\mu g \times g^{-1}$ organinės medžiagos.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} (\text{dimensionless or } ml \cdot g^{-1}) \text{ or } \frac{K_f}{f_{oc}} (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (3)$$

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.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

čia:

t_R = bandomosios ir etaloninės medžiagos sulaikymo trukmė HPLC metodu (minutės),

t_0 = eliuento sulaikymo trukmė (dead time) FIPLC metodu (minutės) (žr. 1.8.2 skirsnį).

P_{ow} = oktanolio ir vandens pasiskirstymo koeficientas apibrėžiamas kaip medžiagos n – oktanolio tirpalo ir vandens tirpalo koncentracijos santykis; jis yra bematis dydis.

$$P_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{aq}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

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 tarp oktanolio ir vandens koeficientą ir apie hidrolizės charakteristikas.

▼B

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. Rekomenduotos 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 ESMĖ

Bandymas HPLC metodu daromas analizės kolonėlėse, kurių kietąją fazę sudaro pramoninės gamybos cianpropilo derva, 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 esmė yra panaši į A.8 bandymo metodo (paskirstymo koeficientas, HPLC metodas) esmę. 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 daromi du bandymai medžiagai esant joninio ir nejoninio pavidalo, tačiau tik tais atvejais, kai bandomosios medžiagos disociacijos laipsnis pH 5,5 – 7,5 diapazone 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 detektorius) ir kurios yra gana stabilios vykstant bandymui. Jis gali būti ypač naudingas cheminėms medžiagoms, sunkiai tiriamoms kitomis bandymų sistemomis (t. y. lakioms medžiagoms; medžiagoms, kurių tirpumas yra mažesnis nei analiziškai nustatoma koncentracija; medžiagoms, kurių giminingumas 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.

▼B

Kartais priemaišos gali trukdyti aiškinant HPLC rezultatus, tačiau jos nėra tokios svarbios, jei bandomoji medžiaga gali būti aiškiai identifiukuota 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 karboninių rūgščių esteriai (pvz., benzenkarboninės rūgšties metilesteris, 3,5-dinitrobenzenkarboninės rūgšties etilesteris),
- aromatiniai angliavandeniliai (pvz., toluenas, ksilenas, etilbenzenas, nitrobenzenas),
- ariloksifenoksipropano rūgšties esteriai (pvz., diklofopmetilas, fenoksapropetilas, fenoksaprop-P-etilas),
- fungicidai benzimidazolo ir imidazolo pagrindu (pvz., karbendazimas, fuberidazolas, triazoksidas),
- karboninių rūgščių amidai (pvz., 2-chlorbenzamidai, N, N-dimetilbenzamidai, 3,5-dinitrobenzamidai, N-metilbenzamidai, 2-nitrobenzamidai, 3-nitrobenzamidai),
- 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 eluentu 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 aktyviosioms medžiagoms, neorganiniams junginiams ir vidutinio stiprumo ar stiprioms organinėms rūgštims ir bazėms. Galima nustatyti log K_{oc} vertes 1,5 – 5,0 diapazone. Jonizuojamos medžiagos turi būti matuojamos naudojant buferinę judamąją fazę, tačiau reikia žiūrėti, kad nesusidarytų buferinio tirpalo komponentų ar bandomosios medžiagos nuosėdų.

▼B

1.6. KOKYBĖS KRITERIJAI

1.6.1 **Tikslumas**

Paprastai bandomosios medžiagos adsorbcijos koeficientas gali būti įvertintas $\pm 0,5$ log vieneto tikslumu lyginant su verte, nustatyta įkrovos pusiausvyros metodu (žr. priedėlio 1 lentelę). Galima pasiekti didesnę 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 sukauptas patyrimas taikant metodą patvirtina jo validumą. Tiriant HPLC metodą pagal 48 medžiagas (daugiausia pesticidus), kurioms yra patikimi adsorbcijos dirvožemiu K_{oc} duomenys, gautas koreliacijos koeficientas $R = 0,95$ (10) (11).

Metodui tobulinti ir jo validumui patvirtinti buvo daromas 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 oktanolio ir vandens pasiskirstymo koeficientas P_{ow} ($= K_{ow}$) ir tam tikru laipsniu tirpumas vandenyje, taigi jie gali būti naudojami pradiniam diapazonui 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 detektavimo 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 judamąją fazę 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.

▼B

Eliuavimo tirpikliui ruošti naudojamas HPLC grynumo metanolis ir distiliuotas vanduo ar citratinis buferinis tirpalas. Prieš naudojant mišinys nuduojamas. 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 daromi atskirose kolonėlėse.

1.7.4 **Tirpiniai**

Bandomoji ir etaloninė medžiagos turi būti ištirpintos judamojoje fazėje.

1.8. **BANDYMO EIGA**

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_0 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_0 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 išvirkštos 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) išvirkščiamos atskirai ir nustatoma jų sulaikymo trukmė.

▼B

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_0 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, detektavimo būdas, judamoji fazė (komponentų santykis ir pH), bandymų temperatūros diapazonas,
- 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.

▼B

- 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.

▼B

Priedas

1 lentelė

Dirvožemių ir nuotekų dumblių K_{oc} verčių ir HPLC atrankos metodu apskaičiuotų verčių palyginimas ⁽¹⁾, ⁽²⁾

Medžiaga	CAS Nr.	Nuotekų dumblių $\log K_{oc}$	$\log K_{oc}$ 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
Fenilbenzoatas	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-nitrobenzaminas	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), daryto HPLC metodui patobulinti ir validumui 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.



3 lentelė

Rekomenduojamos etaloninės medžiagos HPLC atrankos metodui, taikančiam adsorbciją dirvožemiui

Etaloninė medžiaga	CAS-Nr.	log K _{oc} vidutinės vertės pagal įkrovos pusiaus- vyrą	K _{oc} duomenų skaicius	log S.D.	Saltinis
Acetanilidas	103-84-4	1,25	4	0,48	(a)
Fenolis	108-95-2	1,32	4	0,70	(a)
2-Nitrobenzamidą	610-15-1	1,45	3	0,90	(b)
N, N-dimetilbenzamidą	611-74-5	1,52	2	0,45	(a)
4-Metilbenzamidą	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 -Nitrobenzamidą	645-09-0	1,95	3	1,31	(b)
Anilinas	62-53-3	2,07	4	1,73	(a)
3,5-dinitrobenzamidą	121-81-3	2,31	3	1,27	(b)
Karbendazimas	10605-21-	2,35	3	1,37	(c)
Triadimenolis	55219-65-3	2,40	3	1,85	(c)
Triazoksidas	72459-58-6	2,44	3	1,66	(c)
Triazofosas	24017-47-4017-47-8	2,55	3	1,78	(c)
Linuronas	330-55-2	2,59	3	1,97	(c)
Naftalenas	91-20-3	2,75	4	2,20	(a)
Endosulfandiolis	2157-19-9	3,02	5	2,29	(c)
Metiokarbas	2032-65-7	3,10	4	2,39	(c)
Rūgštusis geltonas 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	(a)
1,2,3-trichlorobenzenastri	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)
a-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.

▼B**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. APIBRĖŽIMAI IR VIENETAI

Motininiai gyvūnai – nuo bandymo pradžios naudojamos moteriškos lyties dafnijos, kurių yra tiriamas reprodukcijos našumas.

Palikuonys – darant bandymą produkuotos dafnijos.

Mažiausia stebimo poveikio 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).

Nestebimo 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 – yra populiacijos augimo matas, apimantis reprodukcijos našumą ir amžiui specifiską gaištamumą (20) (21) (22). Stacionarios būsenos populiacijų jis lygus nuliui. Augančių populiacijų 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 bandymų indą, nepastebima judant galūnių ar pilvelio. (Jei taikomas kitas apibrėžimas, jis turi būti pateiktas kartu su jo nuoroda.).

▼B**1.3. BANDYMO METODO ESMĖ**

Jaunos moteriškos lyties dafnijos (motininiai gyvūnai), kurių amžius bandymo pradžioje mažesnis kaip 24 h, yra veikiamos bandomąja medžiaga, ištirpinta vandenyje tam tikram koncentracijos verčių diapazonui gauti. Bandymo trukmė 21 para. Baigiant bandymą įvertinamas vienam gyvam motininiam gyvūnui tenkančių gyvų palikuonių bendras skaičius. Suaugusiųjų produkuoti jaunikliai, kurie žūva darant bandymą, į skaičiavimus neįtraukiami. Motininių gyvūnų reprodukcijos našumą galima išreikšti kitais būdais (pvz., gyvų palikuonių, produkuotų 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 stebimo poveikio koncentracijai (LOEC), kartu ir nestebimo 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* daryto trumpalaikio toksiškumo bandymo (žr. C.2 metodą, I dalį) rezultatus. Rezultatas gali būti naudingas pasirenkant atitinkamą reprodukcijos bandymų bandomosios koncentracijos diapazoną. 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, pK_a , P_{ow} ir lengvo biolologinio skaidomumo bandymo rezultatus (žr. C.4 metodą).

1.5. BANDYMO VALIDUMAS

Metodas yra validus, jei, darant 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**

Bandymų indai ir kita aparatūra, su kuria liečiasi bandomieji tirpalai, turi būti pagaminti vien tik iš stiklo ar kitos chemiškai inertinės 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);

▼B

- 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. Bandymų organizmai

Bandymui reikėtų naudoti *Daphnia magna Straus*. Galima naudoti kitas dafnijų rūšis, jei jos atitinka nustatytus validumo kriterijus (dafnijų rūšiai turi būti taikomas su kontrolinių bandinių reprodukcijos našumu susijęs validumo 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 klonas (jo kilmė – IRCHA (*Institut de Recherche en Chimie Appliquee*), Prancūzija) (3) reprodukcijos našumas visą laiką atitinka validumo kriterijų, pagal kurį vieno motininio gyvūno, išlikusio gyvo auginant šiame metode aprašytomis sąlygomis, vidutinis palikuonių skaičius > 60. Tačiau priimtini ir kiti klonai, jei parodoma, kad dafnijų kultūra atitinka bandymo validumo kriterijus.

Bandymo pradžioje gyvūnai turi būti jaunesni kaip 24 h ir neturi būti pirmoji palikuonių karta. Jie turi būti gauti iš sveiko kamieno (t. y. be streso požymių, pvz., didelis mirtingumas, vyriškos lyties atstovų ir *ephippia* buvimas, vėlavimas produkuoti pirmąją vadą, pasikeitusi gyvūnų spalva ir t. t.). Kamieno 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, motininio gyvūno stresui išvengti gera praktika reikalauja leisti dafnijoms paprastai maždaug per tris savaites (t. y. vienos kartos laikotarpiu) aklimatizuotis.

1.6.3. Bandymų 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 validumo kriterijus.

Jei naudojamos terpės su neapibrėžtais priedais, šie priedai turi būti aiškiai apibūdinti ir bandymų 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 jų indėlį į paruoštos terpės TOC/COD. Rekomenduojama, kad terpės (t.y. prieš pridedant dumblių) TOC lygis būtų mažesnis kaip 2 mg/l (7).

▼ B

Bandant metalų turinčias medžiagas, svarbu suprasti, kad bandomosios terpės savybės (pvz., kietumas, chelataavimo 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 chelataavimo agento EDTA. Darbas (2) parodė, kad, reprodukcijos bandymą darant 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 žinomus chelataavimo agentus. Metalų turinčioms medžiagoms patartina naudoti kitą terpę, pvz., ASTM (*American Society for Testing and Materials*) atkurtoji kietą gėlą vandenį (7) be EDTA, į kuri 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 darant bet kurį bandymą ji paprastai neturi kisti daugiau kaip 1,5 vieneto. Rekomenduojamas 140 mg/l (pagal CaCO₃) kietumas. Bandymai, daryti esant šiam ar aukštesniam lygiui, parodė, kad reprodukcijos našumas atitinka validumo kriterijus (9) (10).

1.6.4. Bandomieji tirpalai

Pasirinktos koncentracijos bandomieji tirpalai paprastai ruošiami skiedžiant pradinį tirpalą. Pradinius tirpalus geriau ruošti tirpinant medžiagą bandymų 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 bandymų terpėje riba.

Tirpikliai naudojami pradiniam tirpalui ruošti, kuris gali būti tiksliai dozuojamas vandeniu. Kai pirmiau išvardyti tirpikliai galutinėje bandymų 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 bandymų terpėje bus rekomenduojamos koncentracijos (≤ 0,1 ml/l), jie nebus toksiški ir nepadidins medžiagos tirpumo vandenyje.

▼B

1.7. BANDYMO PLANAS

Bandymų indai paskirstomi pagal apdorojimo būdus, o toliau visi bandymų 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 blokinį bandymo planą.

1.8. BANDYMO EIGA

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 bandymų inde su 50–100 ml terpės.

Kartais, atsižvelgiant į analizės metodikos bandomajai medžiagai nustatyti reikalavimus, gali būti reikalingas didesnis tūris, nors cheminei analizei daryti 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 validumo kriterijų atitikties. Dinaminiams bandymams dėl techninių priežasčių galima numatyti alternatyvius bandymo planus (pvz., keturias grupes po 10 gyvūnų didesniame bandymo tūryje), tačiau visi bandymo plano pakeitimai turi būti nurodyti ataskaitoje.

1.8.1.3. *Gyvūnų skaičius*

Pusiaus 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 darant bandymus su grupėmis laikomais gyvūnais, motininiai gyvūnai žūva, reprodukcijos našumo bus neįmanoma išreikšti kaip bendro gyvūnų palikuonių skaičiaus, tenkančio vienam bandymo pabaigoje gyvam motininiam gyvūnui. Tokiais atvejais reprodukcijos našumas išreiškiamas kaip „bendras skaičius gyvūnų palikuonių, tenkantis vienam bandymo pradžioje buvusiam gyvūnui“.

1.8.1.4. *Maitinimas*

Darant pusiau statinius bandymus geriau maitinti kasdien, tačiau ne mažiau kaip tris kartus per savaitę (tai atititinka terpės keitimą). Nukrypimai nuo šių sąlygų (pvz., dinaminių bandymų) nurodomi ataskaitoje.

▼B

Darant bandymą motininių gyvūnų maistą turėtų sudaryti šių gyvū 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 validumo 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 davinsys turi atitikti rekomenduotą diapazoną 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 parametrai 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 bandymų 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 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

1.8.1.6. *Temperatūra*

Bandymų terpės temperatūra turi būti 18-22 °C. Tačiau, jei įmanoma, darant 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 bandymų indas.

1.8.1.7. *Aeravimas*

Darant 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 bandymų terpėje riba.

▼B

Nustatant koncentracijų diapazoną 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 pasiklovimo 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} pasiklovimo intervalas būtų labai platus, ir gali būti neįmanoma patenkinamai įvertinti parinkto modelio tinkamumo.
- iv) Reikėtų vengti į bandomosios koncentracijos verčių diapazoną įtraukti koncentracijos vertes, kurios būtų statistškai reikšmingos suaugusių gyvūnų išlikimui, nes taip pasikeistų bandymo esmė, 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) diapazono nustatymo tyrimų duomenys).

Jei bandomiesiems tirpalams ruošti naudojamas tirpiklis ar dispergatorius (žr. 1.6.4 skirsnį), jų galutinė koncentracija visuose bandymų induose turi būti vienoda ir ne didesnė kaip 0,1 ml/l.

1.8.3. Kontroliniai bandiniai

Be bandomosios medžiagos bandinių serijos, bandoma viena bandymų 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 daromas atitinkamas skaičius lygiagrečiųjų bandymų (žr. 1.8.1.3 skirsnį).

Paprastai jei bandymas daromas tinkamai, kontrolinio (-ių) bandinio (-ių) variacijos apie vidutinę motininio gyvūno produkuotų palikuonių vertę koeficientas turi būti < 25 %, ir jis turi būti nurodomas bandymo planams su atskirai laikomais gyvūnais.

1.8.4. Bandymų terpės atnaujinimas

Bandymų 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.

▼B

Kai atnaujinama pusiau statinių bandymų terpė, paruošiama antra bandymų 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 darant bandymą, registruojami duomenų lentelėse (žr. 3 ir 4 priedėlio 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 produkuotus 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**

Motininų 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 motininų 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.

Darant bandymą bandomosios medžiagos koncentracijos vertės nustatomos reguliariais laiko tarpais.

Jei pusiau statiniuose bandymuose daroma prielaida, kad bandomosios medžiagos koncentracija lieka vardinės koncentracijos $\pm 20\%$ vertės (t. y. 80-120 % diapazono, 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 daroma to paties tirpalo mėginių analizė iš karto po tirpalo paruošimo ir jį atnaujinant). Vėliau šis nustatymas turi būti kartojamas bent kas savaitę.

▼B

Jei tai yra bandymai, kuriuos darant nesitikima, kad koncentracija liks vardinės koncentracijos ± 20 % 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 diapazono), 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 vardinės koncentracijos ar išmatuotos pradinės koncentracijos vertės ± 20 %, 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 produkuoja kiekvienas iki bandymo pabaigos gyvas išlikęs motininis gyvūnas. Bendras vieno motininio gyvūno palikuonių skaičius apskaičiuojamas kiekvienam bandymų indui (t. y. lygiagretusis bandinys). Jei kuriame nors inde motininis gyvūnas darant 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 vidutinę reprodukcijos našumą visiems kiekvienos koncentracijos lygiagretiesiems bandiniams ir grupinį liekamąjį standartinį nuokrypį, o tai galima padaryti taikant dispersinę analizę. Toliau kiekvienos koncentracijos vidutinė vertė turi būti palyginta su kontrolinio bandinio vidutine verte taikant atitinkamą daugybinio lyginimo metodą. Gali būti naudingi *Dunnetto* ar *Williamso* kriterijai (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* kriterijus. Jei ši prielaida negalioja, reikėtų numatyti duomenų transformavimą sklaidoms homogenizuoti prieš darant dispersinę analizę ar daryti svorinę dispersinę analizę. Taikant dispersinę analizę aptinkamo poveikio dydis (t. y. mažiausias reikšmingas skirtumas) turi būti apskaičiuotas ir pateiktas ataskaitoje.

▼ **B**

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} pasiklivimo rėžių apskaičiavimą. Jei nėra svarbių priežasčių, kodėl turėtų būti naudojami kiti pasiklivimo lygiai, turi būti nurodyti dvipusiai 95 % pasiklivimo rėžiai. 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 yra teoriniai pagrindai).

Analizuojant galutinio tarplaboratorinio bandymo duomenis (2), logistinė kreivė buvo pritaikyta naudojant šį modelį, nors galima naudoti kitus tinkamus modelius:

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

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 validumą, 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 fizikocheminės savybės;

▼B

— cheminio identifikavimo duomenys, įskaitant grynumą.

2.2.2. Bandymo 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 planas (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 programą (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 bandymų induose nustatyti analizių rezultatai (žr. 4 priedėlio duomenų lentelių pavyzdžius); taip pat ataskaitoje pateikiamas metodo regeneravimo našumas ir nustatymo riba,
- vandens kokybė bandymų induose (t. y. pH, temperatūra, ištirpusio deguonies koncentracija, TOC ir (ar) COD bei kietumas, jei tinka) (žr. 3 priedėlio duomenų lentelės pavyzdį),
- išsamus kiekvieno motininio gyvūno gyvų palikuonių registravimas (žr. 3 priedėlio duomenų lentelės pavyzdį),
- nugaišusių motininių gyvūnų skaičius ir nugaišimo diena (žr. 3 priedėlio duomenų lentelės 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 stebimo poveikio reprodukcijai koncentracija (LOEC), įskaitant taikytų statistinių metodikų aprašymą ir nurodymą, kokio dydžio poveikis gali būti aptiktas, ir nestebimo poveikio reprodukcijai koncentracija (NOEC); jei tinka, taip pat turi būti pateikta motininių gyvūnų gaištamumo LOEC/NOEC,

▼B

- jei tinka, reprodukcijos EC_x ir pasiklivimo 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.

▼B

- 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.



1 Priedas

VISIŠKAI APIBRĖŽTŲ ELENĐT M7 IR M4 TERPIŲ RUOŠIMAS

Aklimatizavimas *Elendt* M7 ir M4 terpėje

Kai kurios laboratorijos turėjo sunkumų norėdamos dafnijas pernešti tiesiai į M4 (I) 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*. Aklimatizavimas gali trukti visą mėnesį.

RUOŠIMAS

Mikroelementai

Atskirų mikroelementų pradiniai tirpalai (I) iš pradžių ruošiami naudojant tinkamo grynumo vandenį, pvz., dejonizuotą, distiliuotą arba grįžtamosios osmozės būdu gautą vandenį. Iš šių skirtingų tirpalų (I) ruošiamas antras pradinis tirpalas (II), kuriame yra visi mikroelementai (bendras 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 ₃ BO ₃	57 190	20 000	1,0	0,25
MnCl ₂ * 4H ₂ O	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 ₂ O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	1 260	20 000	1,0	0,25
CuCl ₂ * 2H ₂ O	335	20 000	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000	1,0	1,0
CuCl ₂ * 6H ₂ O	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 ₂ O	5 000	2 000	—	—
FeSO ₄ * 7H ₂ O	1 991	2 000	—	—
Na ₂ EDTA ir FeSO ₄ tirpalai ruošiami atskirai, vėliau supilami kartu ir iškart apdorojami autoklave. Taip gaunamas:				
21 Fe-EDTA tirpalas		1 000 kartų	20,0	5,0

▼ B

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 įpildo pradinio tirpalo tūris ml/l	
			M4	M7
II pradinis visų mikroelementų tirpalas		20	50	50

Mitybinių makroelementų pradiniai tirpalai (atskira medžiaga)

CaCl ₂ * 2H ₂ O	293 800	1 000	1,0	1,0
MgSO ₄ * 7H ₂ O	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 * 9H ₂ O	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 ₂ HPO 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 kieki:

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.

N.B. 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.

N.N.B. Pirmąją publikaciją apie M4 terpę galima rasti Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154, p. 25–33.



2 priedelis

BENDROS ORGANINĖS ANGLIES (TOC) ANALIZĖ IR DUMBLIŲ MAISTO TOC KIEKIO NOMOGRAMŲ GAVIMAS

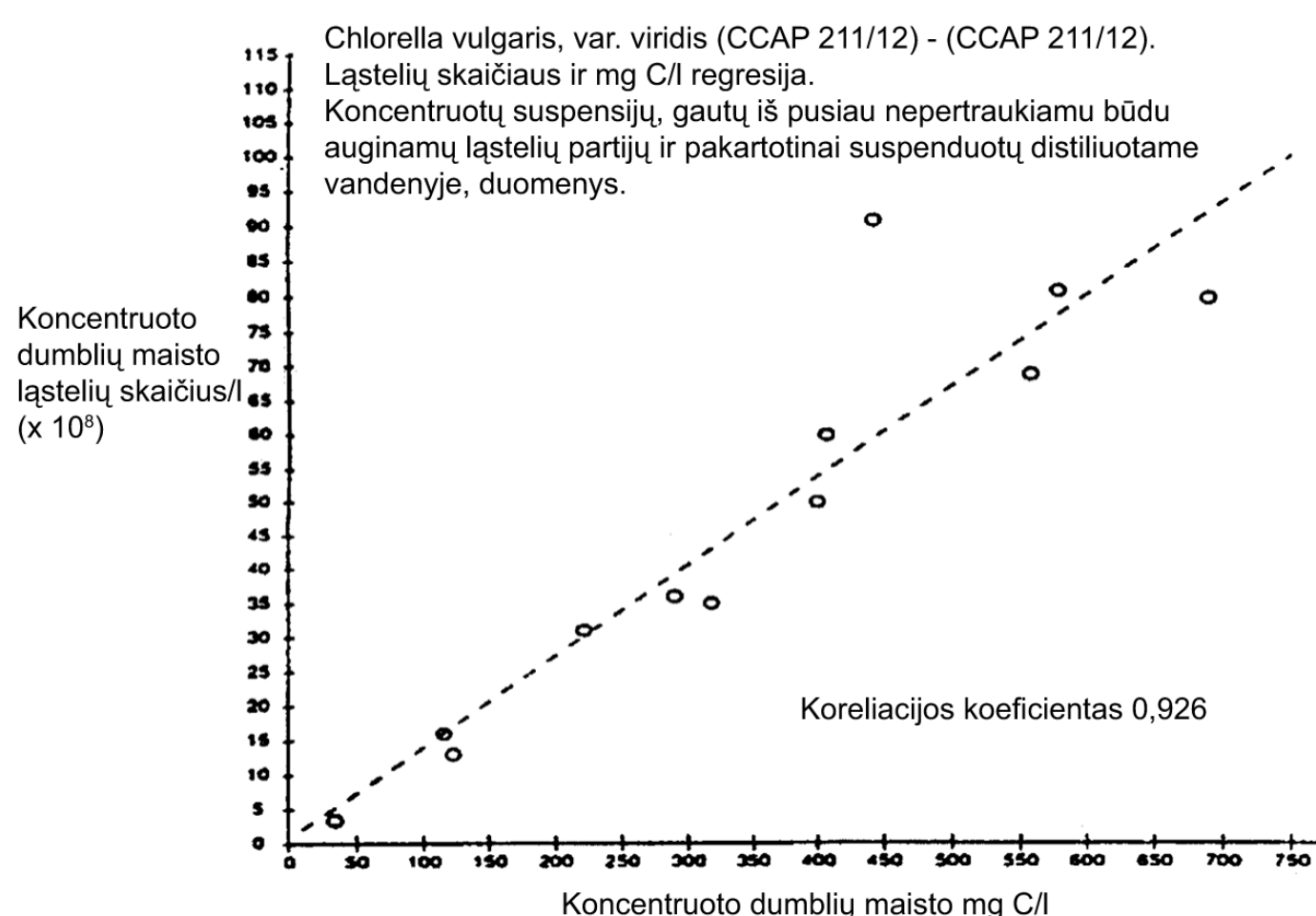
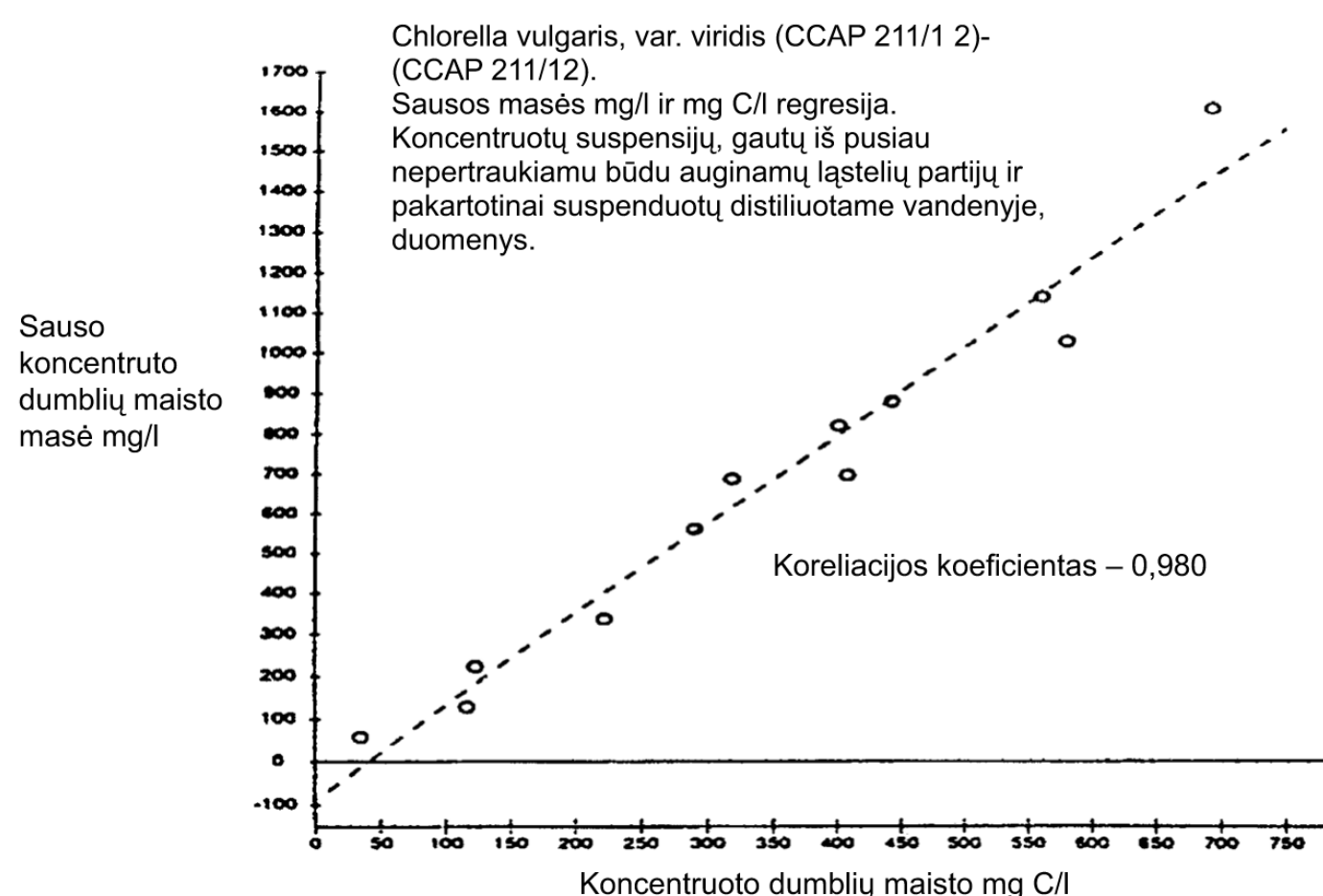
Pripažinta, kad dumblių maisto anglies kiekis tiesioginiu metodu paprastai nematuojamas, bet taikoma jo koreliacija (t. y. nomogramas) su pakeitimo parametrais, pvz., dumblių ląstelių skaičiumi ar šviesos absorbcija.

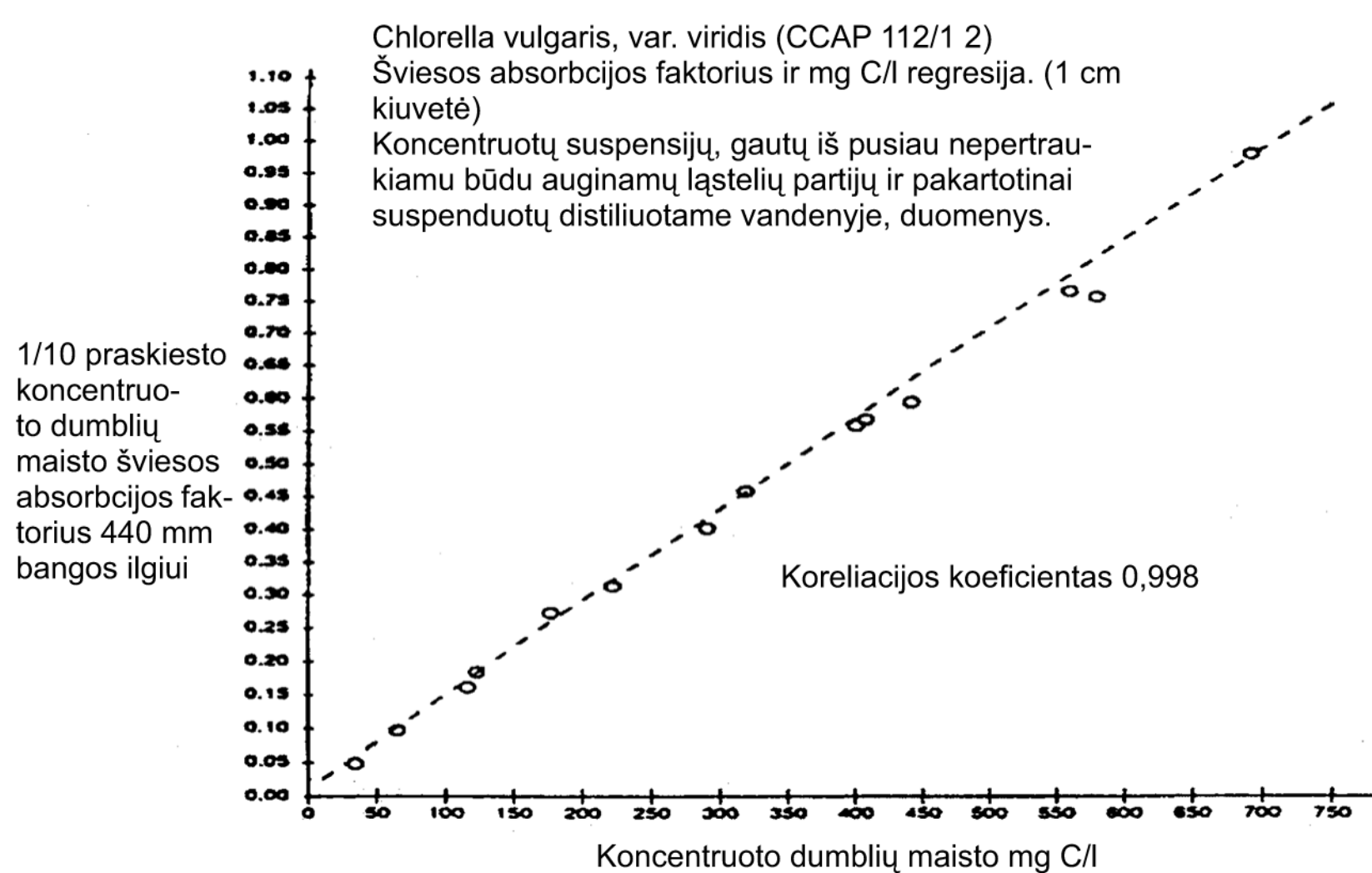
TOC reikėtų matuoti taikant oksidavimo aukštos temperatūros sąlygomis metodą, bet ne UV ar persulfatinį metodą (žr. *The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB*).

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.

N.B. Jų negalima naudoti perskaičiavimams; svarbu, kad laboratorijos turėtų savo darytas nomogramas.



▼ B

3 priedėlis

TERPĖS ATNAUJINIMO, FIZIKOCHEMINIO MONITORINGO, MAITINIMO, DAFNIJŲ REPRODUKCIJOS IR SUAUGUSIŲ GYVŪNŲ GAIŠTAMUMO DUOMENŲ REGISTRAVIMO LENTELĖS PAVYZDYS

Bandymas 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	
O₂ mg/l (¹)																							naujos	
																							senos	
Temperatūra °C (¹)																							naujos	
																							senos	
Duota maisto (dėti varnelę)																								
Niėra gyvų palikuonių (²)																								Bendras
1 indas																								
2																								
3																								
4																								
5																								

▼B

Bandymas 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) Registraojamas visų suaugusių gyvūnų giaštamumas, atitinkamame langelyje įrašant „M“
(3) Registraojami neapvaisinti kiaušiniai, aitinkamame langelyje įrašant „AB“

▼B

4 priedėlis

CHEMINĖS ANALIZĖS REZULTATŲ REGISTRAVIMO LENTELĖS PAVYZDYS

(a) Išmatuotos koncentracijos vertės

Vardinė konc.	1 savaitės bandinys		2 savaitių bandinys		3 savaitių bandinys	
	Šviežias	Senas	Šviežias	Senas	Šviežias	Senas

(b) Išmatuotos koncentracijos vertės, išreikštos vardinės koncentracijos procentine dalimi

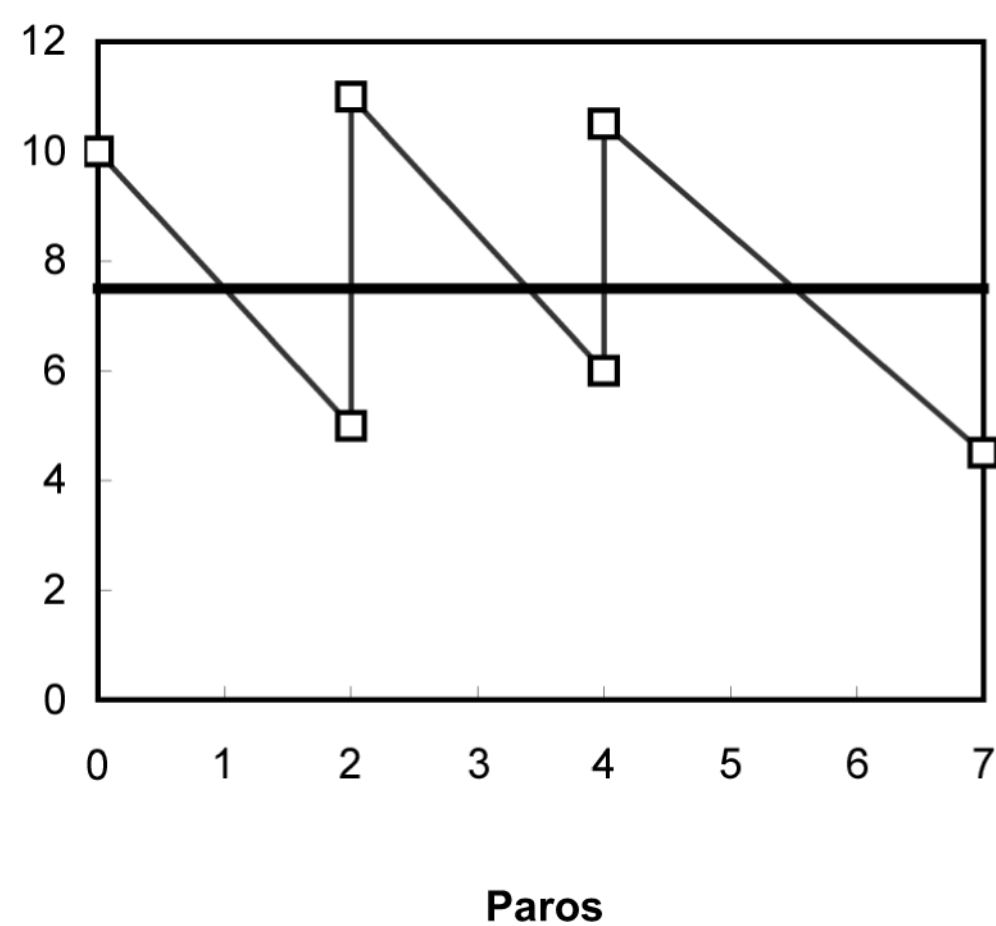
Vardinė konc.	1 savaitės bandinys		2 savaitių bandinys		3 savaitių bandinys	
	Šviežias	Senas	Šviežias	Senas	Šviežias	Senas

▼ **B**

5 priedelis

LAIKO SVORINIO VIDURKIO APSKAIČIAVIMAS**Laiko svorinis vidurkis**

Darant prielaidą, kad bandomosios medžiagos koncentracija laikotarpy 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 svorinė vidutinė koncentracijos vertė, nes ją nustatant atsižvelgiama į momentinį koncentracijos kitimą laike.

1 paveikslas**Laiko svorinio 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 svorinio vidurkio padėtį.

Laiko svorinis vidurkis apskaičiuojamas taip, kad plotas po laiko svorinio vidurkio tiesės yra lygus plotui po koncentracijos kitimo kreivės. Pirmiau pateikto pavyzdžio apskaičiavimas parodytas 1 lentelėje.

▼**B**

1 lentelė

Laiko svorinio vidurkio apskaičiavimas

Atnaujinimas Nr.	Paros	Conc0	Conc1	Ln(Conc0)	Ln(Conc1)	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,
„Conc0“ – kiekvieno atnaujinimo laikotarpio pradžioje išmatuota koncentracija,
„Conc1“ – kiekvieno atnaujinimo laikotarpio pabaigoje išmatuota koncentracija,
„ln(Conc0)“ – Conc0 natūralusis logaritmas,
„ln(Conc1)“ – Conc1 natūralusis logaritmas,
„Plotas“ – plotas po eksponentės kreivę kiekvienam atnaujinimo laikotarpiui. Jis apskaičiuojamas:

$$Area = \frac{Conc0 - Conc1}{Ln(Conc0) - Ln(KConc1)} \times Days$$

Laiko svorinis 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 darant cheminę analizę, nerandama jokios medžiagos. Jei negalima įvertinti, kaip greitai medžiaga išnyko iš tirpalo, neįmanoma gauti tikrojo ploto po kreivę, taigi neįmanoma gauti priimtina laiko svorinį vidurkį.

▼B**C.21. DIRVOŽEMIO MIKROORGANIZMAI. AZOTO VIRSMO BANDYMAS****1. METODAS**

Šis bandymų 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 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. vykusiam 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 vadovu (7) ir Belgirate seminario 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 virsmo bandymas daromas siekiant nustatyti tokių cheminių medžiagų poveikį dirvožemio mikroflorai. Jei bandomos agrocheminės medžiagos (pvz., augalų apsaugos produktai, trąšos, miškininkystėje naudojamos cheminės medžiagos), daromi azoto virsmo ir anglies virsmo bandymai. Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, pakanka azoto virsmo bandymo. Tačiau jei darant tokių cheminių medžiagų azoto virsmo bandymą jų EB_{50} vertės patenka į intervalą, nustatytą prekyboje esantiems nitrifikacijos inhibitoriams (pvz., nitrapiirinui), papildomai informacijai gauti gali būti daromas anglies virsmo bandymas.

Dirvožemį sudaro gyvieji ir negyvieji komponentai, esantys sudėtinuose ir heterogeniniuose mišiniuose. Mikroorganizmai vaidina svarbų vaidmenį vykstant derlingų dirvožemių organinių medžiagų skaidymui ir virsmui, 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 virsmas vyksta visuose derlinguose dirvožemiuose. Nors už šiuos procesus atsakingos mikrobiologinės kolonijos įvairiuose dirvožemiuose yra skirtingos, virsmo keliai iš esmės yra tokie patys.

Aprašytas bandymo metodas skirtas ilgalaikiam neigiamam medžiagos poveikiui azoto virsmui aerobiniuose paviršiniuose dirvožemiuose nustatyti. Be to, taikant šį bandymų metodą galima įvertinti medžiagų poveikį dirvožemio mikroflora sukeliama anglies virsmui. 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 nepaliesiti ir funkcinuoja. Bandymui pasirinktas substratas (liucernos milteliai) turi palankų anglies ir azoto santykį (paprastai nuo 12/1 iki 16/1). Dėl šios priežasties anglies trukumas darant bandymą sumažėja ir jei cheminė medžiaga pažeistų mikrobiologines kolonijas, jos galėtų atsistatyti per 100 parų.

▼ **B**

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 (*a. i. – active ingredients*) 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, tikėtina, patenkantis į dirvožemį, yra nežinomas. Taigi jei tai ne agrocheminės medžiagos, nustatomas medžiagos kelių koncentracijos verčių poveikis azoto virsmui. Šių bandymų duomenys yra naudojami dozės ir reakcijos santykio kreivei gauti ir EB_x vertėms apskaičiuoti, kai x yra apibrėžiamas kaip poveikio %.

1.2 APIBRĖŽTYS

Azoto virsmas – azoto turinčios organinės medžiagos skaidymas mikroorganizmais iki atitinkamo galutinio produkto, neorganinio nitrato, vykstant amonifikacijos ir nitrifikacijos procesams.

EB_x (efektyvioji koncentracija) – bandomosios medžiagos koncentracija dirvožemyje, kai azoto virsmas į nitratą inhibuojamas x procentų.

EB_{50} (medianinė efektyvioji koncentracija) – bandomosios medžiagos koncentracija dirvožemyje, kai azoto virsmas į nitratą inhibuojamas 50 procentų (50 %).

1.3 ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

1.4 BANDYMO METODO ESMĖ

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 daromi 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 EB_x vertės (t. y. EB_{50} , EB_{25} ir (arba) EB_{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 %.

▼B

1.6 BANDYMO METODO APRAŠYMAS

1.6.1 **Aparatūra**

Naudojami bandymo indai, pagaminti iš chemiškai inertinės 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 darant 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 jautrio 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 %;
- matuojama mikrobinė biomasė (8)(9) ir jos anglies kiekis turi sudaryti ne mažiau kaip 1 % suminės 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 daryti. Tačiau tam tikromis aplinkybėmis, pvz., jei medžiagą iš esmės numatoma naudoti konkrečiame dirvožemyje, pvz., rūgščiajame miško dirvožemyje, arba jei naudojamos elektrostatinę krūvį turinčios cheminės medžiagos, gali tekti naudoti papildomą dirvožemį.

▼ B**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 ėimui pasirinkta vieta turėtų užtikrinti ilgalaikį naudojimą. Tinka nuolatinės ganyklos, laukai su kasmetiniais grūdinais 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 (ilgiau 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 neleisėtų 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 išalęs 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).

▼B1.6.4.2 *Fizikocheminės charakteristikos*

Iš dirvožemio rankiniu būdu pašalinami dideli daiktai (pvz., akmenys, augalų dalys ir t. t.), tuomet drėgnas dirvožemis siojamas iki 2 mm arba mažesnių dalelių, neleidžiant jam per daug išdžiūti. Drėgmės kiekis dirvožemio ėminyje reguliuojamas distiliuotu arba dejonizuotu vandeniu iki vertės, sudarančios 40–60 % didžiausios vandens sulaikymo gebos.

1.6.4.3 *Gerinimas pridedant organinio substrato*

Dirvožemį reikėtų pagerinti atitinkamu organiniu substratu, pvz., žaliosios liucernos masės milteliais (pagrindinis komponentas: *Medicago sativa*), kurių C/N santykis yra nuo 12/1 iki 16/1. Rekomenduojamas liucernos ir dirvožemio santykis yra 5 g liucernos vienam kilogramui dirvožemio (sausos medžiagos masės).

1.6.5 **Bandomosios medžiagos ruošimas įterpti į dirvožemį**

Bandomoji medžiaga paprastai įterpiama naudojant nešiklį. Nešikliu gali būti vanduo (vandenyje tirpių medžiagų) arba inertinė kietoji medžiaga, pvz., smulkus kvarcinis smėlis (dalelių dydis: 0,1–0,5 mm). Kitų nei vanduo skystųjų nešiklių (pvz., organinių tirpiklių, pvz., acetono, chloroformo) reikėtų vengti, kadangi jie gali pakenkti mikroflorai. Jei kaip nešiklis naudojamas smėlis, jo daleles galima padengti bandomąja medžiaga, ištirpinta arba suspenduota atitinkamame tirpiklyje. Tokiais atvejais prieš maišant su dirvožemiu tirpiklis išgarinamas. Siekiant optimaliai paskirstyti bandomąją medžiagą dirvožemyje, rekomenduojama naudoti 10 g smėlio vienam kilogramui dirvožemio (sausos medžiagos masės). Kontroliniai ėminiai apdorojami tik lygiaverčiu vandens ir (arba) kvarcinio smėlio kiekiu.

Jei bandomos lakiosios chemines medžiagos, apdorojant reikia kiek įmanoma vengti nuostolių ir stengtis užtikrinti tolygų pasiskirstymą dirvožemyje (pvz., bandomąją medžiagą reikėtų išvirkšti 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 EB× vertėms nustatyti.

▼B

1.7 BANDYMO EIGA

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 daromas 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 darant 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. Darant 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). Darant visus bandymus turi būti naudojami atitinkami indai su pakankamo tūrio laisvąja erdve, kad būtų išvengta anaerobinių sąlygų. Kai bandomos lakiosios medžiagos, bandymas turi būti daromas naudojant seriją atskirų mėginių.

1.7.1.3 *Bandymo sąlygos ir trukmė*

Bandymas daromas 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 nitrato 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 nitrato kiekis apdorotuose ir kontroliniuose dirvožemio ėminiuose ir apskaičiuojamos EB_x vertės.

▼B**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 EB_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 ėminių purtant atitinkamame ekstrahavimo tirpiklyje, pvz., 0,1 mol/l kalio chlorido tirpale. Rekomenduojamas santykis 5 ml KCl 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 $-20 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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 virsmo greitis įvertinamas taikant atitinkamus visuotinai priimtus statistinius metodus (pvz., F kriterijų, 5 % reikšmingumo lygmuo). Susidariusio nitrato kiekis išreiškiamas mg nitrato/kg sauso dirvožemio/parą. 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 EB_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 EB_x vertėms apskaičiuoti taikomos statistinės metodikos. Be to, taikant tipines metodikas (10) (11) (12), nustatomi apskaičiuotos EB_x vertės pasikliautiniai režiai ($p = 0,95$).

Didelį azoto kiekį turinčios bandomosios medžiagos gali prisidėti prie susidariusio nitrato kiekio padidėjimo darant 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 EB_x vertes.

▼B**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 virsmui dirvožemiuose. Kai įvertinami kitų nei agrocheminės medžiagos cheminių medžiagų bandymo rezultatai, naudojamos EB₅₀, EB₂₅ ir (arba) EB₁₀ vertės.

3. ATASKAITOS RENGIMAS

Bandymų 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 tipas (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 talpa (mmol/kg),
- mikrobinė biomasė, išreikšta suminio organinės anglies kiekio procentine dalimi,
- metodų, taikytų kiekvienam parametrai nustatyti, nuorodos,
- visa informacija apie dirvožemio ėminių ėmimą ir laikymą,
- išsami informacija apie pradinį dirvožemio inkubavimą, jei daromas.

Bandomoji medžiaga:

- fizikinė būseną ir, jei tinka, fizikocheminės savybės,
- cheminio identifikavimo duomenys, jei tinka, įskaitant struktūrinę formulę, grynumą (t. y. augalų apsaugos produktų atveju veiklio ingrediento procentinę dalį), azoto kiekį.

Substratas:

- substrato šaltinis,
- sudėtis (t. y. liucernos miltai, žaliosios liucernos masės miltai),
- anglies, azoto kiekis (% sausos medžiagos masės),
- sieto akučių dydis (mm).

▼B

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 darant,
- 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, EB_{50} vertė esant 95 procentų pasikliautinajam rėžiui, kitos EB_x vertės (t. y. EB_{25} arba EB_{10}) ir pasikliautinieji rėžiai, dozės ir reakcijos santykio kreivės grafikas,
- statistinis rezultatų apdorojimas,
- visa informacija ir stebėjimai, 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 – Biological Methods*.

▼B

- 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.

▼B**C.22. DIRVOŽEMIO MIKROORGANIZMAI. ANGLIES VIRSMO BANDYMAS****1. METODAS**

Šis bandymų metodas atitinka OECD TG 217 (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 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. vykusiam 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 vadovu (6) ir Belgirate seminario 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 cheminį medžiagų poveikio dirvožemio mikroorganizmams. Anglies virsmo bandymas daromas siekiant nustatyti tokių cheminių medžiagų poveikį dirvožemio mikroflorai. Jei bandomos agrocheminės medžiagos (pvz., augalų apsaugos produktai, trąšos, miškininkystėje naudojamos cheminės medžiagos), daromi anglies ir azoto virsmo bandymai. Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, pakanka azoto virsmo bandymo. Tačiau jei darant tokių cheminių medžiagų azoto virsmo bandymą, jų EB_{50} vertės patenka į intervalą, nustatytą prekyboje esantiems nitrifikacijos inhibitoriams (pvz., nitrapirinui), papildomai informacijai gauti gali būti daromas anglies virsmo bandymas.

Dirvožemį sudaro gyvieji ir negyvieji komponentai, esantys sudėtinuose ir heterogeniniuose mišiniuose. Mikroorganizmai vaidina svarbų vaidmenį vykstant derlingų dirvožemių organinių medžiagų skaidymui ir virsmui, 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 virsmas vyksta visuose derlinguose dirvožemiuose. Nors už šiuos procesus atsakingos mikrobiologinės kolonijos įvairiuose dirvožemiuose yra skirtingos, virsmo keliai iš esmės yra tokie patys.

▼ **B**

Šis bandymo metodas skirtas nustatyti ilgalaikį neigiamą medžiagos poveikį anglies virsmui aerobiniuose paviršiniuose dirvožemiuose. Šis bandymas yra jautrus už anglies virsmą atsakingų mikrobinių kolonijų dydžio ir aktyvumo pokyčiams, kadangi darant 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 mikrobine medžiagų apykaitą. Šiomis sąlygomis greitai išsenka lengvai iš dirvožemio įsisavinamos anglies šaltiniai. Tai sukelia anglies trūkumą, dėl kurio žūsta mikrobų ląstelės ir atsiranda neveiklumo būseną ir (arba) sporuliaciją. 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 veikiamą 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 (*a.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, tikėtina patenkantis į dirvožemį, yra nežinomas. Taigi jei tai ne agrocheminės medžiagos, nustatomas medžiagos kelių koncentracijos verčių poveikis anglies virsmui. Šių bandymų duomenys yra naudojami dozės ir reakcijos santykio kreivei gauti ir EB_x vertėms apskaičiuoti, kai x yra apibrėžiamas kaip poveikio %.

1.2 APIBRĖŽTYS

Anglies virsmas – organinės medžiagos skaidymas mikroorganizmais iki atitinkamo galutinio produkto, anglies dioksido.

EB_x (efektyvioji koncentracija) – bandomosios medžiagos koncentracija dirvožemyje, kai anglies virsmas į anglies dioksidą inhibuojamas x procentų.

EB_{50} (medianinė efektyvioji koncentracija) – bandomosios medžiagos koncentracija dirvožemyje, kai anglies virsmas į anglies dioksidą inhibuojamas 50 procentų.

1.3 ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Nėra.

▼B**1.4 BANDYMŲ METODO ESMĖ**

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 sukeliama 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 daromi 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 sukeliama kvėpavimo greitis (t. y. susidariusio anglies dioksido arba suvartoto deguonies vidutinis kiekis). Koncentracijos verčių serijos bandymų rezultatai analizuojami taikant regresijos modelį ir apskaičiuojamos EB_x vertės (t. y. EB₅₀, EB₂₅ ir (arba) EB₁₀). 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 BANDYMŲ METODO APRAŠYMAS**1.6.1 Aparatūra**

Naudojami bandymo indai, pagaminti iš chemiškai inertinės 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 darant bandymą (pvz., indai gali būti uždengiami polietileno plėvele su skylutėmis). Bandant lakiasias medžiagas, reikia naudoti uždaromus ir sandarius dujoms indus. Jų dydis pasirenkamas taip, kad dirvožemio ėminys sudarytų maždaug vieną ketvirtąją indo tūrio.

Gliukozės sukeliama 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 %,

▼ B

— 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 % suminės 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 daryti. Tačiau tam tikromis aplinkybėmis, pvz., jei medžiagą iš esmės numatoma naudoti konkrečiame dirvožemyje, pvz., rūgščiajame miško dirvožemyje, arba naudojamos elektrostatinę 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 ėimimui pasirinkta vieta turėtų užtikrinti ilgalaikį naudojimą. Tinka nuolatinės ganyklos, laukai su kasmetiniais grūdinais 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 (ilgiau 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 išalęs 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).

▼B**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 Fizikocheminės charakteristikos

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 išvirkšti 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 tikėtinais 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 EB_x vertėms nustatyti.

▼B

1.7 BANDYMO EIGA

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 lakiasias medžiagas, bandymas daromas 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 darant 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. Darant 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). Darant visus bandymus turi būti naudojami atitinkami indai su pakankamo tūrio laisvąja erdve, kad būtų išvengta anaerobinių sąlygų. Kai bandomos lakiosios medžiagos, bandymas turi būti daromas naudojant seriją atskirų mėginių.

1.7.1.3 *Bandymo sąlygos ir trukmė*

Bandymas daromas 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 EB_x vertės.

▼B**1.7.2 Dirvožemių ėminių ėmimas ir analizė****1.7.2.1 *Dirvožemio ėminių ėmimo grafikas***

Jei bandomos agrocheminės medžiagos, dirvožemio ėminiai gliukozės sukeliama 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 sukeliama 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 EB_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 sukeliama kvėpavimo greičio matavimas*

Gliukozės sukeliama 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, darant 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 švriu 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 suminis 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 kriterijų, 5 % reikšmingumo lygmuo). Gliukozės sukeliama 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.

▼B

Jei bandomos ne agrocheminės medžiagos, nustatomas kiekviename kartotiniame ėminyje išsiskyrusio anglies dioksido arba suvartoto deguonies kiekis, ir EB_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 EB_x vertėms apskaičiuoti taikomos statistinės metodikos. Be to, taikant tipines metodikas (15) (16) (17), nustatomi apskaičiuotos EB_x vertės pasikliautiniai rėžiai ($p = 0,95$).

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 virsmui dirvožemiuose. Kai įvertinami kitų nei agrocheminės medžiagos cheminių medžiagų bandymo rezultatai, naudojamos EB_{50} , EB_{25} ir (arba) EB_{10} vertės.

3. ATASKAITOS RENGIMAS

BANDYMŲ ATASKAITA

Bandymų 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 talpą (mmol/kg),
- pradinę mikrobine biomase, išreikštą suminio organinės anglies kiekio procentine dalimi,
- metodų, taikytų kiekvienam parametrai nustatyti, nuorodas,
- visą informaciją apie dirvožemio ėminių ėmimą ir laikymą,
- visą informaciją apie pradinio dirvožemio inkubavimą, jei daromas.

▼B

Bandomoji medžiaga:

- fizikinė būseną ir, jei tinka, fizikocheminės 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 darant,
- taikytas dirvožemio inkubavimo metodas (t. y. kaip vientisas ėminys arba kaip eilė 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 sukeliama kvėpavimo greičio nuokrypis kiekvieną kartą imant mėginį, arba, jei tinka, EB_{50} vertė esant 95 procentų pasikliautinajam režimui, kitos EB_x vertės (t. y. EB_{25} arba EB_{10}) ir pasikliautiniai režiai, dozės ir reakcijos santykio kreivės grafikas,
- statistinis rezultatų apdorojimas, jei tinka,
- visa informacija ir stebėjimai, 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.

▼ **B**

- 4) SET AC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.
- 5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- 6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- 7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in „Pesticide Effects on Soil Microflora“. Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45-60.
- 8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in „Methods of Soil Analysis – Part 2: Chemical and Microbiological Properties“. Agronomy Monograph N° 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831- 871.
- 9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality – Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.
- 10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- 11) Heinemeyer, 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). Einfluß 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. Ther., 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.

▼B**C.23. AEROBINIS IR ANAEROBINIS VIRSMAS DIRVOŽEMYJE****1. METODAS**

Šis bandymų metodas atitinka OECD TG 307 (2002)

1.1 ĮVADAS

Šis bandymų metodas pagrįstas esamomis rekomendacijomis (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Šiame bandymų metode aprašytas metodas skirtas cheminių medžiagų aerobiniam ir anaerobiniam virsmui dirvožemyje įvertinti. Bandymai yra daromi siekiant nustatyti: i) bandomosios medžiagos virsmo greitį ir ii) virsmo 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). Virsmo greitis turėtų būti įvertinamas bent trims papildomiems dirvožemio tipams (8) (10).

Belgirate, Italijoje, 1995 m. vykusiam 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 sistema) (FAO sistema). Be to, seminare buvo pateiktos dirvožemio ėminių ėmimo, tvarkymo ir laikymo rekomendacijos, pagrįstos ISO vadovu (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).

Virsmo produktai – visos medžiagos, susidarančios vykstant bandomosios medžiagos biotinio arba abiotinio virsmo reakcijoms, įskaitant CO₂ ir surištuosius likučius.

Surištieji likučiai – dirvožemyje, augale arba gyvūne esantys junginiai, kurie po ekstrahavimo lieka matricoje pradinės medžiagos arba jos metabolito (-ų) ar virsmo 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 šiandien yra identifikuotos kovalentinės, joninės ir sorbcinio tipo jungtys, be to, pagautieji junginiai. Apskritai, surišųjų likučių susidarymas labai mažina biologinį įsisavinamumą ir biologinį kaupimąsi (12) [modifikuotas IUPAC 1984 (13) apibrėžimas].

Aerobinis virsmas – reakcijos, vykstančios esant molekuliniam deguoniui (14).

▼B

Anaerobinis virsmas – 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) nepalietą, koks susidaro per laiką, esantį tipiškuose įvairių dirvožemio tipų sluoksniuose;
- b) palietą, koks jis paprastai yra ariamuose laukuose arba koks jis imamas kasant ir panaudojamas šiame bandymų 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 $^{14}\text{CO}_2$ kiekiui (14).

Pusėjimo trukmė: $t_{0,5}$, laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 50 %, kai virsmui aprašyti tinka pirmojo laipsnio kinetika; ji nepriklauso nuo koncentracijos.

DT₅₀ (išnykimo trukmė 50): laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 50 %; ši trukmė ir pusėjimo trukmė $t_{0,5}$ skiriasi, kai virsmas neatitinka pirmojo laipsnio kinetikos.

DT₇₅ (išnykimo trukmė 75): laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 75 %.

DT₉₀ (išnykimo trukmė 90): laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 90 %.

1.3 ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Etaloninės medžiagos naudojamos, jei virsmo produktams apibūdinti ir (arba) identifikuoti taikomi spektroskopiniai ir chromatografijos metodai.

1.4 BANDYMO TINKAMUMAS

Metodas tinka visoms cheminėms medžiagoms (nepažymėtoms arba pažymėtoms kaip radioktyvios), 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.

▼B**1.5 INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ**

Virsmo greičiui matuoti gali būti naudojama pažymėtoji arba žymėtoji bandomoji medžiaga. Žymėtoji medžiaga reikalinga virsmo keliui tirti ir masių balansui nustatyti. Rekomenduojama žymėti ^{14}C , bet gali būti naudingi kiti izotopai, pvz., ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P . Kiek tai įmanoma, žymėtasis atomas turi būti patvariausioje (-iose) molekulės dalyje (-yse) ⁽¹⁾. Bandomosios medžiagos grynumas turi būti mažiausiai 95 %.

Prieš pradedant daryti aerobinio ir anaerobinio virsmo 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 rekomendacija 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 virsmo produktams identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti.

1.6 BANDYMO METODO ESMĖ

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 virsmo produktams nustatyti. Be to, naudojant atitinkamus absorbcijos įtaisus, renkami ir analizuojami lakieji produktai. Naudojant ^{14}C žymėtą medžiagą ir surenkant išsiskyrusį $^{14}\text{CO}_2$, 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 žymėtoju atomu likimui įvertinti ir atitinkamai informacijai apie virsmo produktą susidarymą gauti.

▼B**1.7.2 Analizės metodo pakartojamumas ir jautris**

Bandomosios medžiagos ir virsmo produktų kiekybinės analizės metodo pakartojamumas (išskyrus pradinį ekstrahavimo efektyvumą) gali būti patikrintas darant kartotinę to paties dirvožemio, inkubuoto pakankamai ilgai, kad galėtų susidaryti virsmo produktai, ekstrakto analizę.

Bandomosios medžiagos ir virsmo produktų analizės metodo aptikimo riba (LOD) turi būti mažiausiai $0,01 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ dirvožemio (kaip bandomosios medžiagos) arba 1 % įterpiamos dozės, imant mažesniąją vertę. Turi būti apibrėžta kiekybinio nustatymo riba (LOQ).

1.7.3 Virsmo duomenų tikslumas

Darant bandomosios medžiagos koncentracijos verčių kaip laiko funkcijos regresinę analizę gaunama atitinkama informacija apie virsmo kreivės patikimumą ir leidžia apskaičiuoti pusėjimo trukmės verčių pasikliautuosius rėžius (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 detektavimo 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 grįžtamoju šaldytuvu),
- įranga tirpalams ir ekstraktams koncentruoti (pvz., sukamasis garintuvas),
- vandens vonia,
- mechaninio maišymo įtaisas (pvz., tešlos maišytuvas, sukamasis maišytuvas).

▼ B

Naudojami cheminiai reagentai, pvz.:

- NaOH, analiziškai grynas, 2 mol x dm⁻³, arba kitas tinkamas šarmas (pvz., KOH, etanolaminas),
- H₂SO₄, analiziškai gryna, 0,05 mol x dm⁻³,
- etilenglikolis, analiziškai grynas,
- kietosios sugeriančios medžiagos, pvz., natrio kalkės ir poliuretano kamščiai,
- organiniai tirpikliai, analiziškai grynai, 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 dumbly 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*

Virsmo keliui nustatyti galima naudoti tipinį dirvožemį; rekomenduojama naudoti smėlingą priemolį, dulkišką priemolį, priemolį arba priesmėlį [pagal FAO ir USD A klasifikaciją (18)], kurio pH vertė 5,5–8,0, organinės anglies kiekis 0,5–2,5 % ir mikrobinė biomasė sudaro bent 1 % suminės organinės anglies (10).

Virsmo 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).

▼ **B**

Visi dirvožemiai apibūdinami, nurodant bent tekstūrą (% smėlio, % dumblo, % molio) [pagal FAO ir USDA klasifikaciją (18)], pH, katijonų mainų talpą, organinės anglies kiekį, piltinį tankį, vandens sulaikymo charakteristikas ⁽¹⁾ ir mikrobine biomasę (tik aerobiniams tyrimams). Rezultatams interpretuoti gali būti naudinga papildoma informacija apie dirvožemio savybes. Dirvožemio charakteristikoms nustatyti gali būti taikomi metodai, rekomenduojami nuorodose (19)(20)(21)(22)(23). Mikrobine biomasė turi būti nustatoma taikant substrato sukeliama 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 virsmo 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 (ilgiau 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 didesniai 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 sijoj ant dirvožemį per 2 mm sieta, ant kurio lieka maži akmenys, fauna ir augalų likučiai. Prieš sijoj ant reikia vengti per didelio dirvožemio džiūvimo ir smulkinimo (15).

Kai žiemą imti ėminius lauke sunku (dirvožemis išala 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⁾ Išsamios instrukcijos, kaip imti, tvarkyti ir laikyti biologinio virsmo bandymams skirtus dirvožemių ėminius, pateiktos (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 priede. Bandymų ataskaitoje turi būti nurodyta, ar dirvožemių vandens sulaikymo charakteristikos ir piltiniai tankiai buvo matuojami nepalietuose lauko ėminiuose, ar palietuose (apdorotuose) ėminiuose.

⁽²⁾ Naujų tyrimų rezultatai rodo, kad vidutinio klimato zonų dirvožemiai irgi gali būti laikomi esant minus 20 °C ilgiau kaip tris mėnesius (28)(29) ir per daug neprarasti mikrobino aktyvumo.

▼B

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 EIGA

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), inkubuojami papildomi dirvožemio ėminiai esant žemesnei temperatūrai (pvz., 10 ± 2 °C).

1.9.1.2 *Drėgmės kiekis*

Darant virsmo 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) virsmo produktų nuostolių dėl garavimo ir (arba) fotodestrukcijos (jei vyksta) arba jie būtų kiek įmanoma sumažinti.

Darant virsmo bandymus anaerobinėmis ir ryžių lauko sąlygomis, dirvožemis yra prisotintas 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 virsmo 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 priede.

▼ **B**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⁾ Bandymų 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*

Virsmui 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 virsmo tyrimus būtinas mažiausiai dviejų savaitių pradinio inkubavimo laikotarpis (žr. 1.8.3.2 skirsnį).

1.9.1.7 *Bandymo trukmė*

Virsmo greičio ir kelio tyrimai paprastai neturėtų trukti ilgiau kaip 120 parų ⁽²⁾ (3) (6) (8), kadangi po šio termino tikėtinas dirvožemio mikrobino aktyvumo mažėjimas dirbtinėje, nuo natūralaus papildymo atskirtoje laboratorinėje sistemoje. Jei būtina apibūdinti bandomosios medžiagos išnykimą ir pagrindinių virsmo produktų susidarymą ir išnykimą, tyrimai gali būti tęsiami ilgesnį laiką (pvz., 6 arba 12 mėnesių) (8). Ilgesni inkubavimo laikotarpiai turi būti pagrįsti bandymų ataskaitoje, be to, papildyti biomasės matavimais šiais laikotarpiais ir jiems pasibaigus.

1.9.2 **Bandymo eiga**

Maždaug 50–200 g dirvožemio (kaip sauso dirvožemio) dedama į kiekvieną inkubavimo kolbą (žr. 3 priedo 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 % CO_2 .

▼ B

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 dumbliu, 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 virsmo 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 j am 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 pratęjimo sąlygomis sistemos, aprašytos 1 paveiksle, arba uždaromos, naudojant 2 paveiksle pavaizduotą sugėrimo kolonėlę (žr. 3 priedą).

⁽¹⁾ Pradinė koncentracija pagal plotą apskaičiuojama taikant šią lygtį:

$$C_{\text{soil}} [\text{mg/kg}_{\text{soil}}] = \frac{A [\text{kg/ha}] \cdot 10^6 [\text{mg/kg}]}{l [\text{m}] \cdot 10^4 [\text{m}^2/\text{ha}] \cdot d [\text{kg}_{\text{soil}}/\text{m}^3]}$$

C_{soil} = pradinė koncentracija dirvožemyje [$\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$]

A = įterpimo norma [$\text{kg} \times \text{ha}^{-1}$]; l = lauko dirvožemio sluoksnio storis [m]; d = sauso dirvožemio piltinis tankis [$\text{kg} \times \text{m}^{-3}$].

Paprastai, esant $1 \text{ kg} \times \text{ha}^{-1}$ įterpimo normai, koncentracija 10 cm dirvožemio sluoksnyje maždaug lygi $1 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ (darant prielaidą, kad piltinis tankis yra lygus $1 \text{ g} \times \text{cm}^{-3}$).

▼B**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) virsmo produktams nustatyti. Darant gerai suplanuotą tyrimą, naudojamas pakankamas kolbų skaičius, kad kiekvienam mėginio ėmimui būtų galima paauginti 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 daroma 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 virsmo produktų susidarymo bei išnykimo kreives (pvz., 0, 1, 3, 7 para (-os); 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 virsmo 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 virsmo produktų virsmo 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 takiają terpę.

2. DUOMENYS**2.1 REZULTATŲ APDOROJIMAS**

Bandomosios medžiagos, virsmo produktų, lakiųjų medžiagų (tik %) ir neekstrahuojamų medžiagų kiekiai pateikiami kaip pradinės koncentracijos procentinė dalis ir, jei tinka, $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ dirvožemio (sausosios 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 virsmo pusėjimo trukmę arba DT_{50} . Turi būti identifikuoti pagrindiniai virsmo produktai ir brėžiamas jų koncentracijos verčių kitimo laike grafikas susidarymo ir išnykimo greičiams parodyti. Pagrindiniu virsmo 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 virsmo produktų lakumą.

▼B

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 determinacijos koeficientu (r^2). Geriau taikyti pirmojo laipsnio kinetiką, išskyrus kai $r^2 < 0,7$. Be to, jei reikia, atliekami pagrindinių virsmo produktų apskaičiavimai. Atitinkami modelių pavyzdžiai aprašyti 31–35 nuorodose.

Darant virsmo greičio tyrimus, esant įvairioms temperatūros vertėms, virsmo greičiai turi būti aprašyti kaip temperatūros funkcija bandymo temperatūros verčių intervale, taikant tokią Arenijaus lygtį:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or } \ln k = \ln A - \frac{B}{T}$$

kurioje $\ln A$ ir B yra regresijos tiesės, gautos naudojant tiesinę $\ln k$ kaip $1/T$ 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 virsmą valdo mikrobų veikimas.

2.2 REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR INTERPRETAVIMAS

Nors tyrimas daromas dirbtinėje laboratorinėje sistemoje, rezultatai leis įvertinti bandomosios medžiagos virsmo greitį ir virsmo produktų susidarymo bei išnykimo greitį lauko sąlygomis (36)(37).

Bandomosios medžiagos virsmo kelio tyrimas suteikia informacijos apie tai, kaip dirvožemyje pasikeičia įterptosios medžiagos struktūra, vykstant cheminėms ir mikrobinėms reakcijoms.

3. ATASKAITOS RENGIMAS

BANDYMO ATASKAITA

Bandymų ataskaitoje turi būti ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

- įprastas pavadinimas, cheminis pavadinimas, CAS numeris, struktūrinė formulė (rodanti žymėtojo (-ų) atomo (-ų) padėtį, jei naudojama žymėtoji medžiaga) ir atitinkamos fizikocheminės savybės (žr. 1.5 skirsnį),
- bandomosios medžiagos grynumas (priemaišos),
- radiocheminis žymėtosios cheminės medžiagos grynumas ir savi-tasis aktyvumas (jei tinka).

Etaloninės medžiagos:

- etaloninių medžiagų, naudojamų virsmo produktui apibūdinti ir (arba) identifikuoti, cheminis pavadinimas ir struktūra.

Bandomi dirvožemiai:

- ėmimo vietos detalės,
- dirvožemių ėmimo data ir metodika,

▼B

— dirvožemių savybės, pvz., pH vertė, organinės anglies kiekis, tekstūra (% smėlio, % dulkių, % molio), katijonų mainų talpa, piltinis 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 virsmo 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 jautris,

— 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 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ dirvožemio (sausio 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 virsmo produktų koncentracijos dirvožemyje kaip laiko funkcijos kreivės,

— bandomosios medžiagos ir, jei tinka, pagrindinių virsmo produktų pusėjimo arba DT_{50} , DT_{75} ir DT_{90} vertės, įskaitant pasikliautinuosius rėžius,

▼B

- abiotinio skilimo steriliomis sąlygomis greičio įvertis,
- bandomosios medžiagos ir, jei tinka, pagrindinių virsmo produktų virsmo kinetikos įvertinimas,
- pasiūlyti virsmo keliai, jei tinka,
- rezultatų aptarimas ir aiškinimas,
- neapdoroti duomenys (t. y. ėminių chromatogramos, virsmo greičio apskaičiavimų pavyzdžiai ir virsmo produktams identifiikuoti 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 (EU) (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 für die amtliche Prüfung 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)

▼B

- 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. Keeney, 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., Sjö Dahl-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.

▼B

- 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.



I priedėlis

VANDENS ĮTEMPIS (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 × 10 ⁴	4,2	16	Augalų vytinimo drėgmės vertė
10 ⁴	4	10	
10 ³	3	1	
6 × 10 ²	2,8	0,6	
3,3 × 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	Vandenių prisotintas dirvožemis

^(a) pF = vandens stulpelio aukščio, išreikšto cm, logaritmas.
^(b) 1 bar = 10⁵ Pa.
^(c) Atitinka apytikrų 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 įtempis 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 apibūdinamas kaip vandens kiekis, kurį veikiant sunkio jėgai gali sulaikyti natūralus dirvožemis 2 paras po ilgesnio lietaus laikotarpio arba po pakankamo drėkinimo. Jis nustatomas nepalietam dirvožemiui in situ lauke. Taigi matavimas netaikomas paliesto dirvožemio laboratoriniams ėminiams. FC vertės, nustatytos palietam dirvožemiui, gali turėti didelių sistemingų nuokrypių.

Vandens sulaikymo geba (WHC) nustatoma laboratorijoje nepalietam ir palietam dirvožemiui, dirvožemį kolonėlėje sotinant kapiliarais kylančiu vandeniu. Ji yra ypač naudinga apibūžiant palietą 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.

▼ B

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 laikymo geba (WHC – Water Holding Capacity)

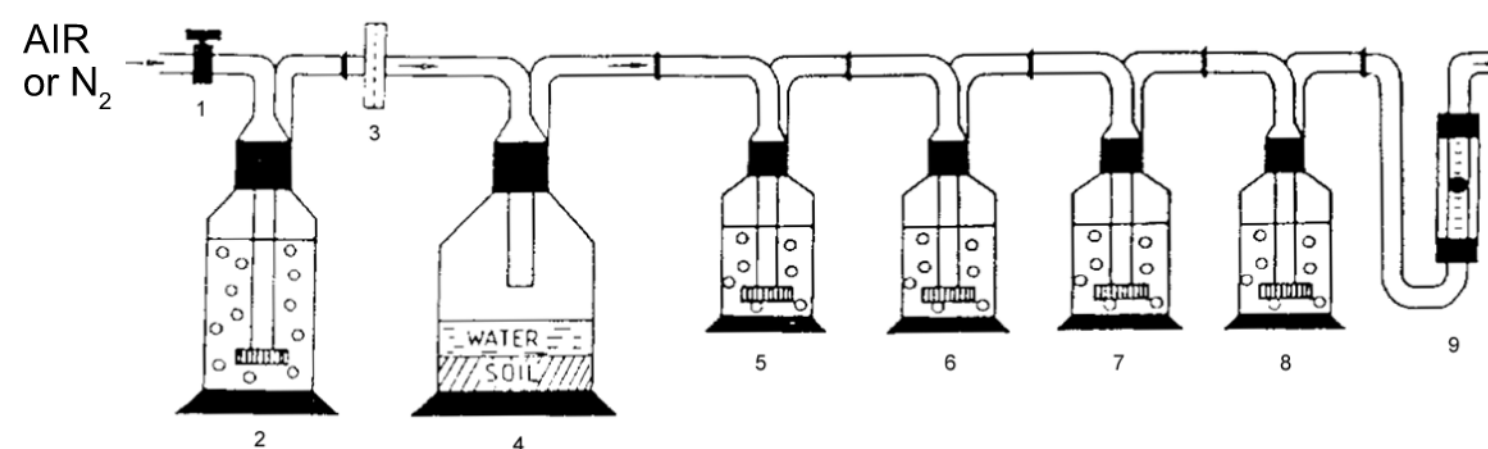
▼ **B**

3 priedėlis

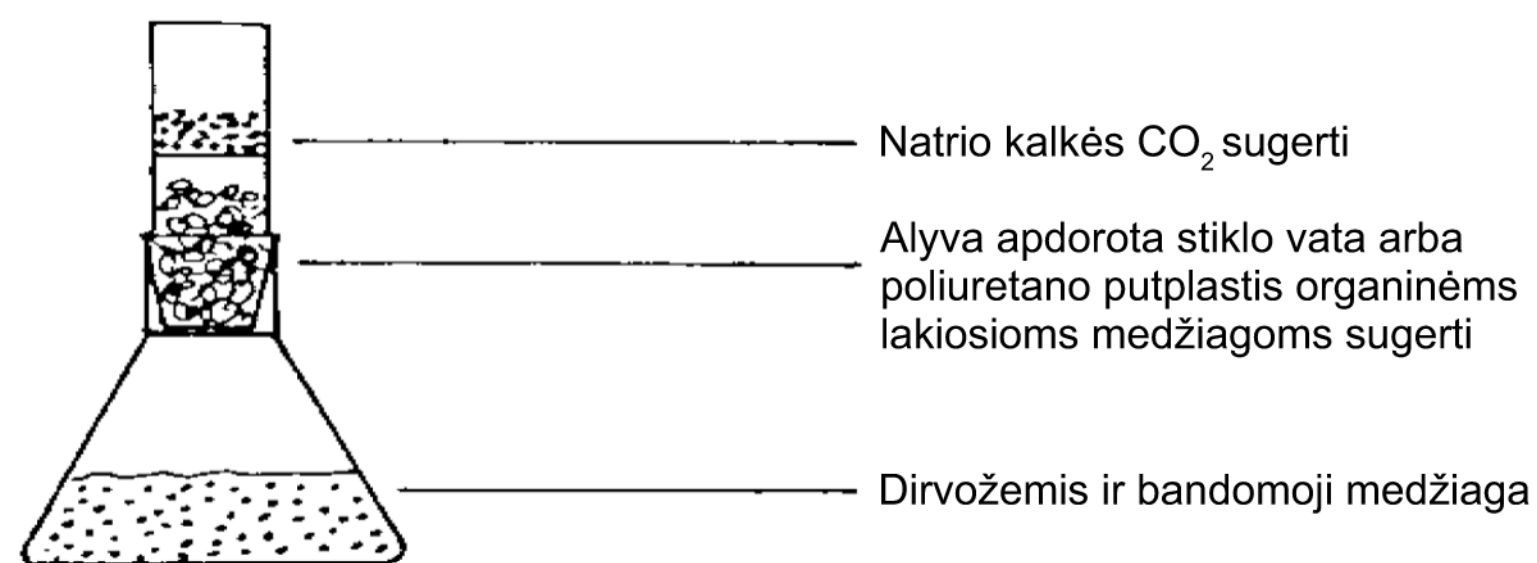
1 paveikslas

Pratekėjimo aparato cheminių medžiagų virsmui dirvožemyje tirti pavyzdys ⁽¹⁾ ⁽²⁾

1: adatinis vožtuvas	4: medžiagų apykaitos dirvožemyje kolba (vandens įpilama tik anaerobinių ir ryžių laukų dirvožemio sąlygomis)	6: lakiųjų šarminių junginių gaudyklė, užpildyta sieros rūgštimi
2: barboteris su vandeniu		7, 8: CO ₂ ir kitų rūgštinių medžiagų gaudyklė, užpildyta natrio šarmu
3: ultrafiltravimo membrana (tik taikant sterilias sąlygas), akučių dydis 0,2 μm	5: lakiųjų organinių junginių gaudyklė, užpildyta etilenglikoliu	9: srautmatys.



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.

▼B**C.24. AEROBINIS IR ANAEROBINIS VIRSMAS VANDENS TELKINIŲ DUGNO NUOSĖDŲ SISTEMOSE****1. METODAS**

Šis bandymų metodas atitinka OECD TG 308 (2002).

1.1 ĮVADAS

Cheminės medžiagos gali patekti į negilius arba gilius paviršinius vandenį pvz., šiais būdais: tiesioginio pridėjimo, purškiamų medžiagų sklaidos, nuotėkio, drenažo, atliekų šalinimo, pramoninių, buitinių arba žemės ūkio nuotekų ir nusėdimo iš atmosferos. Šiame bandymų metode aprašytas laboratorinis metodas skirtas įvertinti organinių cheminių medžiagų aerobinį ir anaerobinį virsmą 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 uolienu 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 vadovu (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. Darant aerobinį bandymą, modeliuojamas aerobinio vandens stulpas virš aerobinių nuosėdų, po kuriomis yra sluoksnis su anaerobinių sąlygų gradientu. Darant anaerobinį bandymą modeliuojama visiškai anaerobinė vandens ir nuosėdų sistema. Jei aplinkybės rodo, kad būtina labai nukrypti nuo šių rekomendacijų, pvz., naudojant nepalietų nuosėdų kernus arba nuosėdas, kurios galėjo būti veikiamos bandomąja medžiaga, šiam tikslui yra kiti skirti metodai (9).

1.1 APIBRĖŽTYS

Visai atvejais turi būti naudojami tarptautinės vienetų sistemos (SI) vienetai.

Bandomoji medžiaga – bet kuri medžiaga (tai gali būti pradinis junginys ar medžiagos virsmo produktai)

Virsmo produktai – visos medžiagos, susidarančios vykstant bandomosios medžiagos biotinio arba abiotinio virsmo reakcijoms, įskaitant CO₂ ir surištuosiuos likučius.

Surištieji likučiai – dirvožemyje, augale arba gyvūne esantys junginiai, kurie po ekstrahavimo lieka matricoje pradinės medžiagos arba jos metabolito (-ų) pavidalu. Ekstrahavimo metodas iš esmės turi nekeisti pačių junginių arba matricos struktūros. Ryšio prigimtį galima iš dalies išaiškinti, taikant matricą keičiančius ekstrahavimo metodus ir sudėtingus analizės metodus. Pvz., tokiu būdu šiandien yra identifikuotos kovalentinės, joninės ir sorbcinio tipo jungtys, be to, pagautieji junginiai. Apskritai, surištuųjų likučių susidarymas labai mažina biologinį įsisavinamumą ir biologinį kaupimąsi (10) [modifikuotas IUPAC 1984 (11) apibrėžimas].

▼ B

Aerobinis virsmas (oksidavimas) –: reakcijos, vykstančios esant molekuliniam deguoniui (12).

Anaerobinis virsmas (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 $^{14}\text{CO}_2$ arba $^{14}\text{CH}_4$ kiekiui.

Pusėjimo trukmė – $t_{0,5}$, laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 50 %, kai virsmui aprašyti tinka pirmojo laipsnio kinetika; ji nepriklauso nuo pradinės koncentracijos.

DT₅₀ (išnykimo trukmė 50) – laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 50 %.

DT₇₅ (išnykimo trukmė 75) – laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 75 %.

DT₉₀ (išnykimo trukmė 90) – laikas, per kurį bandomosios medžiagos koncentracija sumažėja 90 %.

1.3 ETALONINĖS MEDŽIAGOS

Etaloninės medžiagos naudojamos, jei virsmo produktams identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti taikomi spektroskopiniai ir chromatografijos metodai.

1.4 INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

Virsmo greičiui matuoti gali būti naudojama nežymėtoji arba žymėtųjų atomų turinti bandomoji medžiaga, bet geriau naudoti žymėtąją medžiagą. Žymėtoji medžiaga reikalinga virsmo keliui tirti ir masių balansui nustatyti. Rekomenduojama žymėti ^{14}C , bet gali būti naudingi kiti izotopai, pvz., ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{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 daryti 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 žymėtoju atomu likimui įvertinti ir atitinkamai informacijai apie virsmo produktų susidarymą gauti.

▼B

- 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 rekomendacija 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 toksišką poveikį mikroorganizmams, duomenys apie lengvą ir (arba) būdingą biologinį skaidumą, duomenys apie aerobinį arba anaerobinį virsmą dirvožemyje.

Reikia turėti analizės metodus (įskaitant ekstrahavimo ir gryninimo metodus) bandomajai medžiagai ir jos virsmo vandenyje bei nuosėdose produktams identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti (žr. 1.7.2 skirsnį).

1.5 BANDYMO METODO ESMĖ

Pagal šiame bandyme aprašytą metodą naudojamos aerobinė ir anaerobinė vandeninių nuosėdų (žr. 1 priedėlį) sistema, kurioje galima:

- i) matuoti bandomosios medžiagos virsmo vandens ir nuosėdų sistemoje greitį,
- ii) matuoti bandomosios medžiagos virsmo nuosėdose greitį,
- iii) matuoti bandomosios medžiagos ir (arba) virsmo produktų mineralizacijos greitį (kai naudojama ^{14}C žymėtoji bandomoji medžiaga),
- iv) identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti virsmo vandeninėje ir nuosėdų fazėse produktus, įskaitant masių balansą (kai naudojama žymėtoji bandomoji medžiaga),
- v) matuoti bandomosios medžiagos ir jos virsmo 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.

▼B**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, neleriškantiems, 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 virsmui 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 ėtarpimo 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 virsmo produktų kiekybinės analizės metodo pakartojamumas (išskyrus pradinį ekstrahavimo efektyvumą) gali būti patikrintas darant kartotinę to paties vandens arba nuosėdų ėminių, inkubuotų pakankamai ilgai, kad galėtų susidaryti virsmo produktai, ekstrakto analizę.

Bandomosios medžiagos ir virsmo produktų analizės metodo radimo riba (LOD) turi būti mažiausiai $0,01 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ 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 Virsmo duomenų tikslumas

Darant bandomosios medžiagos koncentracijos verčių kaip laiko funkcijos regresinę analizę gaunama atitinkama informacija apie virsmo kreivės tikslumą ir leidžia apskaičiuoti pusėjimo trukmės verčių pasikliautuosius rėžius (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:

▼B

- nustatyti stiklu sorbuotos bandomosios medžiagos ir virsmo 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 įdėti; jei naudojamas antrasis tirpiklis, jame neturi vykti bandomosios medžiagos solvolizė.

Tipinės bandymo aparatūros pavyzdžiai, t. y. dujų pratekėjimo ir biometrinio tipo sistemos, pavaizduoti 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 CO₂ 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). Darant aerobinių bandymą reikia reguliariai keisti laisvojoje erdvėje esančias dujas biomasės suvartotam deguoniui kompensuoti.

Tinkamos priemonės lakiems virsmo produktams sugerti, kurių gali būti ir daugiau, yra 1 mol x dm⁻³ kalio arba natrio hidroksido tirpalas anglies dioksidui sugerti ⁽¹⁾ ir etilenglikolis, etanolaminas arba 2 % parafino ksilene tirpalas organiniams junginiams sugerti. Anaerobi-nėmis sąlygomis susidariusius lakiuosius produktus, pvz., metaną, galima rinkti, pvz., molekuliniais sietais. Tokie lakieji produktai gali būti sudeginti, pvz., iki CO₂, leidžiant dujas CuO užpildytu kvarciniu vamzdeliu, kaitinamu iki 900 °C temperatūros, o susida-riusį CO₂ sugerti absorberioje šarmo tirpalu (17).

Reikia turėti laboratorinius bandomosios medžiagos ir virsmo produktų analizės prietaisus (pvz., dujų ir skysčių chromatografijos (GLC), efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC), plonas-luoksnės chromatografijos (TLC), masių spektroskopijos (MS), dujų chromatografijos-masių spektroskopijos (GC-MS), skysčių chromatografijos-masių spektroskopijos (LC-MS), magnetinio bran-duolių rezonanso (MBR) ir t. t. įrangą), atitinkamas detektavimo sistemas žymėtosioms arba nežymėtosioms medžiagoms analizuoti. Be to, reikia turėti skysčių scintiliacinį skaitiklį ir oksidacinio sude-ginimo aparatūrą (nuosėdų ėminiams sudeginti prieš radioaktyvumo analizę) žymėtosioms medžiagoms analizuoti.

Būtina turėti kita tipinę laboratorinę įrangą fizikocheminei ir biolo-ginei analizei daryti (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 būtų išvengta soties, taigi absorbcijos gebos praradimo

▼B**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 daryti 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 virsmas 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: kationų mainų talpą, vandens sulaikymo gebą, karbonatų kiekį, suminį 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 virsmo atveju.

⁽¹⁾ [Molis + dumblas] yra mineralinė dalis nuosėdų, kurių dalelių dydis < 50 µm



B

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
Suminė 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 suminio 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 suminio N bei suminio 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 vadovo 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. Darant 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).

▼ **B**1.8.3.2 *Tvarkymas*

Nuosėdos atskiriamos nuo vandens filtravimu ir šlapios sijoamos per 2 mm sieta, 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 sijoamos, kaip pirmiau aprašyta, užpilamos vandeniu (6-10 cm vandens sluoksniu) ir laikomos kartu su juo tamsoje ne ilgiau kaip 4 savaites, esant 4 ± 2 °C⁴ [13] (7) (8) (23). Ėminiai, skirti aerobiniams tyrimams, turi būti laikomi leidžiant laisvai patekti orui (pvz., atviruose induose), ėminiai, skirti 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 savaitių, bet neturi būti ilgesnis kaip keturios savaitės. Ataskaitoje turi būti pateikti šiuo laikotarpiu daromų matavimų rezultatai.

1.9 **BANDYMO EIGA**1.9.1 **Bandymo sąlygos**

Bandymas turi būti daromas inkubavimo aparate (žr. 1.8.1 skirsnį), esant vandens ir nuosėdų tūrio santykiui nuo 3: 1 iki 4: 1, ir 2,5 cm ($\pm 0,5$ cm) nuosėdų sluoksnio storiui. ⁽¹⁾ Rekomenduojama naudoti ne mažiau kaip 50 g nuosėdų (skaičiuojant sausai medžiagai) vienam inkubavimo indui.

Bandymas turi būti daromas 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.

▼B

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 virsmo kelią ir virsmo 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 virsmo 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 vandeningą fazę kaip vandeninį tirpalą. Jei kitaip neįmanoma, bandomajai medžiagai įpilti ir paskirstyti leidžiama naudoti nedidelius kiekius su vandeniu maišų tirpiklių (pvz., acetono, etanolio), tačiau jie neturi sudaryti daugiau kaip 1 % V/V ir neturi neigiamai veikti bandymo sistemos mikrobino aktyvumo. Bandomosios medžiagos vandeninius tirpalus reikia ruošti kruopščiai, visiškai vienalytiškumui užtikrinti gali būti naudinga naudoti generavimo kolonėles ir išankstinį maišymą. Po vandeninio tirpalo įpylimo į bandymo sistemą vandeningą fazę rekomenduojama nestipriai maišyti, stengiantis kiek įmanoma mažiau liesti nuosėdas.

Preparatų paprastai nerekomenduojama naudoti, nes preparato ingredientai gali veikti bandomosios medžiagos ir (arba) virsmo 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 suminiam organinės anglies kiekiui nustatyti tyrimo pabaigoje. Du iš kontrolinių įrenginių (t. y. po vieną kontrolinį įrenginį kiekvienoms vandeninėms nuosėdoms) gali būti naudojami reikiams nuosėdų ir vandens parametrų 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 budais, kai dėl to gaunamos labai skirtingos koncentracijos vertės, gali būti naudingas bandymas naudojant antrą koncentraciją, jei mažesniąją koncentraciją galima nustatyti pakankamai tiksliai.

▼B**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 išsiklaido virsmo 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 daryti. Nuosėdos ir virš jų esantis vanduo analizuojami atskirai ⁽¹⁾. Paviršinis vanduo atsargiai nupilamas, kiek įmanoma mažiau liečiant nuosėdas. Bandomosios medžiagos ir virsmo 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 daryti išankstinį bandymą, kuris turi būti daromas tomis pačiomis bandymo sąlygomis, kurios yra numatytos galutiniam tyrimui. Ataskaitoje turi būti trumpai nurodytos išankstinio bandymo, jei daromas, sąlygos ir rezultatai.

1.9.5 Matavimai ir analizė

Kiekvieną kartą imant mėginį matuojama ir ataskaitoje nurodoma bandomosios medžiagos ir virsmo produktų koncentracija vandenyje ir nuosėdose (kaip koncentracija ir įdėto kiekio procentinė dalis). Paprastai galioja taisyklė, kad virsmo produktai, kurių randama > 10 % nuo suminio vandens ir nuosėdų sistemos pradinio radioaktyvumo, turi būti identifikuoti, išskyrus kai galima pagrįsti, kad tai neįmanoma. Be to, turi būti identifikuoti virsmo 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 (CO₂ 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 produktą pakartotinis oksidavimas, imant mėginius ir analizuojant turi būti užtikrinamos anaerobinės sąlygos.

▼B**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 pasikliautinusius režius (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 virsmo 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. ATASKAITOS RENGIMAS**3.1 BANDYMŲ ATASKAITA**

Bandymų ataskaitoje turi būti ši informacija:

Bandomoji medžiaga:

— įprastas pavadinimas, cheminis pavadinimas, CAS numeris, struktūrinė formulė (rodanti žymėtojo (-ų) atomo (-ų) padėtį, jei naudojama žymėtoji medžiaga) ir atitinkamos fizikocheminės savybės,

— bandomosios medžiagos grynumas (priemaišos),

— radiocheminis žymėtosios cheminės medžiagos grynumas ir molinis aktyvumas (jei tinka).

▼B

Etaloninės medžiagos:

- etaloninių medžiagų, naudojamų virsmo produktams apibūdinti ir (arba) identifikuoti, cheminis pavadinimas ir struktūra

Bandomos 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, biometrinę, 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 radimo ribos,
- virsmo produktų apibūdinimo ar identifikavimo metodai,
- nukrypimai bandymo 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 jautris,
- regeneravimo laipsnio vertės (tinkamu patvirtinto tyrimo % vertės yra pateiktos 1.7.1 skirsnyje),
- bandomosios medžiagos ir, jei tinka, virsmo produktų ir neekstrahuojamo radioaktyvumo rezultatų, išreiškiamų kaip naudotos dozės % ir $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$, gautų vandenyje, nuosėdose ir visoje sistemoje (tik %), lentelės,
- masių balansas tyrimų eigoje ir juos užbaigus,
- virsmo vandens bei nuosėdų dalyse ir visoje sistemoje (įskaitant mineralizaciją) grafinis vaizdas,
- mineralizacijos greičio vertės,

▼B

- bandomosios medžiagos ir, jei tinka, pagrindinių virsmo produktų virsmo vandenyje, nuosėdose ir visoje sistemoje pusėjimo arba DT_{50} , ir, jei tinka DT_{75} ir DT_{90} vertės, įskaitant pasikliautinusius režius,
- bandomosios medžiagos ir, jei tinka, pagrindinių virsmo produktų virsmo kinetikos įvertinimas,
- pasiūlytas virsmo 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.

▼ **B**

- 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 ¹⁴C-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. Chemosphere 27, 1499-1509.

▼B

- 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.

*1 priedelis***NURODYMAI DĖL AEROBINIŲ IR ANAEROBINIŲ BANDYMO SISTEMŲ****Aerobinė bandymų sistema**

Šiame bandymo metode aprašytą aerobinę bandymo sistemą sudaro aerobinis vandens slupksnis (tipinė deguonies koncentracijos verčių intervalas nuo 7 iki 10 mg x l⁻¹) ir nuosėdų sluoksniu, 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

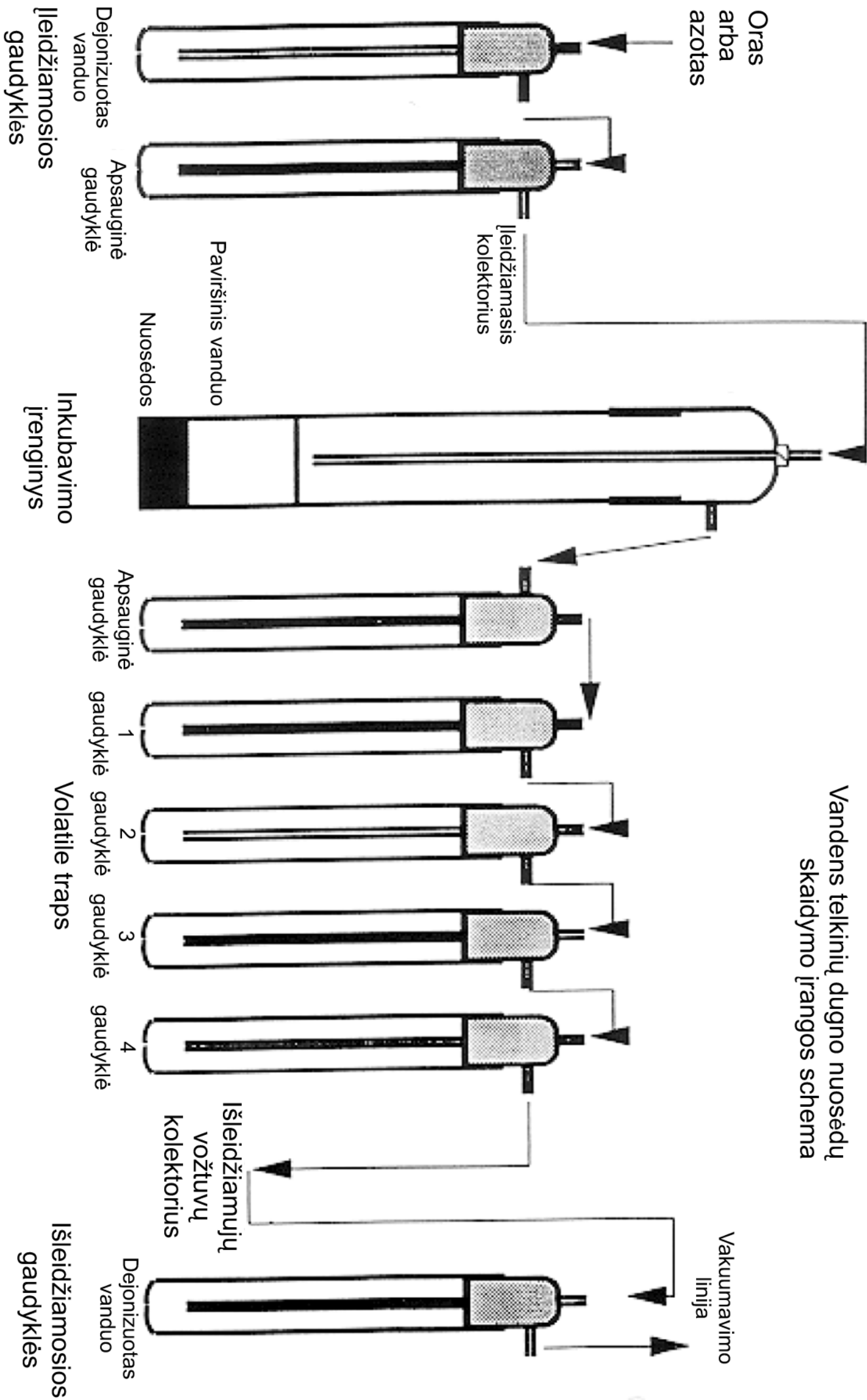
Bandymo naudojant anaerobinę bandymo sistemą metodika iš esmės atitinka metodiką, aprašytą aerobinei sistemai, išskyrus tai, kad vandens paviršiaus leidžiamas drėgnas azotas kiekviename inkubavimo įrenginyje pakankamam azoto kiekiui erdvėje virš skysčio užtikrinti. Nuosėdos ir vanduo laikomi anaerobiniais, kai oksidacijos-redukcijos potencialas (E_h) yra mažesnis kaip -100 mV.

Darant anaerobinį bandymą, mineralizacijos įvertinimą sudaro ir išsiskyrusio anglies dioksido bei metano kiekio matavimas.

▼B

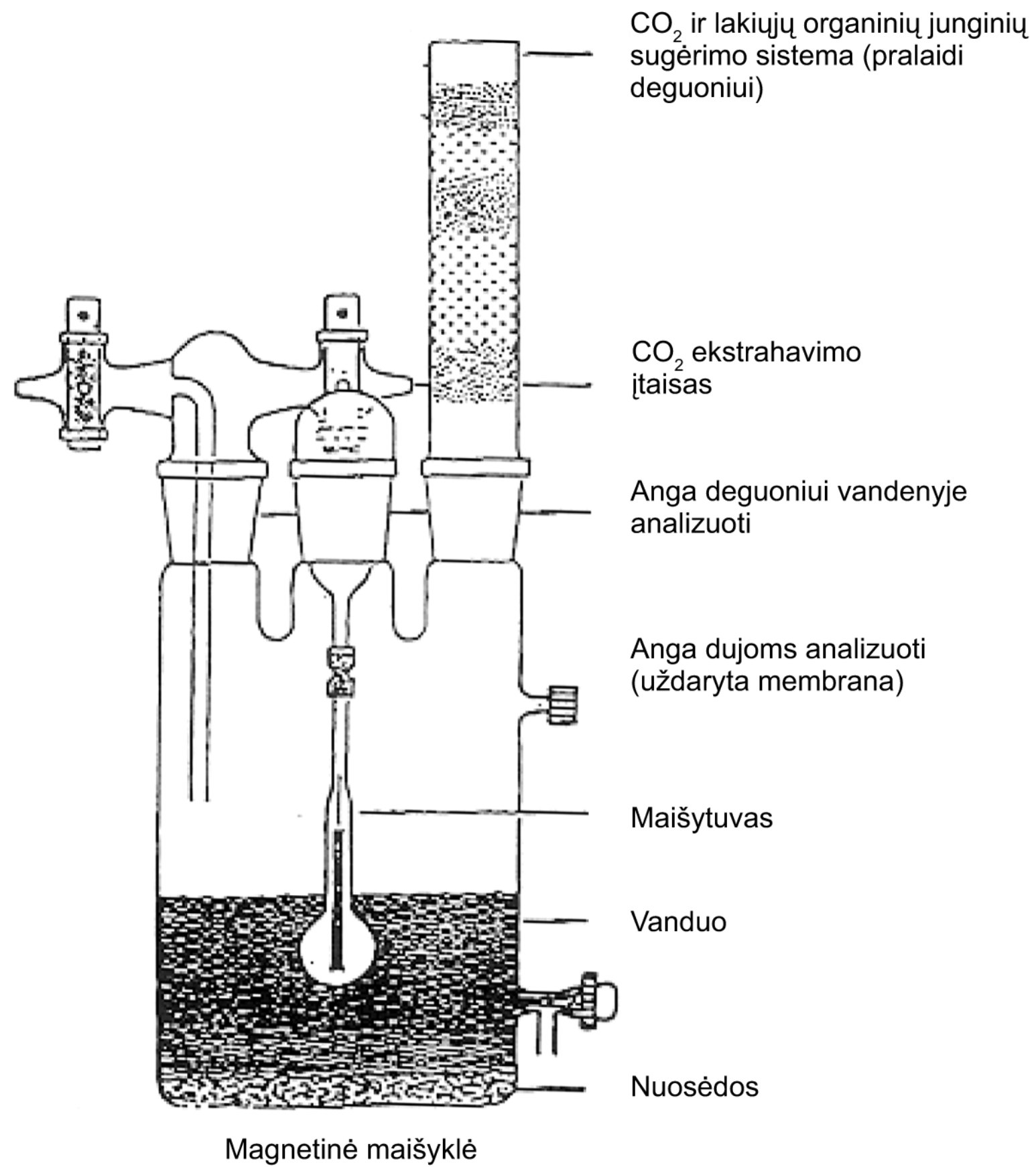
2 priedelis

DUJŲ PRATEKĖJIMO APARATŪROS PAVYZDYS



▼ B

3 priedėlis

BIOMETRINĖS APARATŪROS PAVYZDYS

▼B*4 priedelis***I BANDYMO INDUS DEDAMOS DOZĖS APSKAIČIAVIMO PAVYZDYS**

Cilindro vidinis skersmuo:	= 8 cm
Vandens stulpelio gylis, išskyrus nuosėdas:	= 12 cm
Paviršiaus plotas: $3,142 \times 4^2$	= 50,3 cm ²
Įterpimo norma: 500 g bandomosios medžiagos/ha atitinka 5 µg/cm ²	
Suminis kiekis µg: $5 \times 50,3$	=251,5 µg
Kiekis nustatomas pagal 100 cm stulpelio gylį:	
$12 \times 251,5 \div 100$	= 30,18 µg
Vandens stulpelio tūris: $50,3 \times 12$	= 603 ml
Koncentracija vandenyje: $30,18 \div 603$	= 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., $> 100 \mu\text{g/l}$).

Šio bandymo sąlygomis maža koncentracija yra tokia gana maža koncentracija (pvz., mažesnė kaip $1 \mu\text{g/l} - 100 \mu\text{g/l}$), 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 fiziko-chemines 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 tarpą, 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 $40\,000\text{ ms}^{-2}$ pagreičiui arba membraniniu filtravimu, naudojant membranas, kurių poros yra $0,2\text{ }\mu\text{m}$ – $0,45\text{ }\mu\text{m}$ 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 $1\text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ (apie $10^{-5}\text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$), praktiškai gali būti priskirtos nelakioms. Naudojant uždarytas kolbas su laisvąja erdve, galima bandyti mažai lakias medžiagas (kurių Henrio dėsnio konstantos $< 100\text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ arba $< 10^{-3}\text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$), 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 $^{14}\text{CO}_2$ 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 vandenius.

Metodas gali būti taikomas norint modeliuoti biologinį skaidymą stambiųjų 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 kietųjų 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 vėrtėms dažniausiai gali būti pasiekta naudojant komercines ¹⁴C žymėtas medžiagas. Dėl analizių 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 ¹⁴C arba liekamąją bandomosios medžiagos koncentraciją, kai taikoma specifinė analizė. Patvariausios molekulės dalies žymėjimas ¹⁴C užtikrina visiškos mineralizacijos nustatymą, žymint ¹⁴C 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 ¹⁴C specifinės savybės išnykimui stebėti.

1.5. INFORMACIJA APIE BANDOMĄJĄ MEDŽIAGĄ

Šiame bandyme galima naudoti žymėtasias ir nežymėtas bandomąsias medžiagas. Rekomenduojama taikyti ¹⁴C 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 ¹⁴C žymėti vieną arba daugiau anglies atomų kiekviename žiede. Be to, geriau būtų žymėti ¹⁴C vieną arba daugiau anglies atomų abiejose lengvai skaidomų jungčių pusėse. Bandomosios medžiagos cheminis ir (arba) radiocheminis grynumas turėtų būti > 95 %. Siekiant palengvinti ¹⁴C matavimus, kai atliekami mažos koncentracijos medžiagų bandymai, žymėtųjų medžiagų savytasis 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 išsūdyimo konstantą (arba „Sečenovovo 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 priimtinumų 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 pridėdama palyginti didelės koncentracijos bandomoji medžiaga, t. y. $> 100 \mu\text{g/l}$.

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 guminiiais 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 apsaugoti 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 nefelometriniiais 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 pradiniais 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 ankstesnius 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 jokių atveju neturi viršyti 4 savaitių. 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 jokių atveju neturi viršyti 4 savaitių.

1.8.6. Pusiau nepertraukiama procedūra (neprivaloma)

Gali tekti inkubuoti ilgiau (kelis mėnesius), jei yra ilgas vėlavimo tarpsnis prieš prasidedant didesniai 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 ($> 1 \text{ mg/l}$) ir jų lakumas yra mažas (Henrio dėsnio konstantos $< 1 \text{ Pa} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$ arba $< 10^{-5} \text{ atm} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$), 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 lakųjų organinių 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 ištirti galutiniam 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 ¹⁴C aktyvumą arba išsiskyrusio ¹⁴CO₂ 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 CO₂ kiekio ir deguonies kiekio sumažėjimo gali pakakti labai pakeisti vykstančio bandymo sąlygas.

1.8.9. **Darbo eiga**1.8.9.1. *Kolbų ruošimas pelaginem 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 CO₂ nelaidžiais dangčiais. Jei naudojamos ¹⁴C 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 CO₂ nustatymo metodas (žr. 3 priedą).

Inkubuokite kolbas pasirinktoje temperatūroje (žr. 1.8.8.1 skirsnį). Paimkite mėginius cheminei analizei arba ¹⁴C 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 alikvotinės 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 reikiams 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 mikrobo 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, apdorojamas tuo pačiu tirpiklio kiekiu, kurioms taikoma ta pati procedūra, kaip ir bandomosioms medžiagoms. Tirpiklio kontrolinių ėminių tikslas – ištirti galimą neigiamą tirpiklio poveikį mikrobo 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 $^{14}\text{CO}_2$ yra matuojamas netiesiogiai ir tiesiogiai (žr. 3 priedą). $^{14}\text{CO}_2$ 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 $^{14}\text{CO}_2$ nustatymas neturėtų būti taikomas, jei kaip pagrindiniai bandomosios medžiagos virsmo produktai susidaro lakieji junginiai (žr. 3 priedą). Jei įmanoma, išsiskyrusio $^{14}\text{CO}_2$ 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 $^{14}\text{CO}_2$ kiekis matuojamas tiesiogiai, šiam tikslui bandymo pradžioje turėtų būti paruošta daugiau kolbų. Rekomenduojamas tiesioginis $^{14}\text{CO}_2$ 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 $^{14}\text{CO}_2$ 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 $^{14}\text{CO}_2$ atskirose bandymo kolbose, iš kurių atliekant bandymą mėginiai nebuvo imami (žr. 3 priedą).

1.8.9.5. *Specifinė cheminė analizė*

Jei yra jautrus specifinis analizės metodas, jį galima taikyti vietoj radiocheminių metodu pirminiam biologiniam skaidymui įvertinti, matuojant suminę bandomosios medžiagos liekamąją koncentraciją. Jei naudojama žymėtoji bandomoji medžiaga (visiškai mineralizacijai matuoti), specifinė cheminė analizė gali būti atliekama lygiagrečiai papildomai informacijai gauti ir procedūrai patikrinti. Be to, specifinė cheminė analizė gali būti taikoma nustatyti virsmo produktus, susidariusiems skaidant bandomąją medžiagą, ir ši analizė rekomenduojama medžiagoms, kurių mineralizacijos pusėjimo trukmė ilgesnė kaip 60 parų. Kiekvieną kart imant mėginį turėtų būti išmatuota ir pateikta ataskaitoje bandomosios medžiagos ir virsmo produktų koncentracija (kaip koncentracija ir kaip įdėto kiekio procentinė dalis). Apskritai, jei bet kuriuo mėginio ėmimo momentu aptikti virsmo produktai sudaro $\geq 10\%$ įdėtos medžiagos koncentracijos, jie turėtų būti identifikuoti, išskyrus kai jie gana patikimai patvirtinami kitu būdu. Virsmo produktų, kurių koncentracija visą tyrimą didėja, irgi turėtų būti identifikuojami, net jei jų koncentracija neviršija pirmiau nurodytos ribinės vertės, nes tai galėtų rodyti patvarumą. Reikėtų spręsti virsmo produktų analizės sterilumo kontrolės ėminiuose klausimą, jei manoma, kad galėtų vykti greitas abiotinis bandomosios medžiagos virsmas (pvz., hidrolizė). Virsmo produktų kiekybinio nustatymo ir identifikavimo būtinybė turėtų būti nagrinėjama kiekvienu konkrečiu atveju, pagrindimą pateikiant ataskaitoje. Ekstrahavimas organiniais tirpikliais turėtų būti taikomas pagal atitinkamos analizės metodikos rekomendacijas.

Visi mėginiai turėtų būti laikomi 2–4 °C temperatūroje ir nesiliesti su oru, jei analizė atliekama per 24 h (pageidautina). Laikant ilgiau, mėginiai turėtų būti užšaldomi žemiau –18 °C arba konservuojami cheminiu būdu. Konservuojamų mėginių rūgštinti nerekomenduojama, kadangi rūgštinti mėginiai gali būti nestabilūs. Jei analizei skirti mėginiai laikomi ilgiau kaip 24 h, turėtų būti atliktas stabilumo laikymo sąlygomis tyrimas, kuris įrodytų nagrinėjamų cheminių medžiagų stabilumą, kai laikoma –18 °C temperatūroje arba konservavimo sąlygomis. Jei analizės metodą sudaro ekstrahavimas tirpikliu arba kietosios fazės ekstrahavimas (*anglų k.* SPE), ekstrahuoti reikėtų iškart paėmus mėginį arba ne vėliau kaip per 24 h, jei mėginys atšaldomas.

Atsižvelgiant į analizės metodo jautrį, gali tekti imti didesnio tūrio ėminius nei nurodyta 16 skirsnyje. Bandymą būtų lengva atlikti, jei būtų naudojami vieno litro bandymo tūriai 2–3 litrų talpos kolbose, iš kurių būtų galima imti maždaug 100 ml mėginius.

▼ **M1**2. **DUOMENYS IR ATASKAITOS RENGIMAS**

2.1. REZULTATŲ APDOROJIMAS

2.1.1. **Duomenų grafikas**

Mėginių ėmimo laikas suapvalinamas iki sveiko valandų skaičiaus (išskyrus kai medžiaga skyla dideliu laipsniu per minutes arba valandas), bet ne iki sveiko parų skaičiaus. Braižomi bandomosios medžiagos liekamojo aktyvumo (^{14}C žymėtų medžiagų) arba liekamosios koncentracijos (nežymėtų medžiagų) įverčių kaip laiko funkcijos grafikai, naudojant linijinius ir pusiau logaritminius parametrus (žr. 1a, 1b paveikslus). Jei skaidymas vyko, lyginami F_T ir F_S kolbų rezultatai. Jei kolbų su bandomąja medžiaga (F_T) ir sterilių kolbų (F_S) rezultatų vidurkiai skiriasi mažiau kaip 10 %, galima daryti prielaidą, kad stebimas skaidymas iš esmės yra abiotinis. Jei skaidymas F_S kolbose vyksta mažesniu laipsniu, skaičiai gali būti naudojami F_T kolboms gautų rezultatų pataisai daryti (atimant), kad ūbtų galima įvertinti biologinio skaidymo laipsnį. Kai atliekama neprivaloma pagrindinių virsmo produktų analizė, be bandomosios medžiagos išnykimo grafiko turėtų būti pateikti virsmo produktų susidarymo ir išnykimo grafikai.

Pagal skaidymo kreivę nustatoma vėlavimo tarpsnio trukmė t_L (pusiau logaritminis grafikas) tiesiąją kreivės dalį ekstrapoliuojant į nulinį skaidymo laiką arba nustatant maždaug 10 % skaidymo trukmę (žr. 1a ir 1b paveikslus). Pagal pusiau logaritminį grafiką įvertinama pirmojo laipsnio greičio konstanta k ir jos standartinė paklaida, atliekant $\ln$ (liekamojo ^{14}C aktyvumo arba bandomosios medžiagos koncentracijos) kaip laiko 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 didesnę skaičių mažiau apibrėžtų duomenų. Šiuo atveju neapibrėžti 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 $t_{1/2} = \ln 2/k$ 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 negaliooti. 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 analizes 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 $^{14}\text{CO}_2$, kita jo dalis naudojama biomasei didinti ir (arba) neląstelių metabolitų sintezei. Taigi vykstant „visiškam“ biologiniam medžiagos skaidymui, ne visa jos anglis virsta $^{14}\text{CO}_2$. ^{14}C , patekęs į biosintezės būdą gautus produktus, vėliau lėtai išsiskiria kaip $^{14}\text{CO}_2$ dėl „antrinės mineralizacijos“. Dėl šių priežasčių liekamojo organinio ^{14}C aktyvumo (išmatuoto pašalinus CO_2) arba gauto $^{14}\text{CO}_2$ kiekio kaip laiko funkcijos kreivėse atsiranda „uodega“, kai skaidymas jau yra baigtas. Tai apsunkina duomenų kinetinį interpretavimą ir tik pradinę kreivės dalis (pabaigus 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, koku 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**

Jeigu 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 lygiagrečių bandymą, naudojant didesnę bandomosios medžiagos koncentraciją.

Netiesioginis ir tiesioginis $^{14}\text{CO}_2$ 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 $\geq 10\%$ 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 mikroorganizmų 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 visišką biologinį skaidymo lygis. Išsamesniam visišką biologinį skaidymo (mineralizacijos ir įjungimo į biomasę) vaizdai 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

Jeigu 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 $0,3\text{--}1,7\text{ d}^{-1}$, jo vidurkis $0,8\text{ d}^{-1}$ ir standartinė paklaida $\pm 0,4\text{ d}^{-1}$ ($t_{1/2} = 0,9$ paros). Tipinės vėlavimo trukmės vertės buvo 1–7 paros. Nurodoma, kad tirtų vandens ėminių bakterijų biomasė atitiko $10^3\text{--}10^4$ 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 savi-tasis 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, dumblinės 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***¹⁴C Fazinis pasiskirstymas**

Norint patikrinti procedūrą, įprasti liekamojo suminio organinės ¹⁴C aktyvumo (TOA) matavimai turėtų būti papildyti masių balanso matavimais, įskaitant tiesioginį išsiskyrusio ir absorbentu sugauto ¹⁴CO₂ nustatymą (žr. 3 priedą). Patvirtintas ¹⁴CO₂ 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 ¹⁴C aktyvumą DOA) ir kietųjų dalelių fazės (kietųjų dalelių organinės ¹⁴C 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 ¹⁴C susidarymas gali būti įvertintas kaip DOA biologinio skaidymo pabaigoje (skaidymo kaip laiko funkcijos kreivės gulsčioji dalis).

Liekamosios ¹⁴C 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 tikt 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 mikrobu populiacijos įvairovė dėl įvairių išnykimo mechanizmų ir dėl galimo vandens ėminio pagrindinių mitybinių medžiagų ir pirminių anglies substratų išsekimo. 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 bandomąja 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 nejudančių 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 mikrobu 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:

$$\log K_{ow} \text{ (bandomosios medžiagos)} = 3,$$

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

$$\text{pasiskirstymo koeficientas, } K_d = f_C \times K_{oc},$$

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* **$^{14}\text{CO}_2$ Nustatymas****Netiesioginis $^{14}\text{CO}_2$ 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 $\frac{1}{2}$ –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 sukuriniu 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, $^{14}\text{CO}_2$ 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 sukuriniu 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.

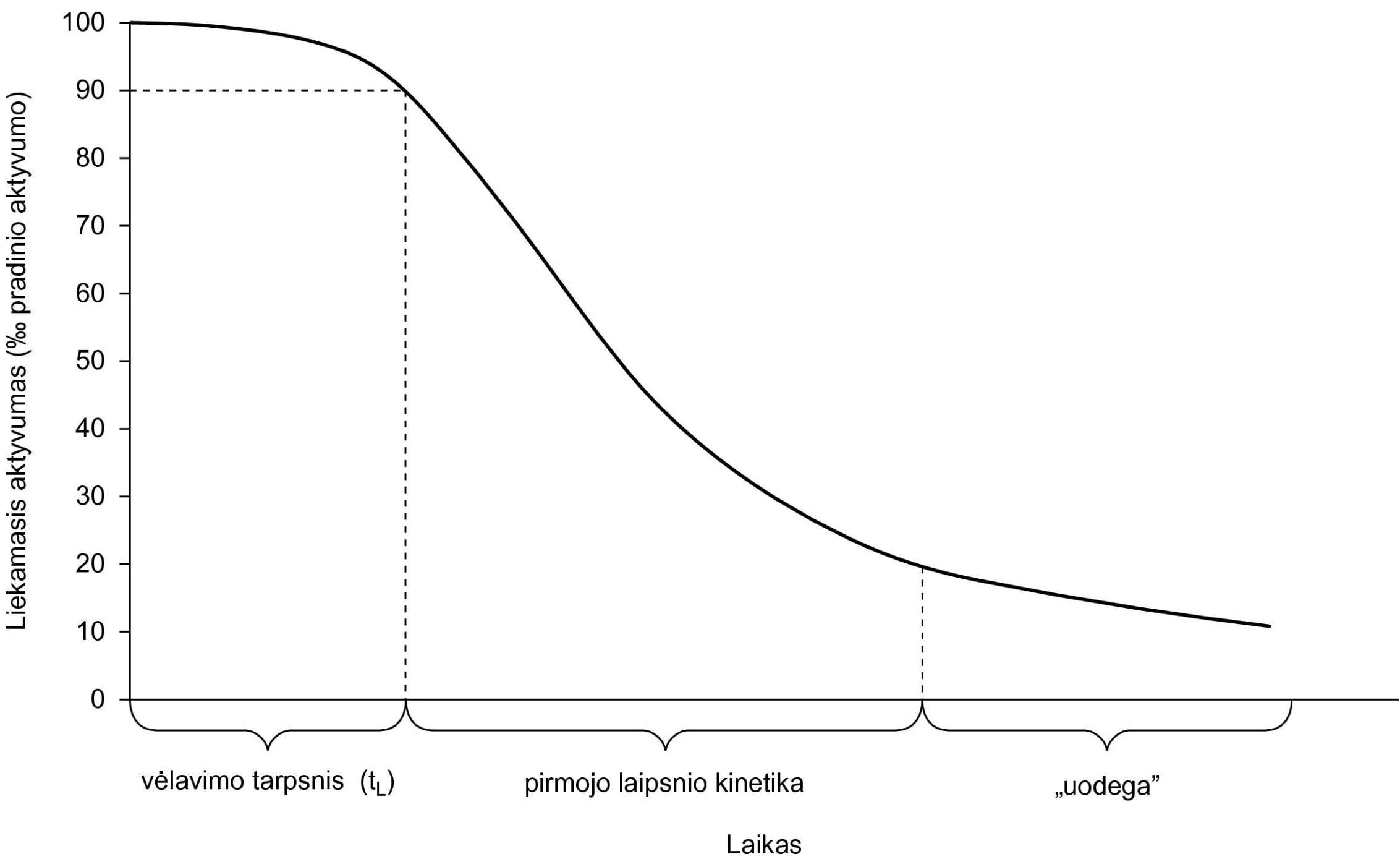
Tiesioginis $^{14}\text{CO}_2$ nustatymas

Jei išsiskyręs $^{14}\text{CO}_2$ 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 $^{14}\text{CO}_2$ 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 $^{14}\text{CO}_2$ matavimą, kolbos turėtų būti uždarytos, pvz., butilkaučiuko membrana.

▼ **M1**

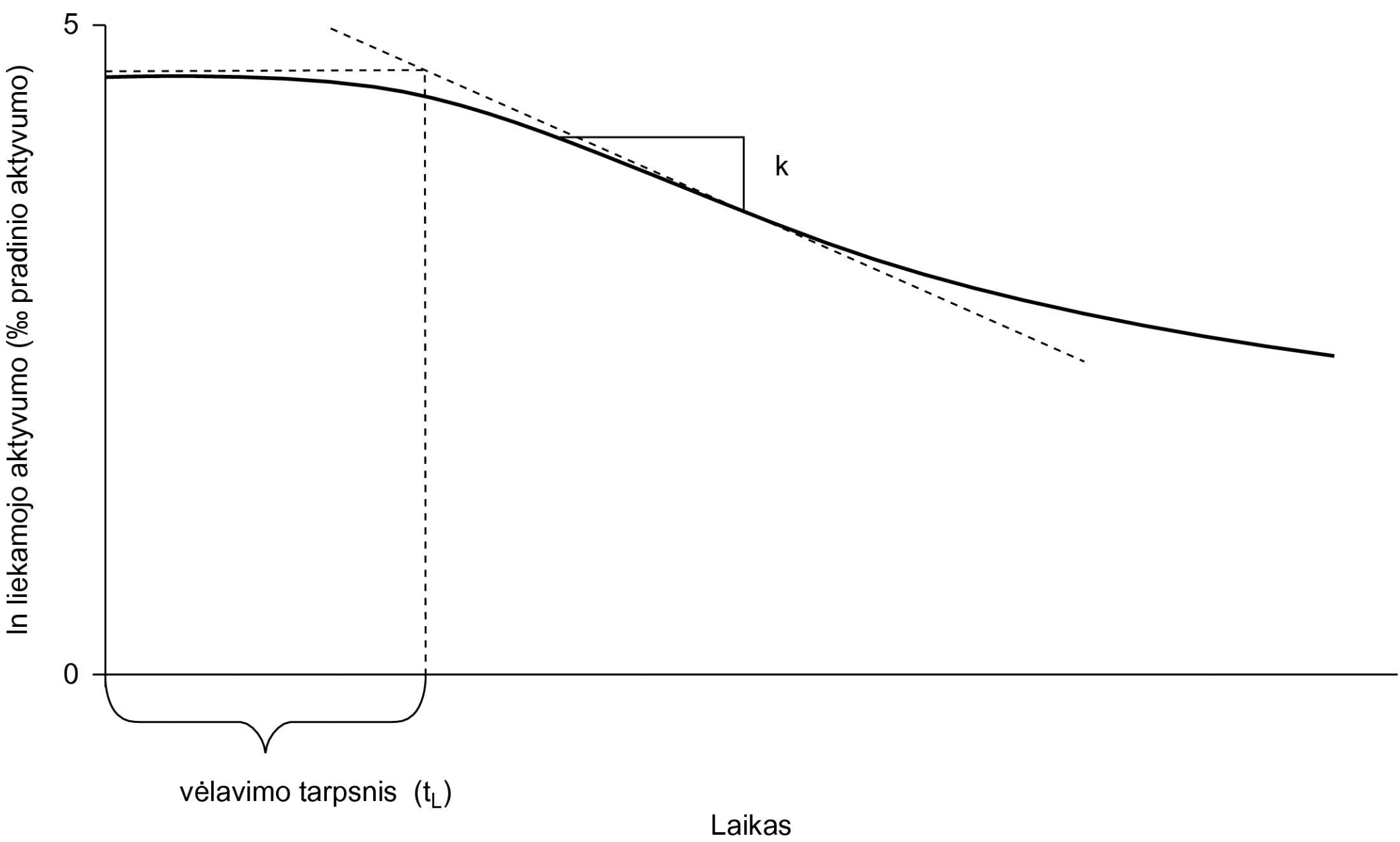
1a paveikslas.

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 imamas 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., gniūžulų skaičius arba gniūžulų plotas, taigi terminas „biomasė“ taikomas ir šiems pakaitiniams matams.

Chlorozė: gniūžulų 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 gniūžulų (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.

Išėiga: 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 – išėiga, 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 išėigą apskaičiuojama apibrėžtą išėigos 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 tarplaboriniame 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 $0,275\text{ d}^{-1}$. 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 klimatinės 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 plūdėnų 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 skirtą buferinio tirpalo (MOPS (4-morfolinpropansulfonrūgšties, CAS Nr. 1132–61–2; EINECS Nr. 214–478–5) *L. minor* terpėje ir NaHCO₃ *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 veikiamas 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 $100 \mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$, sąraše yra acetonas ir dimetilformamidas. Jei naudojamas tirpiklis arba dispergentas, jo galutinė koncentracija turėtų būti nurodyta ataskaitoje ir būti kiek įmanoma mažesnė ($\leq 100 \mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$), 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 pasikliautiniai 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·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, sukaupias 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 išėigą) (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 $85\text{--}135\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (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 $\pm 15\%$ 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 $24 \pm 2\ ^\circ\text{C}$. 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 plūdumo 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 stacionariusius bandymus yra koncentracijos matavimas bandymo pradžioje ir pabaigoje.

Atliekant pusiau stacionariusius bandymus, kai nelaukiama, kad bandomosios medžiagos koncentracija nesikeis daugiau kaip $\pm 20\%$ 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 $\pm 20\%$ 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, pusiauinkelėje 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 $\pm 20\%$ 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 $\pm 20\%$, rezultatų analizę 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 kaip $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ arba tirpumą bandymo terpėje atitinkančiai koncentracijai (kuri būtų mažesnė), galima atlikti ribinį bandymą, kuriame būtų lyginami kontrolinės grupės ir vienos apdorotų ėminių grupės ($100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 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. DVIKUBĖJIMO 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 ėminių 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., EC₅₀) turėtų būti pagrįsti vidutiniu savituoju augimo greičiu ($E_r C_x$) ir išeiga ($E_y C_x$), 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: $E_r C_x$ (gniužulų skaičius); $E_r C_x$ (suminis gniužulų plotas, sausos medžiagos masė arba šviežios medžiagos masė); $E_y C_x$ (gniužulų skaičius) ir $E_y C_x$ (suminis gniužulų plotas, sausos medžiagos masė arba šviežios medžiagos masė).

▼ **M1**

2.3. STATISTINĖS PROCEDŪROS

Tikslas – gauti kiekybinę 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 glodžių 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., mirtinumas 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 taškiniais įverčiais 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 vidutinės vertės, 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 tikėtą 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 būseną 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 pasikliautiniai režiai),
- 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., EC₅₀, EC₁₀, EC₂₀, ir atitinkami pasikliautiniai 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***I 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 priedelis***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 įmerkama 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·l ⁻¹)	Paruoštos terpės koncentracija (mg·l ⁻¹)	Paruošta terpė	
				Elementas	Koncentracija (mg·l ⁻¹)
I	NaNO ₃	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH ₂ PO ₄	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	MgSO ₄ · 7H ₂ O	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	CaCl ₂ · 2H ₂ O	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na ₂ CO ₃	4,0	20	C	2,3
V	H ₃ BO ₃	1,0	1,00	B	0,17
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,20	0,20	Mn	0,056
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,010	0,010	Mo	0,0040
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,050	0,050	Zn	0,011
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na ₂ -EDTA·2H ₂ O	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (buferinis tirpalas)	490	490	—	—

- 1 litrai 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 $6,5 \pm 0,2$ 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 $7,5 \pm 0,1$ ir dejonizuotu vandeniu skiedžiama iki vieno litro tūrio. Terpė filtruojama į sterilų indą per 0,2 μm (maždaug) membrininį 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·l ⁻¹) (1)	Paruoštos terpės koncentracija (mg·l ⁻¹) (*)	Paruošta terpė	
				Elementas	Koncentracija (mg·l ⁻¹) (*)
A1	NaNO ₃	26	510	Na; N	190; 84
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	12	240	Mg	58,08
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	4,4	90	Ca	24,04
A2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	15	290	S	38,22
A3	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B	H ₃ BO ₃	0,19	3,7	B	0,65
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,42	8,3	Mn	2,3
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,16	3,2	Fe	0,66
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0,30	6,0	—	—
	ZnCl ₂	3,3 mg·l ⁻¹	66 μg·l ⁻¹	Zn	31 μg·l ⁻¹
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,4 mg·l ⁻¹	29 μg·l ⁻¹	Co	7,1 μg·l ⁻¹
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7,3 mg·l ⁻¹	145 μg·l ⁻¹	Mo	58 μg·l ⁻¹
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,012 mg·l ⁻¹	0,24 μg·l ⁻¹	Cu	0,080 μg·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.

I 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 · 4H ₂ O	236,15	295,00	1,25
KH ₂ PO ₄	136,09	90,00	0,66
K ₂ HPO ₄	174,18	12,60	0,072
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,37	100,00	0,41
Mikroelementai	molinė masė	µg/l	µmol/l
H ₃ BO ₃	61,83	120,00	1,94
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287,43	180,00	0,63
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	241,92	44,00	0,18
MnCl ₂ · 4H ₂ O	197,84	180,00	0,91
FeCl ₃ · 6H ₂ O	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
<i>1 pradinis tirpalas:</i>	
KNO ₃	17,50
KH ₂ PO ₄	4,5
K ₂ HPO ₄	0,63
<i>2 pradinis tirpalas:</i>	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5,00
<i>3 pradinis tirpalas:</i>	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	14,75

3 lentelė.

Pradiniai tirpalai (mikroelementų)

2. Mikroelementai (1 000 kartų koncentruoti)	mg/l
<i>4 pradinis tirpalas:</i>	
H ₃ BO ₃	120,0
<i>5 pradinis tirpalas:</i>	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	180,0
<i>6 pradinis tirpalas:</i>	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	44,0
<i>7 pradinis tirpalas:</i>	
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180,0
<i>8 pradinis tirpalas:</i>	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	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 mažesni 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 $5,5 \pm 0,2$.